สารออกฤทธิ์จากแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคในกล้วยไม้
Colletotrichum gloeosporioides และ *Curvularia lunata*

นางสาวรพีวรรณ โสวรรณปรีชา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACTIVE COMPOUND FROM BACTERIAL CULTURE FITRATE WITH INHIBITORY EFFECT AGAINST ORCHID-PATHOGENI FUNGI *Colletotrichum gloeosporioides* AND *Curvularia lunata*

Miss Rapeewan Sowanpreecha

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สารออกฤทธิ์จากแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคในกล้วยไม้ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Curvularia lunata*
โดย	นางสาวรพีวรรณ โสวรรณปรีชา
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. ชัญญา พุทธิขันธ์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รพีวรรณ โสวรรณปรีชา : สารออกฤทธิ์จากแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคในกล้วยไม้ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Curvularia lunata*. (ACTIVE COMPOUND FROM BACTERIAL CULTURE FILTRATE WITH INHIBITORY EFFECT AGAINST ORCHID-PATHOGENIC FUNGI *Colletotrichum gloeosporioides* AND *Curvularia lunata*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร. ปาหนัน เริงสำราญ, 117 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรีย N3 จากทั้งหมด 10 ไอโซเลต เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Curvularia lunata* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคแอนแทรคโนสและโรคดอกสนิมหรือจุดสนิมในกล้วยไม้ได้ จากนั้นนำไปหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้แบคทีเรียสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราได้ดีที่สุด โดยแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, pH, และอุณหภูมิ พบว่าแบคทีเรีย N3 สร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว TSB pH 7 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และเลี้ยงแบคทีเรีย N3 ในอาหารเหลว TSB pH 6 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 21 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์แบคทีเรียไปทดสอบความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิ เป็นเวลา 20 นาที พบว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดสามารถทนต่อ pH ตั้งแต่ 2 – 10 ได้ และทนอุณหภูมิได้ตั้งแต่ 20 – 121 องศาเซลเซียส จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40 – 80% แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A พบว่าโปรตีนในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *C. lunata* ได้ เมื่อนำโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS – PAGE พบว่า มีขนาด 63.3 และ 39.6 kDa ผลการทดสอบโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ต่อการงอกของสปอร์ของรา *C. lunata* พบว่าเส้นใยเกิดการบวมและมีการโป่งพอง เมื่อทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์แบคที่เรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ พบว่ามีค่าเท่ากับ 15.62 และ 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *C. lunata* มาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ พบว่ามีค่าเท่ากับ 3.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบคทีเรีย N3 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ได้ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* ถึง 99% จากผลการทดลองเหล่านี้แสดงแนวโน้มว่าสามารถนำแบคทีเรีย N3 หรือสารที่มีฤทธิ์ไปประยุกต์ใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในกล้วยไม้ในสภาพแวดล้อมได้

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต รพีวรรณ โสวรรณปรีชา

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2553

5172415123 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : *Bacillus* / FUNGAL PATHOGEN / ORCHID / *Colletotrichum* / *Curvularia*

RAPEEWAN SOWANPREECHA : ACTIVE COMPOUND FROM BACTERIAL CULTURE FILTRATE WITH INHIBITORY EFFECT AGAINST ORCHID-PATHOGENIC FUNGI *Colletotrichum gloeosporioides* AND *Curvularia lunata*. ADVISOR : PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., 117 pp.

Bacteria isolate N3 was selected from 10 bacteria isolates judging from its ability to inhibit growth of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Curvularia lunata* which caused anthracnose and flower rusty spot diseases in orchid, respectively. Variation of culture media, pH, and temperature for its cultivation revealed that the optimal conditions for producing active compound against *C. gloeosporioides* were; culture in TSB medium at pH 7, 37°C for 18 hr, and against *C. lunata* were culture in TSB medium at pH 6, 37°C for 21 hr. Active compound from culture filtrate showed stability to pH in the range of 2 – 10 and temperature from 20 – 12°C for 20 minutes. Proteins were fractionated from culture filtrate with 0 – 40% and 40 – 80% saturation of ammonium sulfate were further purified by DEAE Bio-gel A anion exchange chromatography. Result indicated that active compound eluted at 0.6-0.7 M NaCl could inhibit growth of *C. lunata* and possessed two major bands with M.W. of 63.3 and 39.6 kDa as detected by SDS–PAGE. Purified protein caused abnormality in hyphae germination with abnormal and swollen characteristics. MIC of culture filtrate against *C. gloeosporioides* and *C. lunata* were found to be 15.62 and 7.81 µl/ml, respectively, whereas MIC of purified protein against *C. lunata* was 3.12 µl/ml. Taxonomic study revealed that isolate N3 is a Gram positive rod shape spore forming bacteria. 16S rDNA sequencing showed a 99% similarity to *Bacillus subtilis*. Results from above studies suggest potential use of *B. subtilis* N3 and its metabolites for inhibiting growth of orchid pathogenic fungi.

Department : Microbiology Student's Signature Rapeewan Sowanpreecha

Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature Panan Rerngsamran

Academic Year : 2010

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจากอาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ พร้อมทั้งเอาใจใส่ดูแลเป็นที่ปรึกษาในเรื่องต่างๆ ตลอดจนการอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจที่ดียิ่งเสมอมา อีกทั้งยังกรุณาแก้ไขตรวจทานและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, อาจารย์ ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ และดร.ชัญญา พุทธิขันธ์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง ที่ให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์สำหรับงานวิจัย ทำให้งานวิจัยของผู้วิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กราบขอบพระคุณกองโรคพืช กรมวิชาการเกษตร และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การอนุเคราะห์ราทั้งสองชนิดสำหรับใช้ในงานวิจัย ทำให้งานของผู้วิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจน นางสาวนิโรบล เหลากลม, นายนันทวิทย์ ฉัตรอุทัย และนางสาวเต็มศิริ ตันติบุญทวีวัฒน์ ที่สอนเทคนิควิธีการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ อีกทั้งยังให้ความช่วยเหลือและข้อคิดเห็นต่างๆที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่น่ารัก และสมาชิกห้องวิจัย 448 ทุกคน ที่มีส่วนในการช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณทุนโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดี) ที่ให้การสนับสนุนค่าเล่าเรียนและค่าใช้จ่ายต่างๆ

ขอขอบคุณนางสาวกนิฏฐกา แดนราช ที่เป็นเพื่อนคู่คิด คอยช่วยเหลือ ดูแลเอาใจใส่ และเป็นกำลังใจในทุกๆ เรื่อง ทำให้ผู้วิจัยมีช่วงเวลาที่ดีและรู้สึกประทับใจตลอดการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณยาย คุณน้า และพี่ๆที่น่ารัก ที่คอยเป็นที่ปรึกษาอย่างดี คอยสนับสนุน ช่วยเหลือ เป็นแรงใจและให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย จนทำให้วิทยานิพนธ์ของผู้วิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้แต่โดยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…….. จ

กิตติกรรมประกาศ……. ฉ

สารบัญ…….... ช

สารบัญตาราง……..... ฎ

สารบัญภาพ…….. ฐ

บทที่

1. บทนำ……..... 1

2. ปริทรรศน์วรรณกรรม……..... 3

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง……..... 19

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย……..... 19

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ…….. 22

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย…….. 24

3.3.1 แบคทีเรีย……. 24

3.3.2 ราโรคพืช…….. 24

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ…… 24

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรีย…….. 24

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับรา……. 24

3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์……. 24

3.5.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย……. 24

3.5.2 การเก็บรักษารา……..... 25

3.6 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ดีที่สุด…..…….. 25

3.6.1 การเตรียมแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ……..... 25

3.6.2 การเตรียมรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ที่ก่อโรคในกล้วยไม้……..... 25

บทที่ หน้า

3.6.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ เพื่อคัดเลือกไอโซเลตที่สามารถยับยั้งราทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด..... 26
3.7 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *C. lunata*..... 26
3.7.1 การแปรผันหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสม..... 26
3.7.2 การแปรผันหา pH ของอาหารที่ pH6, pH7, pH8 และ pH9..... 27
3.7.3 การแปรผันหาอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส..... 28
3.8 การทดสอบความเสถียรของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งราซึ่งผลิตโดยแบคทีเรีย..... 28
3.8.1 การเตรียมส่วนน้ำใสจากแบคทีเรีย..... 28
3.8.2 การทดสอบความเสถียรต่อ pH 28
3.8.3 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ..... 29
3.9 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC: minimum inhibitory concentration) ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้..... 29
3.10 การสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราทั้งสองชนิด..... 29
3.10.1 การเตรียมส่วนน้ำใสจากแบคทีเรีย..... 30
3.10.2 การสกัดสารด้วยตัวทำละลายต่างๆ..... 30
3.10.3 การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา..... 30
3.10.3.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงต่างๆ..... 30
3.10.3.2 การเตรียมถุงไดแอลิซิส..... 31
3.10.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน..... 31
3.10.3.4 การทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีน..... 31
3.10.3.5 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร (ion exchange chromatography)..... 32

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3.10.3.6 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ โดยการทำอิเล็กโทรโฟเรซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)..... 33
3.11 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา..... 35
3.11.1 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC: minimum inhibitory concentration) ของโปรตีนบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้..... 35
3.11.2 การตรวจสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา..... 35
3.12 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย..... 36
3.12.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียเบื้องต้น..... 36
3.12.2 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย..... 36
3.12.3 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 37
3.12.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส..... 38
3.12.5 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้ากับเวกเตอร์ pGEM โดยใช้ชุดสำเร็จ pGEM® -T และ pGEM® -T Easy Vectors..... 38
3.12.6 การทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5 α โดยวิธี heat shock..... 39
3.12.7 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์..... 39
3.12.8 การสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยวิธีแอลคาไลน์ไลซิส (Alkaline lysis)..... 40
3.12.9 การสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit..... 41
3.12.10 การตรวจสอบพลาสมิดว่ามีดีเอ็นเอของแบคทีเรียอยู่ โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI..... 41

บทที่ หน้า

3.12.11 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย..... 42
3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 42
3.13.1 สถิติพรรณนา (Descriptive statistics)..... 42
3.13.2 สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน (Covarience)..... 42
4. ผลการทดลอง..... 43
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ดีที่สุด..... 43
4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *C. lunata*..... 44
4.2.1 การแปรผันหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสม..... 44
4.2.2 การแปรผัน pH ของอาหารที่ pH6, pH7, pH8 และ pH9..... 47
4.2.3 การแปรผันหาอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส..... 49
4.3 การทดสอบความเสถียรของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งราซึ่งผลิตโดยแบคทีเรีย..... 52
4.3.1 การทดสอบความเสถียรต่อ pH..... 52
4.3.2 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ..... 54
4.4 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC: minimum inhibitory concentration) ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้..... 57
4.5 การสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราทั้งสองชนิด..... 60
4.5.1 การสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยตัวทำละลายต่างๆ..... 60
4.5.2 การแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยช่วงของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม..... 60
4.6 การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา..... 62
4.6.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต..... 62
4.6.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร (ion exchange chromatography)..... 65

บทที่ หน้า

4.6.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ โดยการทำอิเล็กโทรโฟเรซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)..... 68
4.7 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา..... 69
4.7.1 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC: minimum inhibitory concentration) ของโปรตีนบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้..... 69
4.7.2 การตรวจสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา..... 71
4.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย..... 73
4.8.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี... 73
4.8.2 การพิสูจน์เอกลักษณทางชีววิทยาระดับโมเลกุล..... 74
4.8.2.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส..... 74
4.8.2.2 การโคลนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย N3 จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้ากับเวกเตอร์ pGEM โดยใช้ชุดสำเร็จ pGEM® -T และ pGEM® -T Easy Vectors..... 75
4.8.3 การตรวจสอบพลาสมิดว่ามีดีเอ็นเอของแบคทีเรียอยู่ โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI..... 76
4.8.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย..... 77
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 78
รายการอ้างอิง..... 84
ภาคผนวก..... 93
ภาคผนวก ก..... 94
ภาคผนวก ข..... 97
ภาคผนวก ค..... 104
ภาคผนวก ง..... 105
ภาคผนวก จ..... 109
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 117

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	แสดงบริเวณที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ของ *C. gloeosporioides* และ *C. lunata*.....	43
4.2	ค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้งของราทั้งสองชนิด ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	58
4.3	การยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* จากสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียมในช่วง 0 – 40%, 40 – 80%, และ 80 – 100%.....	61
4.4	ค่าต่างๆ หลังจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตของแบคทีเรีย N3 ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการลดการเจริญของรา *C. gloeosporioides*	63
4.5	ค่าต่างๆ หลังจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีของแบคทีเรีย N3 ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการลดการเจริญของรา *C. lunata*.....	64
4.6	ค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้งของรา *C. lunata* ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสารละลายโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	70
4.7	แสดงการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย N3.....	74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	รา *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหารแข็ง PDA (Potato-Dextrose Agar) บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน.....	5
2.2	โรคแอนแทรคโนส สาเหตุเกิดจากเชื้อ *C. gloeosporioides*.....	7
2.3	ลักษณะของเส้นใย (ซ้าย) และสปอร์ (ขวา) รา *C. lunata* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน.....	8
2.4	โรคดอกสนิมหรือจุดสนิม สาเหตุเกิดจากเชื้อ *C. lunata*.....	8
4.1	กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย N3 ในอาหารเหลว TSB, LB, และ NB ที่เวลาต่างๆ.....	44
4.2	กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย N3 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB, NB และ TSB ในชั่วโมงที่ 9 – 24.....	45
4.3	กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย N3 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB, NB และ TSB ในชั่วโมงที่ 9 – 24.....	46
4.4	แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* [a] และ *C. lunata* [b] โดยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลว TSB ที่ 18 และ 21 ชั่วโมง ตามลำดับ (หมายเหตุ: บริเวณหลุมรอบนอกคือ ชุดทดลองที่มีส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ และหลุมกลางคือ อาหารเหลว TSB).....	46
4.5	กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย N3 ในอาหารเหลว TSB ที่ความเป็นกรด-เบสต่างๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 – 24.....	47
4.6	กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย N3 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ที่ pH ต่างๆ ในชั่วโมงที่ 9 – 24.....	48
4.7	กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย N3 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ที่ pH ต่างๆ ในชั่วโมงที่ 9 – 24.....	48

รูปที่		หน้า
4.8	แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* [a] และ *C. lunata* [b] โดยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลว TSB ที่ pH 7 ชั่วโมงที่ 18 และ pH 6 ชั่วโมงที่ 21 ชั่วโมง ตามลำดับ……..	49
4.9	กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย N3 ในอาหารเหลว TSB ที่ pH 6 และ 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ ในชั่วโมงที่ 0 – 24.....	50
4.10	กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย N3 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ที่ pH 7 อุณหภูมิต่างๆ ในชั่วโมงที่ 9 – 24.....	50
4.11	กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย N3 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ที่ pH 6 อุณหภูมิต่างๆ ในชั่วโมงที่ 9 – 24.....	51
4.12	แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* [a] และ *C. lunata* [b] โดยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลว TSB ที่ pH 7 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา18 ชั่วโมง และ pH 6 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง ตามลำดับ.....	51
4.13	แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* โดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่ผ่านการทดสอบหาความเสถียรต่อ pH ที่ pH ต่างๆ ได้แก่ pH 2 [a], pH 4 [b], pH 6 [c], pH 8 [d] และ pH 10 [e].....	53
4.14	แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* โดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่ผ่านการทดสอบหาความเสถียรต่อ pH ที่ pH ได้แก่ pH 2 [a], pH 4 [b], pH 6 [c], pH 8 [d] และ pH 10 [e]……..	53
4.15	กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* โดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่ผ่านการทดสอบหาความเสถียรต่อ pH ที่ pH ต่างๆ.....	54
4.16	แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* โดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่ผ่านการทดสอบหาความเสถียรต่ออุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 20 [a], 40 [b], 60 [c], 80 [d], 100 [e] และ 121 [f] องศาเซลเซียส.....	55

รูปที่ หน้า

4.17 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* โดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่ผ่านการทดสอบหาความเสถียรต่ออุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 20 [a], 40 [b], 60 [c], 80 [d], 100 [e] และ 121 [f] องศาเซลเซียส..... 56

4.18 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* โดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่ผ่านการทดสอบหาความเสถียรต่ออุณหภูมิต่างๆ..... 57

4.19 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำไลโอฟิไลซ์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 59

4.20 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* [a] และ *C. lunata* [b] โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำไลโอฟิไลซ์ ที่ความเข้มข้น 31.25 (A), 15.62 (B), 7.81 (C) และ 3.9 (D) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.... 59

4.21 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* [a], [b] และ *C. lunata* [c], [d] โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0 – 40% [a], [c] และ 40 – 80% [b], [d] 62

4.22 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ในแต่ละลำดับส่วนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนของแบคทีเรีย N3 ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการลดการเจริญของรา *C. gloeosporioides* ในช่วง 40 – 80% โดยนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A..... 66

4.23 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ในแต่ละลำดับส่วนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนของแบคทีเรีย N3 ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการลดการเจริญของรา *C. lunata* ในช่วง 40 – 80% โดยนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A..... 67

รูปที่		หน้า
4.24	แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งของรา *C. lunata* โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40 – 80% (C) และการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 92 – 95 (A), 79 – 82 (B) และ 96 – 100 (D).....	67
4.25	การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและทดสอบความบริสุธิ์ของโปรตีนโดยวิธี SDS – PAGE.....	69
4.26	กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	70
4.27	แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งของรา *C. lunata* โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 12.5 (A), 6.25 (B), 3.125(C) และ 1.56(D) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร.....	71
4.28	แสดงลักษณะของรา *C. lunata* ในชุดควบคุม [a] และชุดทดสอบ [b] ชั่วโมงที่ 24 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า.....	71
4.29	แสดงลักษณะของสปอร์รา *C. lunata* ในชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 0[a], 3[b], และ 9[c] และชุดทดสอบ ชั่วโมงที่ 0[d], 3[e], และ 9[f] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า.....	72
4.30	แสดงลักษณะของสปอร์รา *C. lunata* ในชุดควบคุม [a] และชุดทดสอบ [b] ชั่วโมงที่ 24 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	73
4.31	แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย N3 บนอาหารแข็ง NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง [a], ลักษณะของแบคทีเรีย N3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง [b] และสปอร์ของแบคทีเรีย N3 [c].....	73
4.32	แสดงปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับโคโลนีของแบคทีเรีย N3.....	74
4.33	แสดงผลของผลิตภัณฑ์ชิ้นดีเอ็นเอของแบคทีเรีย N3 จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	75
4.34	ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 10F และ 1500R เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย N3.....	76

รูปที่ หน้า

4.35 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของพลาสมิดที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit นำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI..... 77

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

อุตสาหกรรมกล้วยไม้ของประเทศไทยได้เจริญก้าวหน้าอย่างมาก และทำรายได้เข้าสู่ประเทศจำนวนมหาศาล ดังนั้นการปลูกกล้วยไม้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง กล้วยไม้ไทยเป็นสินค้าที่ได้รับความนิยมในต่างประเทศ และประเทศไทยครองอันดับการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกเมืองร้อนเป็นอันดับหนึ่งของโลกมาเป็นเวลานาน ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกขยายตัวอย่างต่อเนื่องตลอดช่วงทศวรรษที่ผ่านมา (เจตน์ มีญาณเยี่ยม, 2009) กล้วยไม้จัดเป็นพืชที่ดูแลรักษาค่อนข้างยาก เพราะบอบบาง อ่อนแอ ไม่ทนทานต่อแมลง แบคทีเรีย ไวรัส และรา ทำให้เกิดโรคต่างๆ มากมาย เช่น เกิดจาก Cymbidium Mosaic Virus (CymMV) และ *Erwinia carotovora* ซึ่งเป็นไวรัสและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่กล้วยไม้ (Chan และคณะ, 2005) แต่ปัญหาที่นักเพาะกล้วยไม้พบกันส่วนมาก คือ โรคที่เกิดจากเชื้อรา

Colletotrichum gloeosporioides และ *Curvularia lunata* เป็นราที่ทำให้เกิดโรคในพืชได้หลายชนิด รวมทั้งกล้วยไม้ ซึ่งโรคที่เกิดจากราสองชนิดได้แก่ โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) และโรคดอกสนิมหรือจุดสนิม (Flower rusty spot) ตามลำดับ สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ นี้เกิดจากสภาพพื้นที่อับร้อนชื้น โดยเฉพาะช่วงที่มีฝนตกชุกหลายวัน หรือมีน้ำค้างลงจัด ทำให้ราเจริญเติบโตได้ดีและเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชได้ง่าย และมักเกิดกับต้นที่ปลูกด้วยกาบมะพร้าว ราทั้งสองชนิดมักพบก่อโรคมากในกล้วยไม้สกุลคัทลียา หวาย ออนซิเดียม และแวนด้า ซึ่งอาการของโรคมักจะเริ่มเป็นเพียงเล็กน้อยจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนทำให้ต้นตายได้ในที่สุด (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2520)

เมื่อพืชที่ปลูกมีการติดเชื้อทั้งสองชนิดนี้แล้วจะส่งผลเสียหายแก่เกษตรกร ทั้งสูญเสียผลผลิตและยังส่งผลไปถึงเศรษฐกิจเพราะไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตไปขายได้ ทำให้ขาดรายได้ ดังนั้นจึงมีการค้นหาวิธีการต่างๆ เพื่อเป็นการป้องกันการก่อโรคในกล้วยไม้ เช่น ปรับสภาพพื้นที่ปลูกให้โปร่งโล่ง ไม่ให้อับชื้น มีอากาศถ่ายเทสะดวก ไม่ปลูกกล้วยไม้แน่นเกินไป ถ้าพบต้นที่แสดงอาการควรทำลายทิ้งด้วยการเผาทำลาย แล้วฉีดพ่นด้วยสารป้องกันกำจัดรา (อุไร จิรมงคลการ, 2548) ผู้ปลูกกล้วยไม้ส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมี เพราะมีความสามารถในการยับยั้งราได้เป็นอย่างมีประสิทธิภาพ และให้ผลที่รวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีหากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน นอกจากจะทำให้เชื้อดื้อต่อยาแล้ว ยังทำให้เกิดสารตกค้างในดิน และก่อให้เกิดผลเสียกับพืชที่ปลูกและเกิดผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เสียต่อสุขภาพของเกษตรกร นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการตกค้างในธรรมชาติและในผลิตภัณฑ์ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการปฏิเสธผลิตภัณฑ์ได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาหาวิธีทางธรรมชาติมาใช้ในการยับยั้งรา เพื่อจะได้ไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างในธรรมชาติและไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพได้

วิธีทางชีวภาพที่นิยมใช้กันส่วนมากคือ ใช้จุลินทรีย์ที่สามารถต้านการเจริญของราได้ แบคทีเรียซึ่งเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งนั้นมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ โดยพบว่าสารที่ผลิตออกมาบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของราได้หลายสายพันธุ์ และสารที่สร้างโดยแบคทีเรียชนิดเดียวกันอาจมีด้วยกันหลายประเภท ซึ่งสารแต่ละประเภทอาจเป็นสารที่มีความจำเพาะต่อราบางชนิดหรือสามารถยับยั้งราได้หลายชนิด และการสร้างสารแต่ละชนิดของแบคทีเรียนั้นจะขึ้นกับภาวะที่เลี้ยงแบคทีเรีย ถ้าต้องการสารชนิดใดจะต้องเลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้แบคทีเรียสามารถสร้างสารนั้นออกมาได้มากที่สุด ดังนั้นจะเห็นได้ว่าภาวะในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง โดยปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราแต่ละชนิดมีหลายปัจจัย เช่น ชนิดของอาหาร, pH, อุณหภูมิ และการให้อากาศ (Moita และคณะ, 2005)

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่อุดมสมบูรณ์ในจังหวัดกาญจนบุรี และพบว่าแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ได้แก่ M10, M15, M22, M23, M25, M26, M27, N1, N3 และ N9 สามารถยับยั้งราหลายชนิดได้ (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) ในงานวิจัยนี้จะนำแบคทีเรียเหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในกล้วยไม้ และเพื่อให้แบคทีเรียที่คัดเลือกสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดจะนำมาแปรผันปัจจัยต่างๆสำหรับการเจริญและการผลิตสาร ได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญของเชื้อ, และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมแล้วจะนำไปเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Curvularia lunata*

2. หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ซึ่งก่อโรคแอนแทรกโนส และโรคใบจุดในกล้วยไม้ รวมทั้งเพื่อแยกและทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ดังกล่าว

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) ซึ่งนับเป็นวงศ์ใหญ่ที่สุดในบรรดาพืชที่มีดอกทั้งหลาย กล้วยไม้มีลักษณะเด่นที่ดอกมีรูปร่างสวยงาม สะดุดตา ในบางสกุล บางชนิด มีกลิ่นหอม ซึ่งช่วยทวีความน่าสนใจได้มากยิ่งขึ้น ธรรมชาติของกล้วยไม้นั้นมักจะออกดอกปีละครั้ง และบานในช่วงสั้นๆ จึงต้องพัฒนาลักษณะต่างๆ เพื่อช่วยล่อแมลง ซึ่งเป็นการช่วยให้พืชสามารถดำรงเผ่าพันธุ์ต่อไปได้ (เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล, 2552)

ประเทศไทยเป็นศูนย์กลางของแหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิค ซึ่งมีกล้วยไม้อยู่ในป่าตามธรรมชาติไม่ต่ำกว่า 1,000 ชนิด แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญงอกงามของกล้วยไม้มาก และกล้วยไม้ป่าที่พบในภูมิภาคแถบนี้มีลักษณะเด่นที่เป็นเอกลักษณ์ของตนเอง พบได้ทั้งที่อยู่บนต้นไม้อื่น หรือพบได้ตามหน้าผาภูเขาสูงและบนพื้นดิน กล้วยไม้ที่พบในเมืองไทยมีความหลากหลายทั้งทางด้านรูปร่าง สีสันของดอก ทรงต้น ใบ ถิ่นที่อยู่และสภาพภูมิอากาศ ดังนั้นกล้วยไม้จึงเป็นพืชที่น่าสนใจสำหรับบรรดานักเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ และผู้ที่ชื่นชม ด้วยความงามของกล้วยไม้นี้เองจึงมีการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้อย่างจริงจัง โดยการสร้างเรือนกล้วยไม้อย่างง่ายๆเพื่อเพาะกล้วยไม้จำหน่ายในเชิงธุรกิจ มีการปลูกเลี้ยงอย่างครบวงจรตั้งแต่การผสมเกสร การเพาะเนื้อเยื่อ การเลี้ยงลูกกล้วยไม้ การเลี้ยงต้นกล้วยไม้ จนกระทั่งตัดดอกส่งขายทั้งในและต่างประเทศ (เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล, 2551)

กล้วยไม้กับเศรษฐกิจของประเทศ

พืชพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับมีความสำคัญทางเศรษฐกิจต่อประเทศ ซึ่งในบรรดาไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมดนั้นกล้วยไม้จัดเป็นไม้ประดับตัดดอกเมืองร้อนที่นำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นอันดับหนึ่ง โดยอุตสาหกรรมกล้วยไม้ของประเทศได้เจริญก้าวหน้าอย่างมาก และกล้วยไม้ไทยเป็นสินค้าที่ได้รับความนิยมในต่างประเทศ ทำให้มีมูลค่าการส่งออกขยายตัวอย่างต่อเนื่องตลอดช่วงทศวรรษที่ผ่านมา (เจตน์ มีญาณเยี่ยม, 2009) ประเทศไทยมีผลผลิตกล้วยไม้รวมทั้งประเทศ

ประมาณ 26,100 ตัน/ปี ผลผลิตเฉลี่ย 1.8 ตัน/ไร่ (สกุลหวาย) ปริมาณที่ใช้ในประเทศ 12,975 ตัน และเพื่อการส่งออกปริมาณ 13,125 ตัน (ตลาดกลางสินค้าเกษตรแห่งประเทศไทย, 2554) ในปี 2553 ตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนพฤศจิกายน พบว่ามีการส่งออกกล้วยไม้เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีมูลค่ากว่า 600 ล้านบาท (Export of Thailand Classified by Commodity, 2554) โดยประเทศไทยได้ส่งกล้วยไม้ไปสู่ประเทศเนเธอร์แลนด์มากที่สุด รองลงมาคือ ญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกา คิดเป็น 19.79%, 12.64% และ 12.13% ของกล้วยไม้ส่งออกทั้งหมด ตามลำดับ (Export of Thailand Classified by Commodity, 2554)

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์เป็นหน่วยงานหลักในการดำเนินงานโครงการผลักดันการส่งออกกล้วยไม้ ซึ่งโครงการดังกล่าวจะสิ้นสุดในปี 2553 กระทรวงเกษตรฯ เสนอยุทธศาสตร์การแข่งขันกล้วยไม้ไทยในตลาดโลก พ.ศ.2554-2559 เพื่อช่วยพัฒนาและส่งเสริมอุตสาหกรรมกล้วยไม้ของไทยให้รักษาความสามารถในการแข่งขันในตลาดโลกได้อย่างยั่งยืน (เปรม ณ สงขลา, 2553) โดยเน้นการดำเนินงานใน 5 ยุทธศาสตร์ (บริษัท BSNcenter จำกัด, 2554) คือ

1. เพิ่มศักยภาพการแข่งขันด้านการตลาดส่งออก เน้นศึกษาวิเคราะห์เพื่อแก้ไขปัญหาอุปสรรคที่มีต่อการส่งออกในตลาดเดิม

2. การรณรงค์ประชาสัมพันธ์กล้วยไม้ไทยทั้งในประเทศและต่างประเทศ และส่งเสริมการส่งออกกล้วยไม้ที่มีคุณภาพได้มาตรฐานส่งออกและตรวจสอบย้อนกลับได้

3. ส่งเสริมการผลิตกล้วยไม้คุณภาพ การพัฒนาและสร้างสรรค์นวัตกรรม โดยการส่งเสริมงานวิจัยเชิงบูรณาการระหว่างเกษตรกร ผู้ประกอบการและนักวิจัย

4. การพัฒนาองค์กร ซึ่งจะเป็นการส่งเสริมการสร้างคลัสเตอร์กล้วยไม้ที่เข้มแข็ง และสร้างศูนย์กลางการให้บริการกล้วยไม้แบบเบ็ดเสร็จ

5. ส่งเสริมการใช้กล้วยไม้ภายในประเทศและต่างประเทศเพิ่มขึ้น อีกทั้งให้มีการสนับสนุนการส่งออกตามภารกิจและศักยภาพด้วย

หากดำเนินการตามแผนยุทธศาสตร์ฯ จะทำให้ประเทศไทยมีรายได้จากการส่งออกกล้วยไม้เพิ่มขึ้น เกษตรกรผู้ผลิตกล้วยไม้ รวมทั้งธุรกิจต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมกล้วยไม้จะได้รับผลประโยชน์เพิ่มมากขึ้น (เปรม ณ สงขลา, 2553)

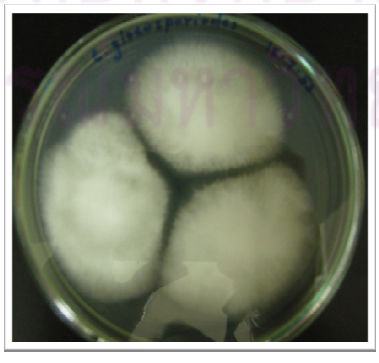
โรคของกล้วยไม้และการแพร่ระบาดของโรค

ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งสำหรับเกษตรกรในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้คือ มีโรคซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย รา ไวรัส และแมลงรบกวนอยู่เสมอ ซึ่งโรคของกล้วยไม้ส่วนใหญ่พบว่ามีสาเหตุมาจากรา ทำให้ดอกกล้วยไม้เกิดความเสียหายไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ผลผลิตด้อยคุณภาพ สร้างปัญหาแก่เกษตรกรผู้ผลิตกล้วยไม้ตัดดอกส่งออกเป็นอย่างมาก ซึ่งราที่พบว่าก่อให้เกิดปัญหากับกล้วยไม้มีรายละเอียดดังนี้

Colletotrichum gloeosporioides

C. gloeosporioides เป็นราที่มีรายงานว่าเป็นหนึ่งในเชื้อสาเหตุของโรคที่มีปัญหาด้านการแพร่กระจายไปทั่ว โดยติดเชื้อในพืชได้มากกว่า 1,000 ชนิด (Phoulivong และคณะ, 2010) สามารถก่อโรคในกล้วยไม้ได้หลายสายพันธุ์ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอาร์เจนตินา (Cabrera และคณะ, 2003) ราชนิดนี้เป็นราที่ก่อให้เกิดโรคในกล้วยไม้เขตร้อน การติดเชื้อโดยรา *C. gloeosporioides* เริ่มจากการงอกของสปอร์และแทรก germ tube เข้าไปในกล้วยไม้ (Oh และคณะ, 1999) ราชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรคได้หลายชนิด เช่น โรคลำต้นเน่า, ต้นอ่อนแห้งเหี่ยว และโรคแอนแทรคโนส เป็นต้น (Munoz และคณะ, 2009) โรคแอนแทรคโนส เป็นคำที่ได้รับมาจากภาษากรีกมีความหมายว่าถ่านหิน (coal) ซึ่งหมายถึงอาการของโรคที่จะเห็นเป็นสีดำบนพืช (Isaac, 1992) ราชนิดนี้จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota, Class Sordariomycetes, Order Phyllachorales, Family Phyllachoraceae ลักษณะทั่วไปของราคือ สร้างเส้นใยฝังอยู่ในผิวพืช เส้นใยไม่มีสี หรือสีน้ำตาลอ่อน จนถึงน้ำตาลแก่ (Than และคณะ, 2008) ในจานอาหารแข็งราชนิดนี้จะสร้างเส้นใยสีขาว ดังแสดงในรูปที่ 2.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 รา *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหารแข็ง PDA (Potato-Dextrose Agar) บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน

นอกจากนี้ *C. gloeosporioides* ยังก่อให้เกิดโรคเกสรดำ หรือเส้าเกสรดอกไม้ (Black anther or column blight) ในกล้วยไม้สกุลหวาย อาการของโรคจะปรากฏที่บริเวณต่างๆ ของกล้วยไม้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เส้าเกสร และบนกลีบดอก อาการที่เกิดบนส่วนเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียที่อยู่รวมกันในส่วนกลางดอกที่เรียกว่า เส้าเกสร เป็นจุดแผลสีเทาอมดำ ยุบตัวจากเนื้อเยื่อปกติ และมีขอบแผลสีน้ำตาลเข้มรอบแผลมักเกิดบนดอกที่บานแล้ว ต่อมา 2-3 วันแผลเหล่านั้นจะแห้งติดอยู่ที่เส้าเกสร ส่วนอาการที่เกิดบนกลีบดอกจะเกิดแผลจุดสีน้ำตาลกลมหรือรี ตรงกลางแผลจะมีสีน้ำตาลเข้ม บนกลีบดอกชั้นนอก กลีบดอกชั้นในแผลจะเกิดเดี่ยวๆ เห็นได้ชัดเจนบนดอกที่บานเต็มที่แล้ว โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุล มอคคารา และลูกผสมสกุลหวายสีขาว

ส่วนโรคแอนแทรคโนสนั้นก็มีสาเหตุเกิดจากเชื้อ *C. gloeosporioides* เช่นเดียวกัน สามารถเกิดได้กับกล้วยไม้ทุกชนิด ลักษณะอาการที่เกิดจากการติดราชนิดนี้ เกิดได้ทั้งที่ปลายใบและกลางใบ โดยจะเป็นแผลวงกลมสีน้ำตาลอมแดงหรือสีน้ำตาลไหม้ ซึ่งขยายออกไปเป็นแผลใหญ่เห็นเป็นวงกลมซ้อนกันหลายชั้น เนื้อเยื่อที่เป็นแผลบุ๋มลึกลงไปต่ำกว่าระดับผิวใบเล็กน้อย ดังรูปที่ 2.2 กล้วยไม้บางชนิดมีขอบแผลเป็นเนื้อเยื่อสีเหลืองล้อมรอบแผล บางชนิดแผลมีขอบสีน้ำตาลเข้มกว่าด้านในและไม่มีขอบแผลสีเหลือง และเมื่อทิ้งไว้นานเนื้อเยื่อของแผลจะแห้งบางผิดปกติ ขนาดของแผลมีขนาดแตกต่างกัน

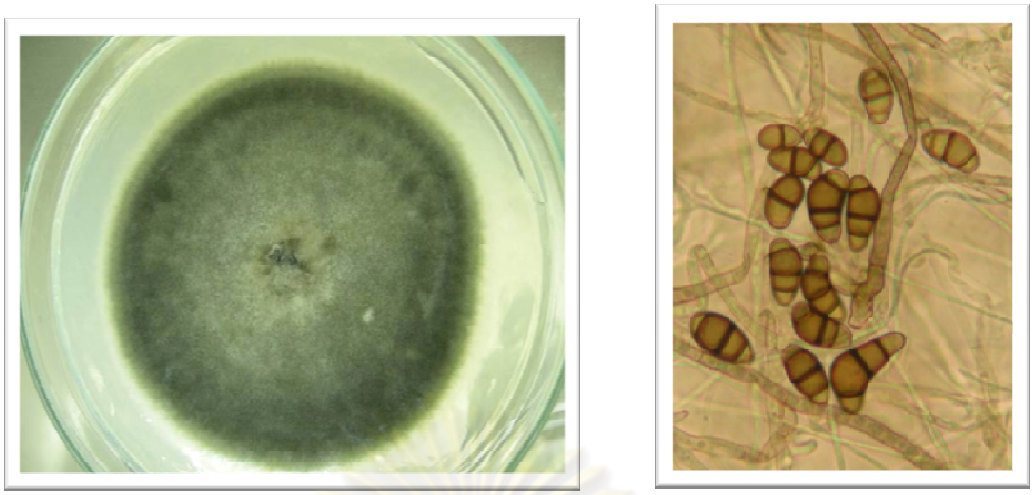
การแพร่ระบาดของโรคนี้สามารถเกิดได้ตลอดปี มักระบาดได้ดีในโรงเรือนที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนจะระบาดมากกว่าฤดูอื่นๆ ในฤดูหนาวหากมีหมอกและน้ำค้างมากจะระบาดรุนแรงในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายสีขาวมากกว่าสีอื่น และรานี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศเขตร้อนชื้น และพบมากในโรงเรือนกล้วยไม้ที่อับลม อบอ้าว การถ่ายเทอากาศไม่ดี หรือการพรางแสงในโรงเรือนไม่เหมาะสม กล้วยไม้ได้รับแสงแดดมากเกินความต้องการจะทำให้เซลล์พืชอ่อนแอ เชื้อเข้าทำลายได้ง่ายยิ่งขึ้น และราจะปลิวไปตามลม กระเด็นไปกับน้ำที่ใช้รด หรือละอองฝนที่ตก (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2554)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.2 โรคแอนแทรคโนส สาเหตุเกิดจากเชื้อ *C. gloeosporioides*
(ที่มา : http://www.bloggang.com/data/radiergummi/picture/1225286788.jpg)

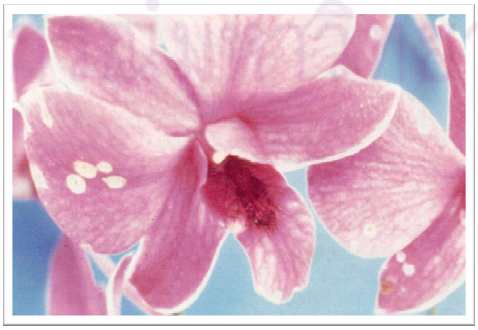
Curvularia lunata

C. lunata เป็นราที่อยู่ในกลุ่ม *Curvularia* sp. พบได้มากกว่า 8 ชนิด และสามารถแยกได้จากรากและเมล็ดของพืช (Watanabe, 2002) ส่วนมากพบในดิน และก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในพืชและคน (Brunskole และคณะ, 2009) สำหรับในพืชก่อให้เกิดโรคใบไหม้, ใบจุด และเมล็ดไหม้ (Prom และคณะ, 2003) ลักษณะของราจะมีเส้นใยสีดำ (Brunskole และคณะ, 2008; Brunskole และคณะ, 2009) ที่เกิดจากการสร้างเมลานินซึ่งช่วยให้ราทนกับสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ เช่น สารพิษต่างๆ, รังสียูวี, รังสีเอ็กซ์, รังสีแกมมา, อุณหภูมิสูงหรือต่ำมากๆ และเอนไซม์ไฮโดรไลติก เป็นต้น (Taborda และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังพบเม็ดสีนี้ในโครงสร้างแอพเพรสซอเรียม (appressorium) ที่เป็นส่วนประกอบของสปอร์ของรา (Deising และคณะ, 2000) ซึ่งช่วยให้สปอร์เกาะบนพื้นผิวของพืชได้ดี และทำให้เส้นใยของราสามารถเจาะเข้าสู่เนื้อเยื่อของพืชได้ และทำให้พืชเกิดโรคได้ต่อไป (Plonka และ Grabacka, 2006) ราชนิดนี้เดิมจัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycetes หรือ mitosporic fungi (Collins และคณะ, 2002) ซึ่งเป็นราที่ยังไม่พบการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ แต่ในปัจจุบันจัดอยู่ใน Phylum Ascomycota, Class Euascomycetes, Order Pleosporales, Family Pleosporaceae ลักษณะการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA จะมีสีดำดังแสดงในรูปที่ 2.3 (ซ้าย) และสปอร์ของราชนิดนี้มีสีน้ำตาลอ่อน รูปร่างตรงหรือโค้ง ปลายเรียว มีสี่เซลล์ โดยเซลล์ตรงกลางมีขนาดใหญ่สุด มีสีเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย ดังแสดงในรูปที่ 2.3 (ขวา)



รูปที่ 2.3 ลักษณะของเส้นใย (ซ้าย) และสปอร์ (ขวา) รา *C. lunata* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

Curvularia spp. ก่อให้เกิดโรคดอกสนิมหรือจุดสนิม (Flower rusty spot) ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย เช่น หวายขาว หวายชมพู (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2554) อาการของโรคจะปรากฏบนกลีบดอกกล้วยไม้ เริ่มแรกจะเป็นจุดขนาดเล็กสีน้ำตาลอมเหลือง และภายใน 2-3 วัน เมื่อจุดขยายใหญ่ขึ้นจะมีสีเข้มคล้ายสีสนิม ลักษณะแผลค่อนข้างกลมมีขนาดตั้งแต่ 0.1 – 0.3 มิลลิเมตร ตรงกลางแผลเป็นจุดสีน้ำตาลแดง (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ส่วนอาการบนใบพบน้อยและไม่รุนแรงในระดับที่ก่อให้เกิดความเสียหาย (สมบัติ รักไพบูลย์สมบัติ, 2540) การแพร่ระบาดของโรคมักเกิดจากสภาพพื้นที่อับร้อนชื้น ทำให้ราเข้าทำลายได้ง่าย โดยเฉพาะช่วงที่มีฝนตกชุกติดต่อกันเป็นเวลานานๆ หรือมีน้ำค้างลงจัด และมักเกิดโรคกับต้นที่ปลูกด้วยกาบมะพร้าว ทำให้การแพร่ระบาดของโรคเกิดได้รวดเร็ว ทั่วทั้งสวนกล้วยไม้และบริเวณใกล้เคียง (อุไร จิรมงคลการ, 2548)



รูปที่ 2.4 โรคดอกสนิมหรือจุดสนิม สาเหตุเกิดจากเชื้อ *C. lunata*
(ที่มา : http://www.212cafe.com/freewebboard/view.php?user=babyinlove&id=1)

การป้องกันและกำจัดราที่ก่อโรคในกล้วยไม้

กลุ่มงานโรคพืช กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช กรมส่งเสริมการเกษตร (2554) ได้แนะนำการป้องกันและกำจัดการเกิดโรคไว้ดังนี้

1. หมั่นตรวจดูแลสวนกล้วยไม้ให้สะอาดอย่างสม่ำเสมอ อย่าปล่อยให้ดอกกล้วยไม้บานโรยคาต้น เพราะจะเป็นแหล่งสะสมรา ซึ่งเป็นสาเหตุให้ราเข้าทำลายได้ง่าย
2. ใช้ต้นพันธุ์ที่ปราศจากโรคไปปลูก เพราะกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย, มอคคารา บางสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรค
3. การพรางแสงกล้วยไม้ไม่เหมาะสมกับกล้วยไม้ ทำให้กล้วยไม้ได้รับแสงแดดจัดมากเกินไป จนทำให้ใบเกิดการอ่อนแอ ใบไหม้ (sunburn) ราสามารถเข้าทำลายได้ง่าย
4. เชื้อราจะอยู่ในน้ำที่กักขังไว้เพื่อใช้รดกล้วยไม้ด้วย ดังนั้นจึงควรฆ่าเชื้อเป็นครั้งคราว โดยใช้คลอรีนผงในอัตรา 5 กรัม ต่อน้ำ 400 ลิตร กวนให้ทั่วแล้วปล่อยทิ้งไว้ค้างคืน จนหมดกลิ่นคลอรีน แล้วจึงนำน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วไปใช้
5. เก็บรวบรวมใบ ดอก ต้น เศษซากพืชที่เป็นโรค นำไปเผาทำลาย เพื่อไม่ให้เชื้อราแพร่ระบาดได้ต่อไป
6. พ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืชกลุ่ม คลอโรทาโลนิล (Chlorothalonil) อัตราส่วน 20 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ โพรคลอราท (Prochloraz Mn) อัตราส่วน 20 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร ในช่วงฤดูฝนพ่นสารดังกล่าวถี่กว่าปกติ เพื่อป้องกันโรคเส้าเกสรหรือเกสรดำ
7. พ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืชกลุ่ม ไอโปรไดโอน (Iprodione) อัตราส่วน 30 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร ในช่วงฤดูฝน สลับกับสารกลุ่ม แดปเทน (Captan) อัตราส่วน 40 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร หรือนำต้นพันธุ์กล้วยไม้ไปแช่สารเคมีดังกล่าวก่อนปลูกเพื่อป้องกันโรค

วิธีทางชีวภาพ

แม้ว่าจะมีการแนะนำให้เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้สารเคมีในการกำจัดจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช (Khan และคณะ, 2001) แต่การใช้สารเคมีเพื่อกำจัดจุลินทรีย์ก็มีปัญหาต่างๆ มากมาย เช่น จุลินทรีย์มีการพัฒนาเพื่อต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ และยังเกิดสารพิษตกค้างในปริมาณที่มากขึ้น

เรื่อยๆ (Chapin และคณะ, 2006) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการใหม่ๆ เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการควบคุมโรคที่เกิดขึ้น โดยมีเทคโนโลยีต่างๆที่จำเป็นสำหรับการควบคุมโรค ประกอบไปด้วย 3 วิธี คือ การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปรปักษ์กับเชื้อที่ก่อโรคในพืช, การประยุกต์หาสารที่เป็นยาต้านจุลชีพที่มีอยู่ตามธรรมชาติ และการทำให้ผลผลิตปราศจากโรค (Mari และคณะ, 2003) ซึ่งทั้งหมดนี้ก็คือ วิธีทางชีวภาพ วิธีนี้ถือได้ว่าเป็นวิธีที่มีความสำคัญสำหรับการจัดการกับโรคที่เกิดกับพืชเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีประโยชน์ต่างๆ มากมาย เช่น ลดการใช้สารเคมีสำหรับการควบคุมโรคพืช, ช่วยรักษาระบบนิเวศน์ และยังเป็นประโยชน์ต่อระบบเศรษฐกิจอีกด้วย (Bardas และคณะ, 2009)

การควบคุมโรคที่เกิดบนพืชสามารถใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปรปักษ์กับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคบนพืชได้ (Cook และ Baker, 1983) โดยมีตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วิธีทางชีวภาพเพื่อยับยั้งการเกิดโรคในพืช เช่น การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *Botrytis cinerea* ซึ่งก่อให้เกิดโรคราสีเทา (gray mold) โดยแยกแบคทีเรียได้จากดิน และต้นองุ่น พบว่ามี 26 สายพันธุ์ที่สามารถควบคุมการติดเชื้อ *B. cinerea* บนใบองุ่นได้ เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและชีวภาพแล้วพบว่ามี 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens* PTA-268 และ PTA-CT2, *Bacillus subtilis* PTA-271, *Pantoea agglomerans* PTA-AF1 และ PTA-AF2, และ *Acinetobacter lwoffii* PTA-113 and PTA-152 และหลังจากนำไปทดสอบกับเชื้อ *B. cinerea* มีเพียงสายพันธุ์ PTA-AF1 and PTA-CT2 เท่านั้น ที่เป็นปรปักษ์กับเชื้อ *B. cinerea* (Trotel-Aziz และคณะ, 2008)

อีกตัวอย่างหนึ่งของวิธีทางชีวภาพ คือ การใช้สารสกัดจากพืชร่วมกับจุลินทรีย์ โดยเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดจากพืชทั้งหมด 66 ชนิด พบว่า สารที่สกัดได้จากกระเทียม (*Allium sativum*) และหัวหอม (*Allium cepa*) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Pythium aphanidermatum* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคเน่าคอดิน (dumping off) ในพริกได้ดีที่สุดอ เมื่อนำสารที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วย gas chromatography mass spectroscopy (GC-MS) พบว่ามีสารทั้งหมด 22 ชนิด และเมื่อนำสารที่สกัดได้จากกระเทียมและหัวหอม, รา *Trichoderma viride*, และแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* มาทดสอบกับรา *P. aphanidermatum* ทั้ง *in vitro* และ *in vivo* โดยทดสอบทั้งแบบชนิดเดียวและรวมกันทุกชนิดแล้ว พบว่าการรวมกันของสารทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับแบบเดี่ยวและแบบคู่ โดยจะช่วยป้องกันการเกิดโรคเน่าคอดินในพริกได้ถึง 8.3% และลดการเกิดโรคได้ถึง 17% อีกทั้งยังช่วยเพิ่มการเจริญของพริก ส่งผลทำให้พริกมีผลผลิตที่ดีมากขึ้นถึง 146 กรัมต่อต้น (Muthukumar และคณะ, 2010)

จากตัวอย่างที่ได้กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า การใช้จุลินทรีย์ หรือสารที่ผลิตได้จากธรรมชาติ สามารถนำไปยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้ โดยไม่ต้องพึ่งสารเคมีในการกำจัดรา อีกทั้งยังส่งผลดีต่างๆมากมาย เช่น การใช้วิธีทางชีวภาพไม่เพียงแต่กำจัดราที่ก่อโรคในพืช แต่ยังช่วยป้องกัน และไม่เป็นพิษต่อผลผลิตทางเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในบางกรณีการใช้วิธีทางชีวภาพยังสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตได้อีกด้วย การใช้จุลินทรีย์เพื่อป้องกันและควบคุมราที่ก่อโรคในพืชนั้น อาจไม่จำเป็นต้องใช้ตัวจุลินทรีย์โดยตรง แต่สามารถนำสารที่ได้จากการผลิตโดยจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ได้

สารต่อต้านราที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์

สารที่มีฤทธิ์ในการยังยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชนั้น สามารถผลิตได้จากพืชและจุลินทรีย์ โดยสารที่ได้จากจุลินทรีย์อาจมีด้วยกันได้หลายประเภท ซึ่งสารแต่ละประเภทอาจมีคุณลักษณะที่แตกต่างกัน หรือทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้ต่างกัน ตัวอย่างของสารที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีหลายประเภท เช่น เพปไทด์ (peptide), ไลโพเพปไทด์ (lipopeptides), โปรตีน (protein) และสารระเหย (volatile) เป็นต้น

ตัวอย่างของสารที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น ออรีโอเบสิดิน เอ (Aureobasidin A) หรือ AbA ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่สร้างโดย *Aureobasidium pullulans* R106 ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้ได้ ซึ่งราเหล่านี้ ได้แก่ *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *P. expansum*, *Botrytis cinerea* และ *Monilinia fructicola* โดยยับยั้งการสร้างสปอร์, ลดอัตราการงอกของ germ tube และเส้นใยของรา อีกทั้งยังกระตุ้นให้ germ tube และเส้นใยของรามีรูปร่างที่ผิดปกติ (Liu และคณะ, 2007a)

อีกตัวอย่างหนึ่ง ได้แก่ สารอิทูลินซึ่งผลิตจาก *Bacillus pumilus* HY1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่คัดแยกได้จากซอสถั่วเหลืองของประเทศเกาหลี อิทูลินเป็นไลโพเพปไทด์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่สร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน (aflatoxin) ซึ่งได้แก่ *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* โดยราทั้งสองชนิดนี้มักปนเปื้อนอยู่ในการหมักถั่วเหลือง (Cho และคณะ, 2009) หรือเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านรา (antifungal peptide) หรือ AFP ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 51 หมู่ สร้างโดย *A. giganteus* สามารถยับยั้งการเติบโตของเส้นใย *A. niger* โดยเข้าจับที่ผนังเซลล์ของราซึ่งมีไกลโคโปรตีนเป็นส่วนประกอบ แล้วทำให้พลาสมาเมมเบรนของราเกิดรูรั่ว (Theis และคณะ, 2005)

นอกจากนี้ยังได้แก่ สารประเภทสารระเหยที่ผลิตจากกลุ่มของแบคทีเรียซึ่งประกอบไปด้วย *Bacillus* spp. 4 สายพันธุ์ และ *Paenibacillus* spp. ที่แยกได้จากปมรากดินที่ปลูกแตงกวา สามารถยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคได้ โดยทำให้ลักษณะรูปร่างของเส้นใยราผิดปกติ, ลดการสร้างสเคลอโรเตียม (sclerotium) ของรา *Sclerotinia sclerotiorum* ในเพลทที่ปิดสนิท และต้านการสร้างเม็ดสีของราหลายชนิด ได้แก่ *Ascochyta citrullina*, *Alternaria solani*, และ *Alternaria brassicae* สารระเหยจากจุลินทรีย์นี้ สามารถนำไปเป็นตัวกลางในการแพร่กระจายในดิน เพื่อลดการก่อให้เกิดโรคได้ (Liu และคณะ, 2008)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารต้านราที่ได้จากจุลินทรีย์

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราแต่ละชนิดมีหลายปัจจัย เช่น ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น, ระยะเวลาในการบ่ม, ชนิดของอาหาร, pH, อุณหภูมิ และการให้อากาศ (Genckal และ Tari, 2006) ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับปัจจัยสำหรับแบคทีเรียที่มีผลต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา มีดังต่อไปนี้

Moita และคณะ (2005) พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* CCMI 355 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27-34 องศาเซลเซียส ที่ pH6 จะเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์ แต่ถ้าเลี้ยงในภาวะที่เป็นเบส และมีการให้อากาศอย่างมาก ที่อุณหภูมิ 28-34 องศาเซลเซียส จะเป็นภาวะที่เหมาะสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อ หรือถ้าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH8 แบบไม่ให้อากาศจะเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการตานการเจริญของราหลายชนิด เช่น *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma* sp, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii* และ *Trichoderma virgatum* ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ภาวะต่างๆ มีผลต่อการเจริญและผลิตสารของเชื้อได้แตกต่างกัน

Lowe และคณะ (1997) ได้หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสาร ascosteroside โดยเชื้อ *Ascotricha amphitricha* ซึ่งสารนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา พบว่ากลูโคส (glucose), ซอร์โบส (sorbose) และอิโนซิทอล (inositol) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตสาร ascosteroside การละลายของออกซิเจนก็มีผลต่อความสามารถในการผลิตสารนี้ด้วย และ *A. amphitricha* สามารถผลิต ascosteroside ได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส และผลิตได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

Fickers และคณะ (2008) พบว่า *B. subtilis* ATCC6633 สามารถสร้าง mycosubtilin ได้มากขึ้น 30 เท่า เมื่อลดอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อจาก 37 เป็น 25 องศาเซลเซียส ซึ่ง mycosubtilin เป็นสารที่ช่วยในการสังเคราะห์ไลโปเพปไทด์ของอิทูลิน ซึ่งเป็นสารที่ต้านการเจริญของราที่ก่อโรคได้หลายชนิด

Bacillus sp.

กลุ่มของ *Bacillus* พบได้ทั่วไปในดิน มีลักษณะเป็นท่อนต่อกันเป็นสายยาว ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ และมีหลายสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา (Leifert และคณะ, 1995; Caldeira และคณะ, 2006) ตัวอย่างของสารต้านราที่ผลิตโดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ได้แก่ อิทูริน (iturin), เซอแฟคติน (surfactin), บาซิโลมัยซิน (bacillomycin), เฟนไกซิน (fengycin) และบาซิซูบิน (bacisubin) โดยทั้งหมดที่ยกตัวอย่างมานี้สามารถไปทำลายโครงสร้างของรา ทำให้ราไม่สามารถเจริญได้ (Liu และคณะ, 2007b; Mizumoto และ Shoda, 2007; Chen และคณะ, 2009) ตัวอย่างงานวิจัยสำหรับสารต้านการเจริญของราที่สร้างโดยพวก *Bacillus* มีดังนี้

Kavitha และคณะ (2005) พบว่าเชื้อ *Bacillus polymyxa* สายพันธุ์ VLB16 สามารถสร้างสารต้านการเจริญของราได้ และเมื่อทำสารที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธี gel filtration โดยใช้ Sephadex-G-200 พบว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Pyricularia grisea* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งก่อให้เกิดโรคไหม้และโรคกาบใบแห้งในข้าว ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าโปรตีนที่เป็นสารต้านการเจริญของรานั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรุนแรงกับลักษณะของราโดยเกิดการบวมขึ้นที่เส้นใย และเมื่อวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) แล้วพบว่าโปรตีนมีขนาด 37 kDa จากการวิเคราะห์เพิ่มเติมพบว่าโปรตีนชนิดนี้สามารถทนความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที, ทนต่อการถูกย่อยสลายโดย pronase และทนต่อการถูกทำลายด้วย detergent เช่น SDS, hexa ecyl trimethyl ammonium bromide (HDTMA) และ Tween-20 ได้

Bacillus subtilis สองสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากดิน เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบไปด้วยไคติน (chitin) พบว่าสามารถสร้างสารที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค *Fusarium oxysporum* ได้ โดย *B. subtilis* W113 และ *B. subtilis* W118 สร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านราได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบไปด้วยไคติน 1.75 และ 0.75% ตามลำดับ สารที่ได้จาก

แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถทนต่อความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และสารดังกล่าวมีผลต่อการเจริญของรา เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าทำให้เกิดการบวมพองของเส้นใยรา *F. oxysporum* เป็นอย่างมาก (San-Lang และคณะ, 2002)

Bacillus amyloliquefaciens DGA14 ที่คัดแยกได้จากผิวของกล้วยหอมดิบสามารถสร้างสารออกมาต้านราที่ก่อให้เกิดโรคเน่าในต้นกล้วย ซึ่งได้แก่ *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae*, และ *Fusarium verticillioides* เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียร่วมกับราที่ก่อโรคในอาหารเหลวพบว่าแบคทีเรียเกาะกับราที่ก่อโรค ทำให้มีผลต่อการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ในอาหารเหลว และเมื่อบ่มต่อเป็นเวลา 2 วัน เชื้อ *B. amyloliquefaciens* DGA14 ก็ยังคงมีชีวิตอยู่ได้ และสามารถลดการเกิดโรคเน่าในต้นกล้วยได้ดีกว่าตัวควบคุมและยาฆ่าแมลง เช่น มาเนป (Maneb) อีกด้วย (Alvindia และ Natsuaki, 2009)

ดังตัวอย่างที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราได้หลากหลายชนิด และส่วนใหญ่มักจะเป็นพวกโปรตีน ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดจะมีกลไกในการยับยั้งการเจริญของราได้ต่างกันแล้วแต่ชนิดของโปรตีนนั้นๆ แต่ส่วนใหญ่มักทำให้เกิดรูที่เยื่อบุผิวและฆ่าเซลล์, ไปยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์, ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก, ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน, ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ในเซลล์ ฯลฯ (Brogden, 2005) ส่งผลให้เกิดการบวมพองและมีการแตกแขนงของเส้นใยราผิดปกติ เป็นต้น

กลไกการควบคุมโรคพืชโดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp.

จากงานวิจัยต่างๆ ที่ผ่านมา เมื่อศึกษากลไกการควบคุมโรคพืชโดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. สามารถสรุปได้คร่าวๆ ดังนี้

1. ผลิตเอนไซม์หรือโปรตีน ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืช ตัวอย่างของเอนไซม์เช่น จากรายงานของ Chang และคณะ (2007) พบว่า *Bacillus cereus* QQ308 สามารถสร้างเอนไซม์ต่างๆ ประกอบไปด้วยเอนไซม์ไคติเนส, เอนไซม์ไคโตซาเนส และเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่สามารถเข้าไปทำลายผนังเซลล์ของราได้ โดยเอนไซม์ที่กล่าวมานั้นสามารถยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, และ *Pythium ultimum* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในพืชได้ และจากตัวอย่างที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ พบว่า *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ MET0908 ที่คัดแยกได้จากดินสามารถสร้างโปรตีนที่มีฤทธิ์ไปยับยั้ง

การเจริญของ *Colletotrichum lagenarium* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในแตงโม ราชนิดนี้คัดแยกได้จากใบ ลำต้น และผลของแตงโมที่เป็นโรคแอนแทรคโนส โปรตีนที่ได้จาก MET0908 โดยการนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วย 30% แอมโมเนียมซัลเฟต, ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography แล้ววิเคราะห์ขนาดของโปรตีนบริสุทธิ์ด้วย SDS–PAGE พบว่าโปรตีนมีขนาดเท่ากับ 40 kDa โปรตีนชนิดนี้สามารถทนอุณหภูมิได้ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และสามารถต้านการเจริญของราได้หลายชนิด และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) พบว่าโปรตีนเกาะอยู่บนผนังเซลล์ของ *C. lagenarium* และเมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N ของโปรตีนบริสุทธิ์ พบว่ามีลำดับกรดอะมิโน Ser-Lys-Ile-x-Ile-Asn-Ile-Asn-Ile-x-Gln-AlaPro-Ala-Pro-x-Ala และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแล้วไม่พบว่ามีโปรตีนชนิดนี้อยู่ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่พบนี้ เป็นโปรตีนชนิดใหม่ (Kim และ Chung, 2004)

2. สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) หรือสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (biosurfactant) เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าไปทำลายพืชได้ (Ramey และคณะ, 2004; Morikawa, 2006) สารลดแรงตึงผิวเป็นโครงสร้างที่เกิดจากแบคทีเรียสังเคราะห์โมเลกุลต่างๆ ซึ่งมีสมบัติทางเคมีหลากหลายมารวมกัน และช่วยในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้ โดยตัวอย่างของงานวิจัยที่แบคทีเรียสร้างสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ เช่น *B. subtilis* สายพันธุ์ 20B ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองในประเทศอินเดีย สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิว โดยสมบัติของสารลดแรงตึงผิวนี้สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง, pH และความเข้มข้นเกลือที่สูงได้ เป็นเวลา 5 วัน และยังสามารถยับยั้งการงอกของเส้นใยราได้หลายชนิด ได้แก่ *Chrysosporium indicum*, *Alternaria burnsii*, *Fusarium oxysporium* และ *Rhizoctonia bataticola* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในพืช (Joshi และคณะ, 2008) เป็นต้น

3. กระตุ้นความต้านทานโรคให้กับพืช (Induced Systemic Resistance, ISR) โดยแบคทีเรียจะไปกระตุ้นให้มีสารบางอย่างออกมา เพื่อช่วยป้องกันการเกิดโรคในพืชได้ เช่น *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IN937a และ *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ IN937b สามารถต้านการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้หลายชนิด ได้แก่ *Sclerotium rolfsii* และ *Ralstonia solanacearum* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในมะเขือเทศ และ *S. rolfsii* และ *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในพริกไทย ในการทดลองได้ทดสอบราที่ก่อโรคในพืชเพียงอย่างเดียว, ทดสอบแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดกับราที่ก่อโรค และชุดควบคุม คือ ไม่ใส่ทั้งแบคทีเรียและราก่อโรค พบว่ามี

เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase (SOD)) และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase (PO)) สร้างขึ้นในปริมาณมากที่สุดในชุดการทดลองที่มีแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดกับราที่ก่อโรค และมีปริมาณมากกว่าชุดทดสอบที่มีแต่ราก่อโรคเพียงอย่างเดียวถึง 25 -30% และในชุดควบคุมมีปริมาณของ SOD และ PO ต่ำที่สุด จึงสรุปได้ว่าการป้องกันการเกิดโรคในพืชเกิดจาก IN937a และ IN937b ไปกระตุ้นการสร้าง SOD และ PO เพื่อไปต้านการเจริญของราที่ก่อโรค (Jetiyanon, 2007)

4. ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth-promoting) ตัวอย่างเช่น *B. subtilis* สายพันธุ์ UK-9 คัดแยกได้จากดิน สามารถควบคุมการเกิดโรคใบจุด (Alternaria leaf spot) ในต้นมัสตาร์ด (mustard) ที่เกิดจากรา *Alternaria* ได้ การสร้างสารที่ต้านการเจริญของราโดย *B. subtilis* เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเส้นใยและสปอร์ของรา โดยเกิดการแตกแขนงที่ผิดปกติ, การแตกสลายของผนังเซลล์, ลดการงอกของสปอร์บนใบพืช และส่งเสริมการเจริญของพืช ทำให้สามารถควบคุมการเกิดโรคใบจุดในต้นมัสตาร์ดและกระตุ้นการเจริญของพืชได้อย่างดีอีกด้วย เนื่องจากเมื่อปลูกต้นมัสตาร์ดในโรงเรือนเป็นเวลา 60 วัน พบว่าต้นมัสตาร์ดที่ใส่ *B. subtilis* สายพันธุ์ UK-9 ลงไปมีการเจริญได้ดีกว่า โดยมีรากและปลายยอดของต้นมากกว่าต้นมัสตาร์ดควบคุมที่ไม่ได้ใส่ *B. subtilis* สายพันธุ์ UK-9 ดังนั้นอาจบอกได้ว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ UK-9 ช่วยทำให้ต้นมัสตาร์ดเจริญได้ดีขึ้นและช่วยยับยั้งราที่ก่อโรคได้ (Sharma และ Sharma, 2008) และจากรายงานของ Ghosh และคณะ (2003) พบว่า *Bacillus circulans* DUC1, *Bacillus fimus* DUC2, และ *Bacillus globisporus* DUC3 ซึ่งคัดแยกได้จากดิน สามารถไปกระตุ้นการงอกของรากและปลายยอดของต้นคาโนล่า (canola) โดยวัดจากน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้งของต้นที่ปลูกในกระถางพบว่าต้นที่ใส่ *Bacillus* มีน้ำหนักมากกว่าต้นที่ไม่ได้ใส่ เป็นต้น

การทำโปรตีนบริสุทธิ์และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ได้

โปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชที่ได้มาจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ส่วนมากจะหลั่งออกนอกเซลล์ ดังนั้นจึงสามารถนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาใช้ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ซึ่งการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์มีหลายขั้นตอน เช่น การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การทำโครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน (ion-exchange chromatography) และการทำโครมาโทรกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) จากนั้นจะต้องตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน ซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี เช่น SDS–PAGE หรือการตรวจสอบด้วย

วิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบโปรตีนไม่เสียสภาพ (native gel electrophoresis) (Kim และ Chung, 2004) เป็นต้น

ตัวอย่างของการทำบริสุทธิ์ของโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืช เช่น Leelasuphakul และคณะ (2006) พบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถสร้างสารออกมาได้ 2 ชนิด คือ ยาปฏิชีวนะและ β-1,3-glucanase ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pyricularia grisea* and *Rhizoctonia solani* ซึ่งก่อให้เกิดโรคไหม้ และโรคกาบใบแห้งในข้าวได้ β-1,3-glucanase ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, โครมาโทรกราฟีบนดีอีเออีเซฟาเซล (DEAE-Sephacel) และโครมาโทรกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน และพบว่า β-1,3-glucanase มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 38.9 เท่า และมีแอคทิวิตีคงเหลือ 27.6% เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ β-1,3-glucanase ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบโปรตีนไม่เสียสภาพ พบว่ามีขนาดเท่ากับ 95.5 kDa และเมื่อตรวจสอบด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ามี 2 ขนาด คือ 64.6 และ 32.4 kDa หลังจากการทำ β-1,3-glucanase ให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของโปรตีนบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *P. grisea* and *R. solani* มีค่าเท่ากับ 12.5 และ 6.25 mU/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Liu และคณะ (2010) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ EDR4 ที่คัดแยกมาจากเมล็ดข้าวสาลี สามารถสร้างโปรตีน (E2) ไปยับยั้งการเจริญของเส้นใยราหลากหลายชนิด ได้แก่ *Fusarium graminearum*, *Macrophoma kuwatsukai*, *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, *Botrytis cinerea* และ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) ได้ โปรตีน E2 ได้รับการทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 30-70% และพบว่ามีโปรตีนเหลือทั้งหมด 82.2 มิลลิกรัม, เมื่อแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแรงไม่ชอบน้ำ (hydrophobic-interaction chromatography) พบว่ามีโปรตีนเหลือทั้งหมด 28.1 มิลลิกรัม, เมื่อผ่านโครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน มีโปรตีนเหลือทั้งหมด 6.1 มิลลิกรัม, และเมื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเจลเพอมีเอชันโครมาโทกราฟี (gel permeation chromatography (GPC)) และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 377 kDa และ 39.1 kDa ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าโปรตีนนี้มีหลายสับยูนิต เมื่อนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วย nano-ESI-MS/MS (Q-TOF2) System แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ไม่พบว่าเหมือนกับโปรตีนชนิดใด จึงจัดว่าโปรตีน E2 ที่ได้นั้นเป็นโปรตีนชนิดใหม่ เมื่อนำโปรตีนไปทดสอบกับเส้นใยของ *Ggt* แล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าเส้นใยของ *Ggt* มีอาการผิดรูปอย่างรุนแรง เช่น เส้นใยบวมและมีรูปร่างผิดปกติไปจากเดิม

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่อุดมสมบูรณ์ในจังหวัดกาญจนบุรี และพบว่าแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ได้แก่ M10, M15, M22, M23, M25, M26, M27, N1, N3 และ N9 สามารถยับยั้งราได้หลายชนิด (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) สำหรับงานวิจัยนี้จะนำแบคทีเรียเหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส และโรคดอกสนิมหรือจุดสนิมในกล้วยไม้ตามลำดับ โดยทดสอบแบคทีเรียกับราบนอาหารแข็ง PDA แล้วคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด จากนั้นจะนำมาแปรผันปัจจัยต่างๆ สำหรับการเจริญและการผลิตสาร ได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญของเชื้อ, และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมแล้วจะนำไปเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และโครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน จากนั้นทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราด้วยสารที่แยกได้ โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ (minimum inhibition concentration, MIC), ตรวจสอบผลของโปรตีนที่แยกได้ที่มีต่อสปอร์ของราที่ก่อโรค ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และพิสูจน์เอกลักษณะของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ของบริษัท Whatman International CO., Ltd., England
2. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (microscope) รุ่น UNILUX-12 ของบริษัท Kyowa, Tokyo, Japan
4. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) รุ่น JSM – 5410LV, Japan
5. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magatic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA
6. เครื่องแก้ว ขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร ของบริษัท Pyrex, USA
7. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง (Sonicator) รุ่น SONOREX RX 100 ของบริษัท Bandelin Electronic, Germany
8. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunwick Scientific, USA
9. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบใช้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylab TH thermo-block SLTDB-120 ของบริษัท Seoulin Bioscience, Korea
10. เครื่องโครมาโทกราฟี รุ่น Bio-Rad Biologic LP และ Bio-Rad model 2110 fraction collector ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
11. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Forma Scientific, USA
12. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น J-301 ของบริษัท Backman, Germany

16. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries instruments, USA
17. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer instruments, USA
18. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (digital pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 ของบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore
19. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic , USA และรุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer ของบริษัท Perkin Elmer instruments, USA
20. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 ของบริษัท Eyela, Japan
21. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 90X15 มิลลิเมตร ของบริษัท Hycon plastic, USA
22. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore, USA
23. ชุดอุปกรณ์ทำ agarose gel electrophoresis ได้แก่ ถาดเทเจล ถังใส่สารละลาย แผ่นหวี และแหล่งจ่ายไฟ ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan
24. ชุดอุปกรณ์ทำ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) รุ่น MiniPROTEAN II และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น PAC 300 ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
25. ชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ (gel documentation) และโปรแกรม Quantity One 4.4.1 ของบริษัท Bio -Rad Laboratories, USA
26. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan
27. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ของบริษัท Forma Scientific, USA
28. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 ของบริษัท ISSCO, USA
29. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
30. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany
31. ถุงไดแอลิซิส ขนาดรู 3500 MWCO รุ่น JE123986 บริษัท SnakeSkin®, USA
32. ผ้าขาวบางปลอดเชื้อ
33. ไมโครปิเปตและทิปรุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 มิลลิลิตร ของบริษัท Nichiryo, Japan

34. หลอดใส่ตัวอย่าง (cuvette) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA
35. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB14, รุ่น W760 ของบริษัท Memmert Co.,Ltd, Germany และชนิดที่ประกอบเข้ากับเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ รุ่น digital water bath SB-1000 ของบริษัท Eyela, Japan ซึ่งต่อเข้ากับ
    - เครื่องทำความเย็น รุ่น CCA-110 ของบริษัท Eyela, Japan
    - เครื่องดูดอากาศ รุ่น A-35 ของบริษัท Eyela, Japan
36. อุปกรณ์นับเซลล์ (haemacytometer) ของบริษัท Schott Duran, Germany
37. Steel Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3CHOOH) ของบริษัท Merck, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
3. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Merck, Germany
4. ไกลซีน (glycine) ของบริษัท Amersham Biosciences, Sweden
5. คลอโรฟอร์ม (chloroform) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
6. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ของบริษัท Ajax Finechem, New Zealand
7. ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
8. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
9. ผงสกัดจากมันฝรั่ง (potato dextrose) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
10. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
11. โซเดียมโดเดซิสซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
13. ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (DEAE Bio-gel A) ของบริษัท Bio -Rad Laboratories, USA
14. ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (Dimethyl formamide) ของบริษัท Merck, Germany
15. นิสทาทิน (nsytatin) ของบริษัท Sigma, USA
16. แบคโตเปบโทน (Bacto peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
17. บิวทานอล (butanol) ของบริษัท Merck, Germany
18. บีโนมิล (Benomyl) ของบริษัท Sigma, USA
19. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ของบริษัท Sigma, USA
20. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Productora the Agar SA, Chili
21. ผงบลาโนส ซีเอ็มซี (Blanose CMC) ของบริษัท Bronson and Jacobs International, ประเทศไทย
22. ทู-เมอร์แคบโตเอธานอล(2-mercaptoethanol) ของบริษัท Sigma, USA
23. สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ ของบริษัท Merck, Germany
24. สีคูแมสซีบริลเลียนท์บลูจี-250 (coomassie brilliant blue G-250) ของบริษัท Fluka, Switzerland
25. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) ของบริษัท Fluka, Switzerland
26. อีเทอร์ (ether) ของบริษัท J.T. Baker, USA

27. อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) ของบริษัท Himedia, India
28. อาหารสำเร็จรูป TSB (tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
29. เอทานอล (ethanol) ของบริษัท J.T. Baker, USA
30. เอทาลีนไดเอมีนเตตระแอซิติกแอซิด (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) ของบริษัท Sigma, USA
31. เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium Bromide) ของบริษัท Sigma, USA
32. เอนไซม์ตัดจะเพาะ *Eco*RI ของบริษัท New England Biolab, USA
33. แอมพิซิลลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai Tesque, Japan
34. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ของบริษัท BDH, England
35. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) ของบริษัท Sigma, USA
36. เฮกเซน (hexane) ของบริษัท Merck, Germany
37. 1 kb DNA ladder ของบริษัท Fermentus, USA
38. 2% Bis-Acrylamide ของบริษัท Amersham Biosciences, Sweden
39. 40% Acrylamide ของบริษัท Amersham Biosciences, Sweden
40. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท SibsEnzyme, Russia
41. IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) ของบริษัท Promega, USA
42. pGEM® -T และ pGEM® -T Easy Vectors ของบริษัท Promega, USA
43. SeaKem® LE Agarose For gel electrophoresis ของบริษัท Bio Science Rockland, USA
44. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท BioExcellence, Thailand
45. TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) ของบริษัท USB Corporation, UK
46. Trizma base (Tris[hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA
47. Tween 80 ของบริษัท Merck, Germany
48. X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β- D-galactoside) ของบริษัท Fermentus, USA
49. ชุดโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง ของบริษัท Fermentus, USA
50. ชุดวัดปริมาณโปรตีน Bio-Rad Protein Assay ของบริษัท Bio -Rad Laboratories, USA
51. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Wxtraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
52. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep kit ของบริษัท Qiagen, Germany

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน ในจังหวัดกาญจนบุรี โดย คงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549) ซึ่งได้แก่ไอโซเลต M10, M15, M22, M23, M25, M26, M27, N1, N3 และ N9 เป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้หลายชนิด

3.3.2 ราโรคพืช

รา *C. gloeosporioides* ได้รับมาจากกองโรคพืช กรมวิชาการเกษตร และ *C. lunata* ได้รับมาจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส และโรคดอกสนิมหรือจุดสนิมในกล้วยไม้ ตามลำดับ

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรีย ได้แก่ อาหารเหลว Nutrient Broth (NB), อาหารเหลว Luria Broth (LB), อาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) และอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ)

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับรา ได้แก่ อาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) และอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 5 และ 6 ตามลำดับ)

3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.5.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

เขี่ยแบคทีเรียมาเลี้ยงลงบนอาหารแข็งเอียง NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วยกลีเซอรอล 15% (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.2 การเก็บรักษารา

เลี้ยงราบนอาหารแข็งเอียง PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วเททับด้วยกลีเซอรอล 15% ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ดีที่สุด

3.6.1 การเตรียมแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ

นำแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ไอโซเลต M10, M15, M22, M23, M25, M26, M27, N1, N3 และ N9 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.6.2 การเตรียมรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ที่ก่อโรคในกล้วยไม้

เลี้ยง *C. gloeosporioides* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นขูดเส้นใยของราบนอาหารแข็ง PDA ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

เลี้ยง *C. lunata* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ล้างสปอร์ของราด้วย 0.1% Tween 80 (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) แล้วกรองเส้นใยผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้นที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนับจำนวนสปอร์ของราด้วย haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400X และเจือจางสปอร์ของราให้มีจำนวน $2x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

นำราแต่ละชนิดปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้ทั่วจานอาหารแข็ง PDA แล้วปล่อยไว้ให้แห้งเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมไว้สำหรับศึกษาการยับยั้งราบนอาหารแข็งต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ เพื่อคัดเลือกไอโซเลตที่สามารถยับยั้งราทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตต่างๆ จากข้อ 3.6.1 มาขีดเป็นเส้นตรงบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว (ข้อ 3.6.2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้ววัดขอบเขตการยับยั้ง เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งราทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด

3.7 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *C. lunata*

นำแบคทีเรียที่คัดเลือก ได้จากข้อ 3.6.3 ไปหาภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา โดยแปรผัน 1) ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ อาหารเหลว NB, อาหารเหลว LB และอาหารเหลว TSB, 2) pH ของอาหารที่ pH ต่างๆ ได้แก่ pH6, pH7, pH8 และ pH9, และ 3) อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยหาระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อให้สร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราได้ดีที่สุด ในทุกการแปรผัน

3.7.1 การแปรผันหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสม

นำแบคทีเรียไอโซเลตที่ได้คัดเลือกจากข้อ 3.6.3 มา 1 ลูปใส่ลงในอาหารเหลว NB อาหารเหลว LB และอาหารเหลว TSB ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.5 แล้วดูดเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว NB อาหารเหลว LB และอาหารเหลว TSB ตามลำดับ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (1% inoculum) บ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เพื่อติดตามการเจริญของเชื้อ และปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนน้ำใสมากรองด้วยเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออก โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 – 24 ส่วนน้ำใสที่ได้นำไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion (Lewinstein และคณะ, 2005) โดยนำส่วนน้ำใสที่ได้หยดลงหลุมบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว (ข้อ 3.6.2) โดยเจาะหลุมบนอาหารแข็งด้วย steel cork borer ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางยาว 0.8 เซนติเมตร หยดสารละลายหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทั้งหมด 4

หลุม และมี 1 หลุมตรงกลางเป็นอาหารเหลว NB ซึ่งก็คือ ชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สังเกตผลการทดลอง

3.7.2 การแปรผันหา pH ของอาหารที่ pH6, pH7, pH8 และ pH9

นำแบคทีเรียไอโซเลตที่ได้คัดเลือกจากข้อ 3.6.3 มา 1 ลูปใส่ลงในอาหารเหลวที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 3.7.1 ที่ปรับ pH เป็น pH6, 7, 8 และ 9 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.5 แล้วดูดเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 3.7.1 pH6, 7, 8 และ 9 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เพื่อติดตามการเจริญของเชื้อ และปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนน้ำใสมากรองด้วยเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออก โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 – 24 ส่วนน้ำใสที่ได้นำไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.7.1 โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว (ข้อ 3.6.2) เพื่อหา pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเนื่องจากการแพร่ของสารในแต่ละจานเพาะเลี้ยงอาจไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงมีชุดควบคุมการแพร่ เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบว่าในแต่ละจานเพาะเลี้ยงแพร่ได้เท่ากันหรือไม่ โดยใช้ชุดควบคุมผลบวกได้แก่ บีโนมิล (benomyl) ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สำหรับเชื้อ *C. gloeosporioides* และนิสทาทิน (nystatin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สำหรับเชื้อ *C. lunata* โดยหยดลงบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Whatman International CO., Ltd., England) ที่วางอยู่ตรงกลางจานเพาะเลี้ยง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.3 การแปรผันหาอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส

นำแบคทีเรียไอโซเลตที่ได้คัดเลือกจากข้อ 3.6.3 มา 1 ลูปใส่ลงในอาหารเหลวที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 3.7.2 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 แล้วดูดเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 3.7.2 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เพื่อติดตามการเจริญของเชื้อ และปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนน้ำใสมากรองด้วยเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออก โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 – 24 ส่วนน้ำใสที่ได้นำไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.7.1 โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว (ข้อ 3.6.2) เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา โดยเทียบกับชุดควบคุมผลบวกเหมือนข้อ 3.7.2

3.8 การทดสอบความเสถียรของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งราซึ่งผลิตโดยแบคทีเรีย

3.8.1 การเตรียมส่วนน้ำใสจากแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3.7 ในอาหารเหลวปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยลงเชื้อ 1% inoculum จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงและกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อเตรียมส่วนน้ำใสไว้ไปทดสอบในขั้นต่อไป

3.8.2 การทดสอบความเสถียรต่อ pH

นำส่วนน้ำใสจากข้อ 3.8.1 มาปรับค่า pH ด้วย 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) หรือ 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) ให้มีค่า pH เท่ากับ 2, 4, 6, 8, และ 10 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับค่า pH กลับ

เป็นค่า pH เริ่มต้น แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.7.1 โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว (ข้อ 3.6.2) โดยเทียบกับชุดควบคุมเหมือนข้อ 3.7.2

3.8.3 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ

นำส่วนน้ำใสจากข้อ 3.8.1 มาบ่มที่อุณหภูมิ 20, 40, 60, 80, 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้จนเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.7.1 โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว (ข้อ 3.6.2) โดยเทียบกับชุดควบคุมเหมือนข้อ 3.7.2

3.9 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC: minimum inhibitory concentration) ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้

เลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3.7 ในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนน้ำใสไปทำให้เป็นน้ำแข็งเพื่อนำไปไลโอฟิไลซ์ เนื่องจากหลักการของไลโอฟิไลซ์จะเป็นการทำให้ของแข็งกลายเป็นไอภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นนำไปเสียบเข้าเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ เป็นเวลาประมาณ 8 ชั่วโมง จะได้ผงของส่วนน้ำใสแล้วละลายผงที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายที่ได้แบบลำดับส่วน แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.7.1 โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว (ข้อ 3.6.2) โดยเทียบกับชุดควบคุมเหมือนข้อ 3.7.2

3.10 การสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราทั้งสองชนิด

เนื่องจากยังไม่ทราบว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราเป็นสารชนิดใด ดังนั้นการสกัดแยกสารออกมาจึงใช้วิธีดังข้อ 3.10.2 และ 3.10.3 เพื่อทดสอบว่าวิธีใดที่สามารถสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราได้มากที่สุด

3.10.1 การเตรียมส่วนน้ำใสจากแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3.7 โดยลงเชื้อ 1% inoculum จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเตรียมส่วนน้ำใสไว้สำหรับสกัดสารในขั้นต่อไป

3.10.2 การสกัดสารด้วยตัวทำละลายต่างๆ

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.10.1 มาวัดปริมาตร แล้วเติมตัวทำละลายด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ ดังนี้ *n*-บิวทานอล, *n*-เฮกเซน, อีเทอร์ หรือ คลอโรฟอร์ม แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 นาที จำนวน 4 ครั้ง นำไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหย ชั่งน้ำหนักสารที่เหลือ จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.7.1 โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว (ข้อ 3.6.2) โดยเทียบกับชุดควบคุมเหมือนข้อ 3.7.2 นอกจากนี้ยังมีชุดควบคุมเป็นตัวทำละลายชนิดต่างๆด้วย

3.10.3 การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา

3.10.3.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงต่างๆ

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.10.1 มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้ช่วง 0-40%, 40-80%, และ 80-100% ระหว่างการตกตะกอนมีการกวนเบาๆ ตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และหลังจากเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตหมด ให้กวนเบาๆ ต่อเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟตละลายได้ดีและไปจับกับโปรตีน ทำให้เกิดการตกตะกอนโปรตีนได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นแยกตะกอนออกจากส่วนน้ำใส โดยปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนที่ได้ในแต่ละช่วงด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) โดยใช้ปริมาตรน้อยที่สุดในการละลายตะกอน ส่วนน้ำใสที่เหลือนำไปตกตะกอนในช่วงต่อไป ทำเช่นเดียวกันนี้จนครบทุกช่วงของแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นนำตะกอนที่ละลายในบัฟเฟอร์ไปลดปริมาตรน้ำโดยวิธี aquasorb ด้วยผงบลาโนส ซีเอ็มซี (Blanose CMC) เพื่อทำให้สารละลายโปรตีนเข้มข้นขึ้น และนำไปขจัดเกลือออก โดยนำโปรตีนที่ได้ใส่ในถุงไดแอลิซิส ซึ่งเตรียมได้ตาม

ข้อ 3.10.3.2 แช่ถุงไดแอลิซิสซึ่งมีโปรตีนใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ปริมาตร 1 ลิตร กวนเบาๆตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 5 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง และการขจัดเกลือในครั้งที่ 4 จะไดแอไลซ์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มีกลีเซอรอล 30% ผสมอยู่ (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) เป็นระยะเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นวัดโปรตีนที่ได้ตามวิธีในข้อ 3.10.3.3 และทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.7.1 โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว (ข้อ 3.6.2) โดยเทียบกับชุดควบคุมเหมือนข้อ 3.7.2 และเลือกลำดับช่วงการตกตะกอนโปรตีนที่ให้แอกทิวิตีมากที่สุดมาทำบริสุทธิ์ต่อไป

3.10.3.2 การเตรียมถุงไดแอลิซิส

ตัดถุงไดแอลิซิสขนาด cutoff ที่ 3,500 MW ให้มีความยาวประมาณ 10-12 เซนติเมตร โดยความยาวของถุงไดแอลิซิสจะขึ้นอยู่กับปริมาตรของสารละลายที่จะใส่ลงไปในถุง นำถุงไดแอลิซิสที่ตัดแล้วใส่ลงในEDTA 1% (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) ที่ต้มเดือดนาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 4-5 ครั้ง หรือจนกว่ากลิ่นของ EDTA จะหมด เตรียมถุงไดแอลิซิสไว้ใช้ต่อไป

3.10.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยชุด Bio-Rad Protein Assay (Bio-rad laboratories, USA) โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 800 ไมโครลิตร มาเติม protein assay dye reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 1.2-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

3.10.3.4 การทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีน

การทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีนปฏิบัติตามวิธีที่ปรับปรุงจากวิธีของ Mataragas และคณะ (2003) ดังนี้ วัดปริมาณโปรตีนและปรับความเข้มข้นโปรตีนที่จะทดสอบให้เท่ากัน

จากนั้นเจือจางโปรตีนแบบลำดับส่วนทีละสองเท่า แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งรา ด้วยวิธี agar diffusion เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.7.1 โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อรา เป้าหมายไว้แล้ว (ข้อ 3.6.2) โดยเทียบกับชุดควบคุมเหมือนข้อ 3.7.2 วัดผลเป็นค่า Arbitrary Unit (AU) คือ ส่วนกลับของความเจือจางที่สูงที่สุดที่สามารถให้ขอบเขตการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบได้ แล้วรายงานค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีนเป็น AU/มิลลิกรัมของโปรตีน (Barefoot และ Klaenhammer, 1983; Mataragas และคณะ, 2003)

3.10.3.5 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร (ion exchange chromatography)

ขยายขนาดของการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ได้โปรตีนในปริมาณมากขึ้น โดยเลี้ยงแบคทีเรียตามภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.7 และตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเลือกช่วงการตกตะกอนโปรตีนจากข้อ 3.10.3.1 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร ดังนี้ ล้างสารแขวนลอยดีอีเออี-ไบโอเจล เอ ที่แช่อยู่ใน 20% แอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆ แล้วปล่อยให้เจลตกตะกอนเอง เทส่วนน้ำใสพร้อมกับเจลละเอียดที่ยังลอยอยู่ด้านบนทิ้งไป ทำเช่นนี้หลายๆ ครั้งจนไม่มีกลิ่นแอลกอฮอล์และเจลละเอียดแขวนลอยอยู่ จากนั้นแช่เจลใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ภายใต้ภาวะสุญญากาศ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ปริมาตรเจล 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำสารละลายที่จะใช้ในการทำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ประกอบไปด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ปริมาตร 800 มิลลิลิตร, โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ปริมาตร 800 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 11) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร, 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เพื่อใช้ล้างเจลหรือคอลัมน์ไม่ให้มีโปรตีนเกาะอยู่อีก และน้ำกลั่น เพื่อใช้ปรับเจลหรือคอลัมน์ให้เป็นกลาง นำทั้งหมดนี้ไปกำจัดฟองอากาศออกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ภายใต้ภาวะสุญญากาศ เป็นเวลาประมาณ 45 นาที หรือจนกว่าฟองอากาศจะหมด จากนั้นนำเจลที่บรรจุลงในคอลัมน์ตั้งไว้ข้ามคืนมาผ่านสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆใส่สารละลายโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.10.3.1 ลงบนผิวเจลแล้วชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับดีอีเอดี-ไบโอเจล เอ (unbound fraction) ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม แล้ว

ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จะมีค่าใกล้ศูนย์ จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลออก (bound fraction) โดยใช้เกรเดียนท์ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 – 1,000 มิลลิโมลาร์ เป็นใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 แล้วเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ส่วนละ 2 มิลลิลิตร ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และรวมลำดับส่วนในแต่ละช่วงของโปรตีนที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงเข้าด้วยกัน แล้วทำสารละลายโปรตีนให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี aquasorb ด้วยผงบลาโนส ซีเอ็มซี จากนั้นรวบรวมลำดับส่วนในแต่ละช่วงของโปรตีนไปขจัดเกลือออกด้วยการนำไปใส่ในถุงไดแอลิซิสขนาด cutoff ที่ 3,500 MW ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5 ปริมาตร 1 ลิตร กวนเบาๆตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 6 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง และการขจัดเกลือในครั้งที่ 3 จะไดแอไลซ์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มีกลีเซอรอล 30% ผสมอยู่ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาตรของสารละลายโปรตีนที่ได้, วัดปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อ 3.10.3.2 และทดสอบความสามารถในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.7.1 โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว (ข้อ 3.6.2) โดยเทียบกับชุดควบคุมเหมือนข้อ 3.7.2 จากนั้นเลือกลำดับส่วนในช่วงที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนต่อไป

3.10.3.6 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ โดยการทำอิเล็กโทรโฟเรซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

นำโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ในข้อ 3.10.3.4 และสารละลายโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง (Fermentus, USA) มาทำอิเล็กโทรโฟเรซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยประกบแผ่นแก้วขนาด 8.2X10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.4X10.2 เซนติเมตร เข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร สอดอยู่ที่ขอบทั้งสองข้าง ประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล MiniPROTEAN II (Bio-Rad Laboratories, USA) เทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมตามวิธีดังนี้

- เตรียม separating gel ที่ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมสารละลายต่างๆ คือ

40% Acrylamide	2.912 มิลลิลิตร
2% Bis- Acrylamide	1.608 มิลลิลิตร

1.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH8.8 (ภาคผนวก ข หมายเลข 12)	2.50	มิลลิลิตร
10% SDS (ภาคผนวก ข หมายเลข 13)	0.10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	2.83	มิลลิลิตร

เติม TEMED 5 ไมโครลิตร และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 14) 50 ไมโครลิตร ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกัน แล้วรีบบรรจุสารผสมลงในช่องระหว่างแผ่นแก้วทันที ให้มีความสูงห่างจากปลายช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ประมาณ 5 มิลลิเมตร TEMED และแอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้เจลแข็งตัวเร็ว หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร หรือสูงเต็มแผ่นกระจก ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าเจลจะแข็งตัว ซับน้ำออก แล้วเทสารละลายผสมสแต็กกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมได้ดังต่อไปนี้

- เตรียม stacking gel ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมสารละลายต่างๆ ดังนี้

40% Acrylamide	0.48	มิลลิลิตร
2% Bis- Acrylamide	0.26	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH6.8 (ภาคผนวก ข หมายเลข 15)	1.26	มิลลิลิตร
10% SDS	50	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	2.92	มิลลิลิตร

เติม TEMED 5 ไมโครลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟล 10 เปอร์เซ็นต์ 25 ไมโครลิตร ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกัน แล้วรีบบรรจุสารผสมให้ท่วมช่องว่างที่เหลือในแผ่นแก้ว วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที หรือจนกระทั่งเจลแข็งตัวจึงดึงแผ่นพลาสติกออก นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟเรซิส จากนั้นเติมอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 16) ลงในช่องชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์มาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 5 ไมโครกรัม และผสมกับ 2X Laemmli buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 17) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยอดตัวอย่าง 45 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง และหยอดโปรตีนมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วทำอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ 200 โวลท์ เป็นเวลา 45 นาที ซึ่งสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้ว และย้อมสีโปรตีนด้วยสีคูแมสซีบลู โดยนำเจลไปแช่ในน้ำยาย้อมสี (staining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 18) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยสารละลายสำหรับล้าง

สี (destaining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 19) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน โดยในระหว่างการย้อมสีและล้างสีจะต้องเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา ประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยพิจารณาการเคลื่อนที่ของโปรตีนเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

3.11 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราของโปรตีนบริสุทธิ์

3.11.1 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC: minimum inhibitory concentration) ของโปรตีนบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้

นำโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ในข้อ 3.10.3.5 เจือจางแบบลำดับส่วน คือ กำหนดให้ความเข้มข้นมีค่าเท่ากับ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.7.1 โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว (ข้อ 3.6.2) ใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลุมโดยเทียบกับชุดควบคุมเหมือนข้อ 3.7.2

3.11.2 การตรวจสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา

เตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ราตามข้อ 3.6.2 โดยปรับให้มีความเข้มข้นสปอร์เท่ากับ $2X10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.10.3.5 โดยมีโปรตีนเท่ากับ 50 ไมโครกรัม และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 300 ไมโครลิตรด้วยอาหารเหลว PDB ทดสอบเปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่ใส่โปรตีน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการงอกของสปอร์ราด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) โดยใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.12 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

3.12.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

สังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย N3 บนอาหารแข็ง NA เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปย้อมสีแกรม, ย้อมสปอร์และศึกษารูปร่างลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี ได้แก่ ทดสอบเอนไซม์แคทาเลส โดยหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนโคโลนีของแบคทีเรีย เพื่อศึกษาว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลสได้หรือไม่, ทดสอบในอาหาร TSI (Triple Sugar Iron) เพื่อศึกษาการใช้น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลแลกโตส และน้ำตาลซูโครส และทดสอบความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์, ทดสอบความสามารถในการใช้ไนเตรต (nitrate) ด้วยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (nitrate reductrase), ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเจลาตินโดยเอนไซม์เจลาติเนส, ทดสอบความสามารถในการผลิตอินโดลจากการย่อยกรดอะมิโนทริปโตเฟนโดยเอนไซม์ทริปโตฟาเนส (tryptophanase), ทดสอบปฏิกิริยา MR – VP เพื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายกลูโคส, ทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรต (citrate) เป็นแหล่งคาร์บอน, และทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียในอาหารกึ่งเหลวกึ่งแข็ง SIM (sulfide – indole – motility)

3.12.2 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 3.6.3 บนอาหารแข็ง NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปลายทิปขนาด 100 ไมโครลิตร ขูดโคโลนีของแบคทีเรียใส่ใน 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอในส่วนน้ำใส โดยจะนำไปใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ 10F และ 1500R เป็นฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สไพรเมอร์ ตามลำดับ ซึ่งไพรเมอร์ทั้งสองมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ GAG TTT GAT CCT GGC TCA G และ AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC (Ogata และคณะ, 1997)

3.12.3 การเตรียมสารผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบของแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.12.1 เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยผสมส่วนประกอบต่างๆ เข้าด้วยกันแล้วมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ดังนี้

10X บัฟเฟอร์	5	ไมโครลิตร
10F (forward primer)	2	ไมโครลิตร
1500R (reverse primer)	2	ไมโครลิตร
สารละลายผสมของ dNTPs (ภาคผนวก ข หมายเลข 20)	2	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากข้อ 3.12.1	5	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	33	ไมโครลิตร

สารที่ผสมแล้วจะต้องอยู่บนน้ำแข็ง และผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นดูดลงแบบไม่ให้มีฟองอากาศ จากนั้นนำหลอดไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler) (Perkin Elmer instruments, USA) ที่ปรับตามโปรแกรมที่กำหนดดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Final extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่บริเวณ 16S rDNA โดยจะสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นจากดีเอ็นเอแม่แบบซึ่ง *Taq* DNA polymerase จะเป็นตัวช่วยในการต่อสายดีเอ็นเอสายใหม่ เมื่อได้จำนวนของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ในปริมาณมากแล้ว จะตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้ตามข้อ 3.12.4

3.12.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียมเจลโดยชั่งอะกาโรส 0.8 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข หมายเลข 21) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้ไมโครเวฟช่วยในการละลายเจล จนเจลละลายหมด รอให้อุ่น แล้วเทลงบนถาดสำหรับขึ้นรูปเจล จากนั้นรอเจลแข็ง นำเจลที่แข็งแล้วใส่ลงบนเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส (Mupid-2 Advance, Japan) และโหลดดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.12.2 ผสมกับ 6X loading dye โดยปรับความเข้มข้นให้เป็น 1X และใช้ 1 kb ladder (Fermentus, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน เปิดเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้าเท่ากับ 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 22) เป็นเวลา 10 นาที นำเจลที่ได้ไปแช่ในน้ำกลั่น เพื่อชะเอธิเดียมโบรไมด์ ส่วนเกินออก เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปถ่ายรูปเจลด้วยโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 (Bio-Rad Laboratories, USA)

3.12.5 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้ากับเวกเตอร์ pGEM โดยใช้ชุดสำเร็จ pGEM® -T และ pGEM® -T Easy Vectors (Promega, USA)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.12.2 มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM โดยผสมสารละลายต่างๆ ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ดังนี้

10X บัฟเฟอร์ T4 DNA Ligase	10	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ pGEM	1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.12.2 (ต้องการความเข้มข้น 70 นาโนกรัม)	8	ไมโครลิตร
เอนไซม์ T4 DNA ligase	1	ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบต่างๆ ให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเตรียมไว้สำหรับการทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. Coli* DH5 α ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.12.6 การทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5 α โดยวิธี heat shock

ทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5 α โดยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5 α ที่เก็บอยู่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที หรือจนกว่าจะละลาย จากนั้นใส่สารละลายผสมที่ได้จากข้อ 3.12.4 ทั้งหมดลงในคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5 α ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น heat shock ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิเป็น 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตรลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารเหลวทิ้งให้เหลืออาหารเหลวปริมาตรประมาณ 100 ไมโครลิตร กระจายเซลล์ให้ทั่วอาหารเหลวจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 23) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้นและนำไปตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของแบคทีเรียต่อไปในข้อที่ 3.12.6

3.12.7 การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์

การคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอของแบคทีเรียจะคัดเลือกโคโลนีสีขาวจากข้อ 3.12.5 แล้วใช้ปลายไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเลือกโคโลนีสีขาวจากเพลทนี้ แล้วใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยโคโลนีมาครึ่งโคโลนีใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำหลอดไปให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ส่วนน้ำใสที่ได้จะใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะผสมส่วนประกอบต่างๆ เข้าด้วยกันให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ดังนี้

10X บัฟเฟอร์	5	ไมโครลิตร
10F (forward primer)	2	ไมโครลิตร

1500R (reverse primer)	2	ไมโครลิตร
สารละลายผสมของ dNTPs	2	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้	10	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	1	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	28	ไมโครลิตร

สารที่ผสมแล้วจะต้องอยู่บนน้ำแข็ง และผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นดูดลง แบบที่ไม่ให้มีฟองอากาศ จากนั้นนำหลอดไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ปรับตามโปรแกรมที่กำหนดไว้ในข้อ 3.12.2 จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.12.3

3.12.8 การสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยวิธีแอลคาไลน์ไลซิส (Alkaline lysis)

เลี้ยง *E. coli* DH5 α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.12.6 ในอาหารเหลว LB ซึ่งผสมแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้องเทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 รอบ เติมสารละลายที่ 1 (ภาคผนวก ข หมายเลข 24) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อกระจายเซลล์ให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นเติมสารละลายที่ 2 (ภาคผนวก ข หมายเลข 25) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที โดยกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 3 นาที จากนั้นเติมสารละลายที่ 3 (ภาคผนวก ข หมายเลข 26) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที โดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนน้ำใสใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมเอทานอล 2 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง รอให้ตะกอนแห้ง แล้วละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นเติม RNase A ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ 3.12.3 และเมื่อพบว่า *E. coli* DH5 α ใดที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด จะนำโคโลนีของ *E. coli* นั้นไปสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข หมายเลข 27) ต่อไป

3.12.9 การสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany)

เลี้ยง *E. coli* DH5 α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.12.6 ในอาหารเหลว LB ซึ่งผสมแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้องเทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 รอบ กระจายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนน้ำใสใส่ใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง เพื่อกำจัดส่วนใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ หรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บสารละลายพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.12.10 การตรวจสอบพลาสมิดว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียอยู่ โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

การตรวจสอบในขั้นตอนนี้ทำขึ้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าพลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 3.12.8 มีดีเอ็นเอของแบคทีเรียแทรกอยู่ในพลาสมิดจริง สามารถทำได้โดยผสมส่วนประกอบต่างๆ ให้มีปริมาตร 15 ไมโครลิตร ดังนี้

10X บัฟเฟอร์	1.5	ไมโครลิตร
พลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.12.8	5	ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ	7.5	ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบต่างๆ เข้าด้วยกัน แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.12.3 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.12.11 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

นำสารละลายพลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.12.8 ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA โดยใช้บริการของบริษัท 1^{M} Base (ประเทศมาเลเซีย) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ด้วยโปรแกรม Blastn ซึ่งโปรแกรมนี้จะช่วยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อดูว่าแบคทีเรียที่ต้องการพิสูจน์เอกลักษณ์นี้ เป็นแบคทีเรียชนิดใด หรือเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการค้นพบ

3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีดังต่อไปนี้

3.13.1 สถิติพรรณนา (Descriptive statistics) ตัวอย่างเช่น การคำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.13.2 สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน (Covarience) ตัวอย่างเช่น ทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตรวจสอบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT (Duncan's New Mutiple Rang Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ดีที่สุด

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ไปขีดลงบนอาหารแข็งที่มีเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* พบว่า *C. gloeosporioides* ถูกยับยั้งด้วยแบคทีเรีย N3, N1, M22 และ M26 โดยแบคทีเรีย N3 สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.5 มิลลิเมตร, แบคทีเรีย N1 และ M22 สามารถยับยั้งรานี้ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.0 มิลลิเมตร, และแบคทีเรีย M26 สามารถยับยั้งได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.0 มิลลิเมตร ส่วน *C. lunata* ถูกยับยั้งได้ด้วยแบคทีเรีย M27, M26, M22, N3 และ M25 โดยแบคทีเรีย M27 สามารถยับยั้ง *C. lunata* ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.5 มิลลิเมตร, แบคทีเรีย M26 และ M22 สามารถยับยั้งได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.0 มิลลิเมตร, และแบคทีเรีย N3 และ M25 สามารถยับยั้งได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.5 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรีย N3 ไปศึกษาต่อ เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ดี

ตารางที่ 4.1 แสดงบริเวณที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata*

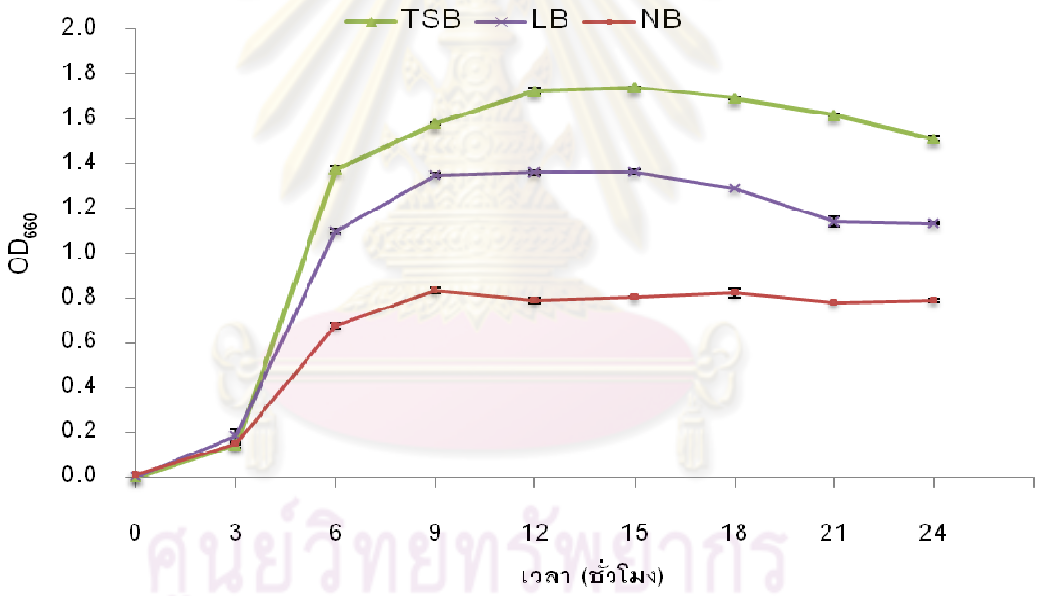
เชื้อ	รัศมีของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	C. lunata	*C. gloeosporioides*
N1	4.0	10.0
N3	4.5	13.5
N9	0.0	0.0
M10	4.0	5.0
M15	3.5	5.0
M22	5.0	10.0
M23	3.5	3.0
M25	4.5	3.0
M26	5.0	9.0
M27	5.5	6.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *C. lunata*

4.2.1 การแปรผันหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสม

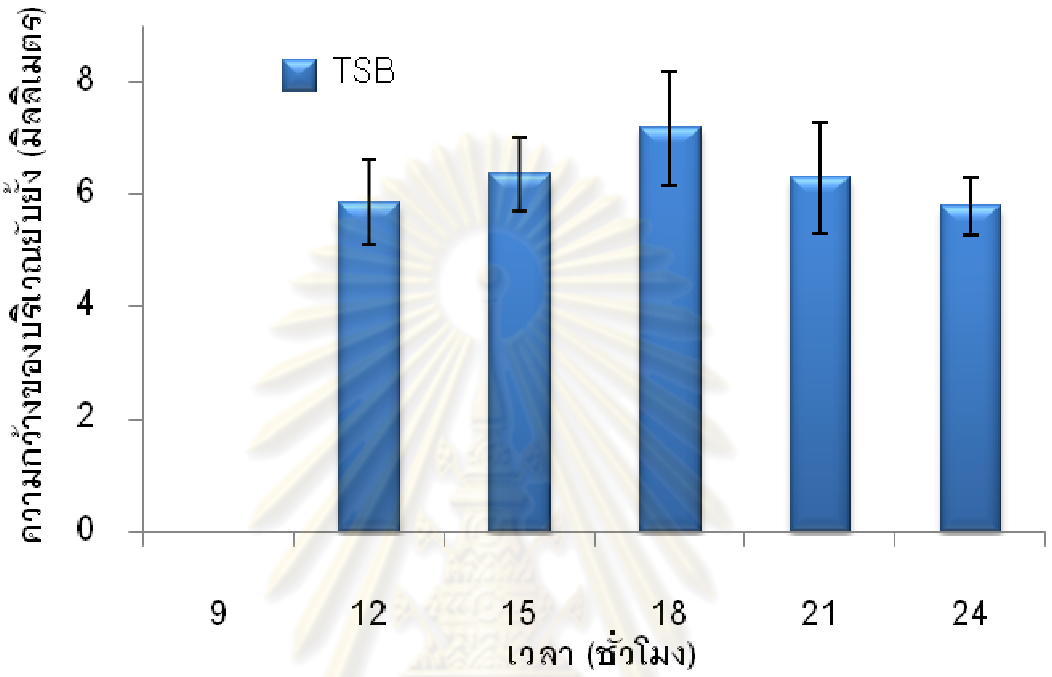
นำแบคทีเรีย N3 ที่สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ดีที่สุด ไปหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียและการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา ผลการแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า เมื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรียทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวัด OD ที่ 660 นาโนเมตร ในทุกอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น แบคทีเรีย N3 เริ่มเข้าสู่ stationary phase ในชั่วโมงที่ 9 โดยในอาหารเหลว TSB มีการเจริญของเชื้อดีกว่าเมื่อเลี้ยงใน NB และ LB ประมาณ 1.3 – 2.6 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย N3 ในอาหารเหลว TSB, LB, และ NB ที่เวลาต่างๆ

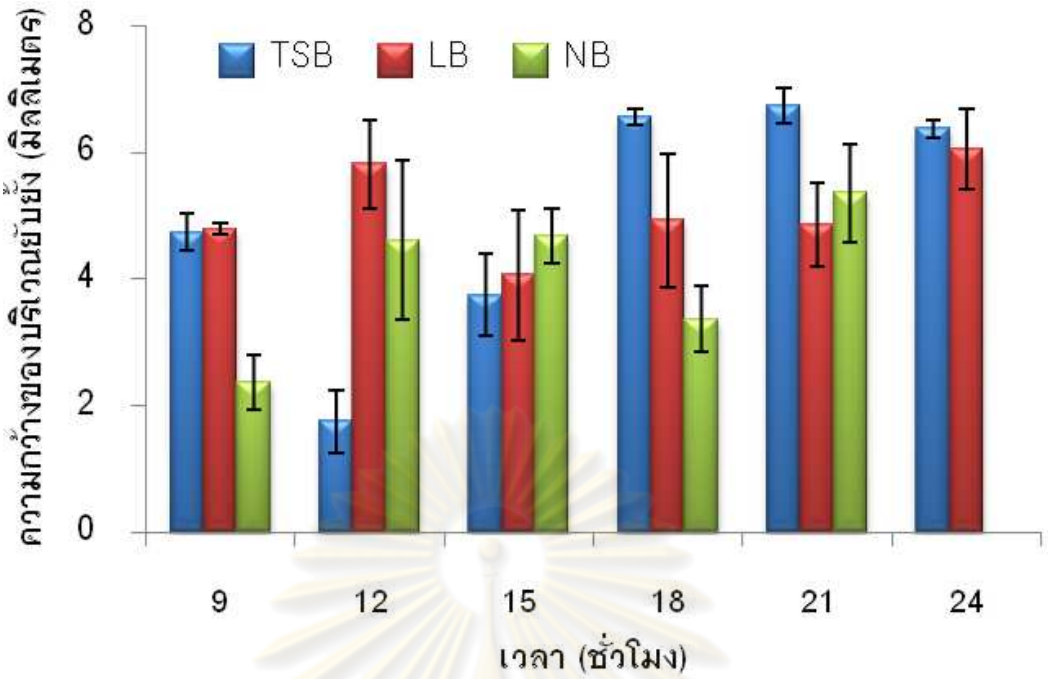
การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราทั้งสองชนิดด้วยวิธี agar diffusion โดยเจาะหลุมบนอาหารแข็งที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว จากนั้นนำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ไปปั่นเหวี่ยงและกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออก หยดส่วนน้ำใสลงในหลุมหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารเหลว บ่มจานเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลว TSB สามารถยับยั้งการเจริญของรา

C. gloeosporioides ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และยับยั้งได้ดีที่สุดที่ชั่วโมงที่ 18 โดยมีค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.19 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.2) ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB และ NB ไม่พบการยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิด

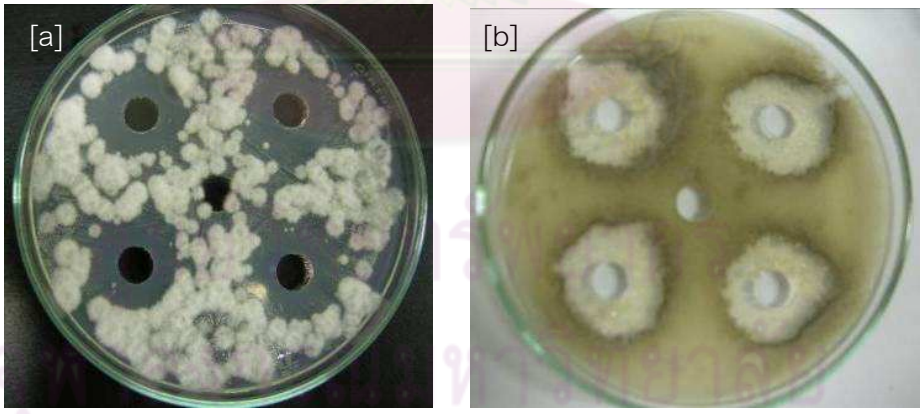


รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย N3 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ในชั่วโมงที่ 9 – 24

ส่วนความสามารถในการยับยั้งรา *C. lunata* นั้น แสดงในรูปที่ 4.3 โดยพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลว TSB สามารถยับยั้งราได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 และยับยั้งได้ดีที่สุดที่ 21 ชั่วโมง โดยมีค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.75 มิลลิเมตร น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลว LB สามารถยับยั้งรา *C. lunata* ได้ดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมง โดยมีค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.06 มิลลิเมตร และน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลว NB สามารถยับยั้งราได้ดีที่สุดที่ 21 ชั่วโมง โดยมีค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 5.37 มิลลิเมตร จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย N3 ในอาหารเหลวชนิดต่างๆ พบว่าอาหารเหลว TSB เหมาะสมที่สุด เนื่องจากแบคทีเรียสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดได้ดีที่สุดในอาหารชนิดนี้ ตัวอย่างบริเวณยับยั้งราทั้งสองชนิดโดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย N3 แสดงในรูปที่ 4.4



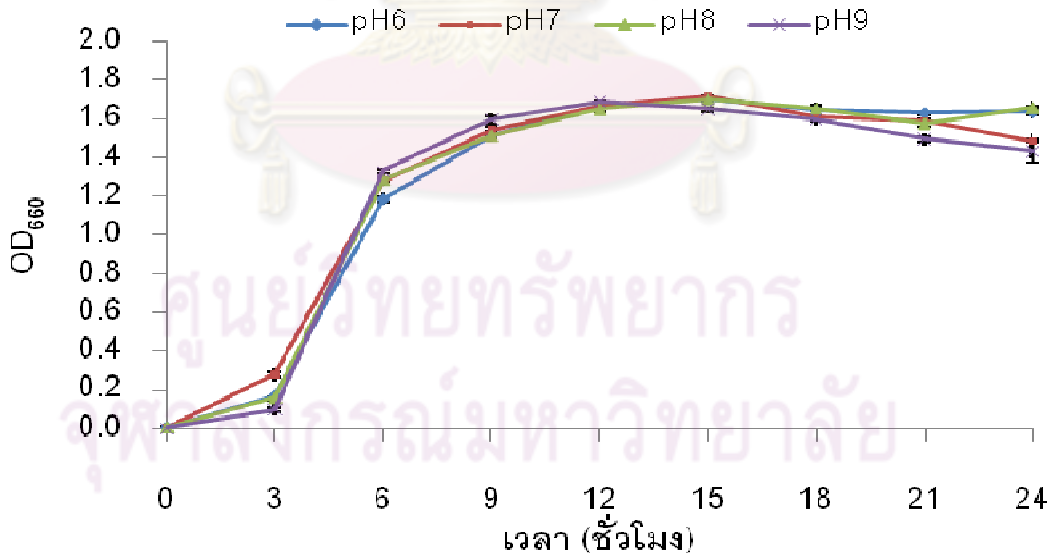
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย N3 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB, NB และ TSB ในชั่วโมงที่ 9 – 24



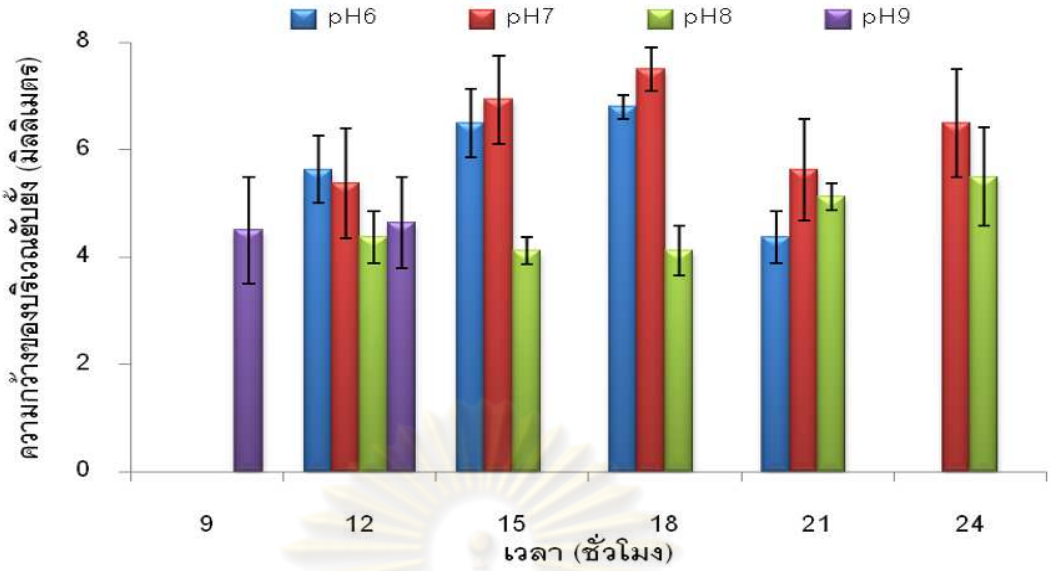
รูปที่ 4.4 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* [a] และ *C. lunata* [b] โดยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลว TSB ที่ 18 และ 21 ชั่วโมง ตามลำดับ (หมายเหตุ: บริเวณหลุมรอบนอกคือ ชุดทดลองที่มีส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ และหลุมกลางคือ อาหารเหลว TSB)

4.2.2 การแปรผัน pH ของอาหารที่ pH6, pH7, pH8 และ pH9

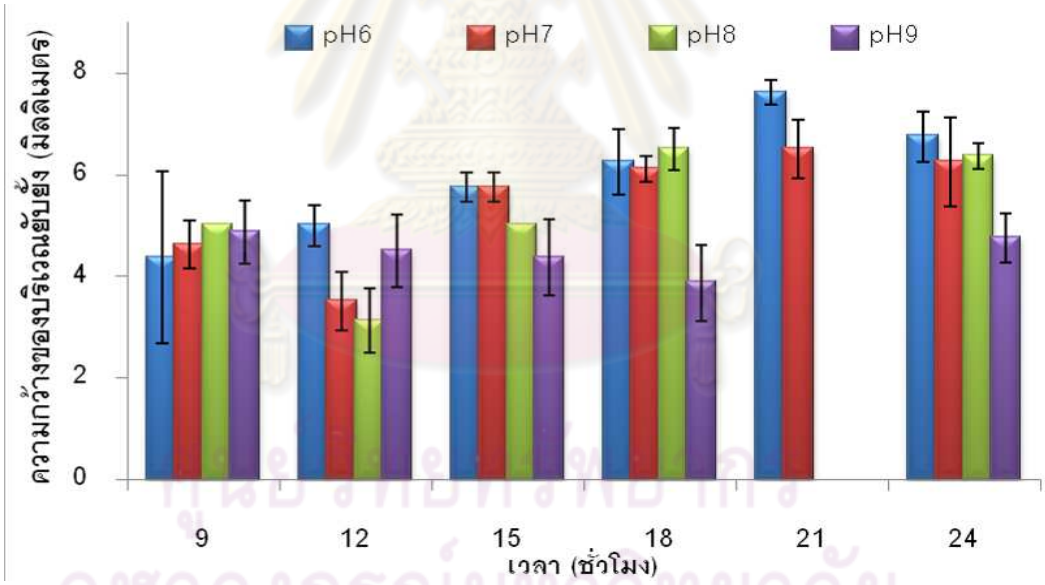
หลังจากได้อาหารเหลว TSB เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุด จึงแปรผัน pH ของอาหารเลี้ยงเหลว TSB ให้เป็น pH6, 7, 8, และ 9 เมื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดที่ OD_{660} ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญที่ใกล้เคียงกันใน pH ต่างๆที่ทดสอบ (รูปที่ 4.5) ส่วนความสามารถในการยับยั้งราทดสอบด้วยวิธี agar diffusion โดยหยดส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนแล้วหยดลงในหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร และมีชุดควบคุมสำหรับ *C. gloeosporioides* เป็น บีโนมิล ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสำหรับ *C. lunata* เป็น นิสทาทิน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยหยดลงบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่วางอยู่กลางจานเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดสอบ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *C. gloeosporioides* ถูกยับยั้งได้ดีที่สุดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ pH7 ที่เวลา 18 ชั่วโมง โดยวัดค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งได้เท่ากับ 7.5 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และรูปที่ 4.8 [a] ส่วนเชื้อ *C. lunata* ถูกยับยั้งได้ดีที่สุดที่ pH6 ที่เวลา 21 ชั่วโมง โดยมีค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.62 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และรูปที่ 4.8 [b] ดังนั้นจึงเลือก pH7 สำหรับเชื้อ *C. gloeosporioides* และ pH6 สำหรับเชื้อ *C. lunata* เนื่องจากเป็น pH ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิด



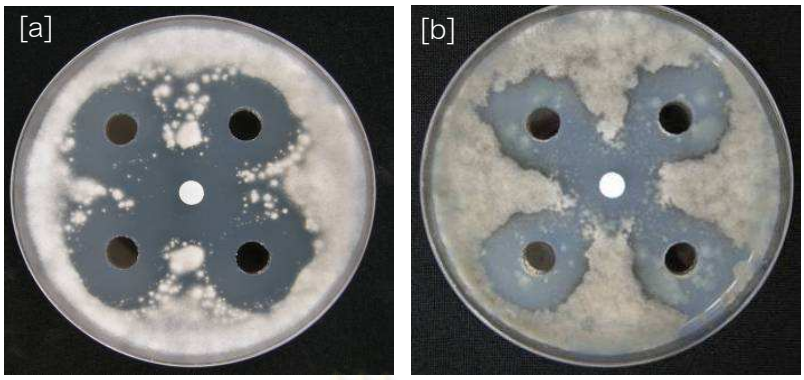
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย N3 ในอาหารเหลว TSB ที่ pH ต่างๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 – 24



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย N3 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ที่ pH ต่างๆ ในชั่วโมงที่ 9 – 24



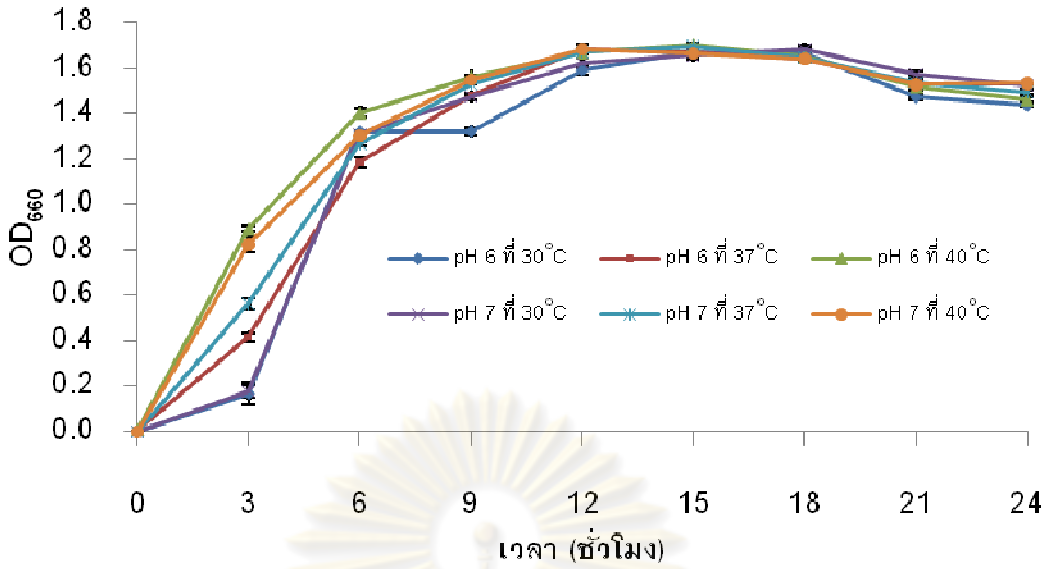
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย N3 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ที่ pH ต่างๆ ในชั่วโมงที่ 9 – 24



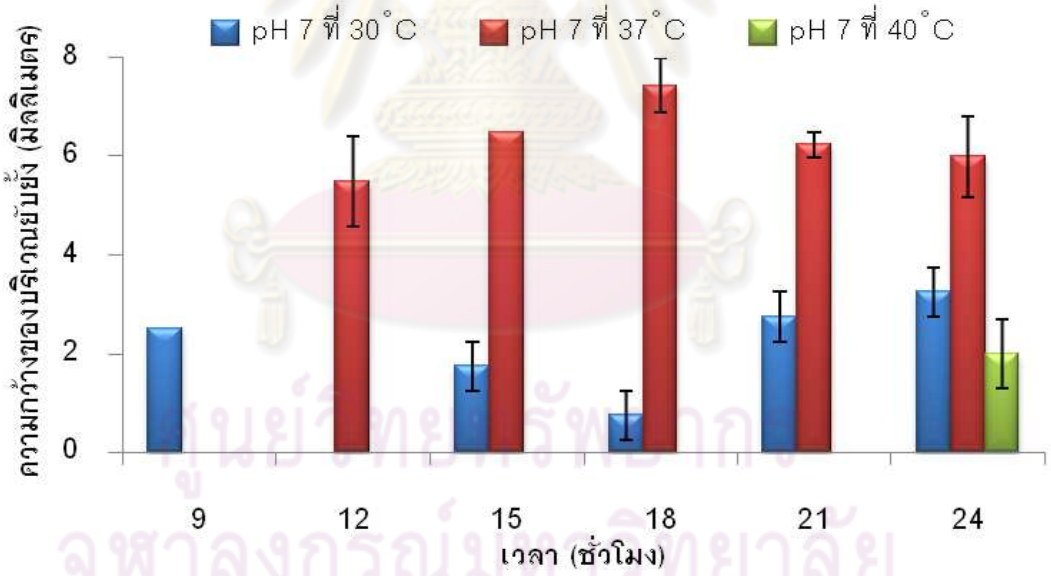
รูปที่ 4.8 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* [a] และ *C. lunata* [b] โดยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลว TSB ที่ pH7 ชั่วโมงที่ 18 และ pH6 ชั่วโมงที่ 21 ชั่วโมง ตามลำดับ (หมายเหตุ: บริเวณหลุมรอบนอกคือ ชุดทดลองที่มีส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ และแผ่นดิสก์ตรงกลางคือ ชุดควบคุมเป็น บีโนมิล 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร [a] และ นิสทาทิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร [b])

4.2.3 การแปรผันหาอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส

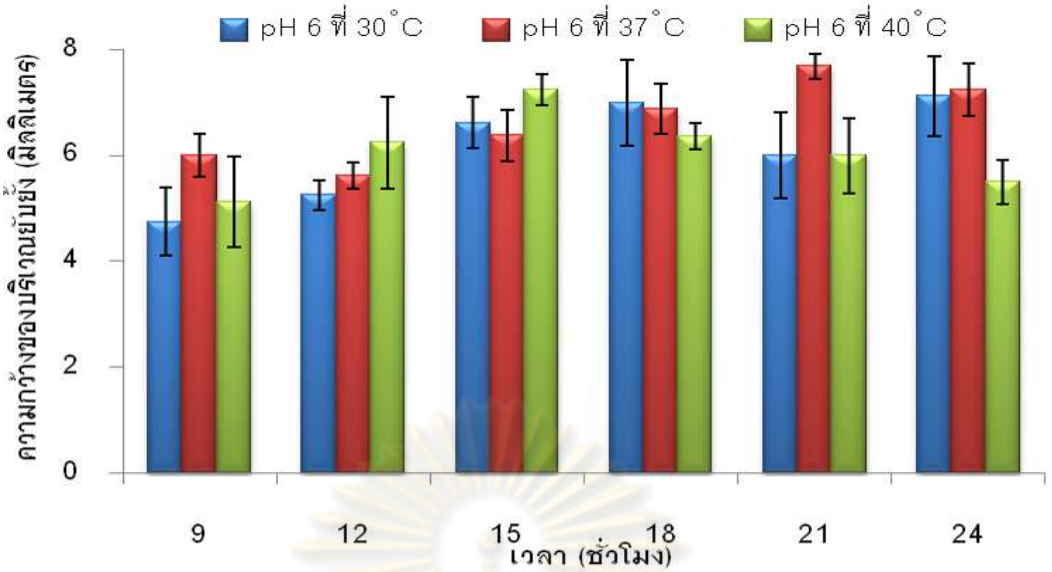
แบคทีเรีย N3 สร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ดีที่ pH7 และ pH6 ตามลำดับ จึงเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ที่ pH ดังกล่าว แล้วนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, หรือ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นติดตามการเจริญของแบคทีเรียโดยวัด OD ที่ 660 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย N3 เจริญได้ใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิต่างๆ (รูปที่ 4.9) และเมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งราของสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion โดยหยดส่วนน้ำใสลงในหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร และมีชุดควบคุมเช่นเดียวกันกับการแปรผัน pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย N3 สามารถสร้างสารมายับยั้งราทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด โดยรา *C. gloeosporioides* วัดบริเวณที่ถูกยับยั้งได้เท่ากับ 7.44 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.10 และ 4.12 [a] ส่วนรา *C. lunata* มีบริเวณยับยั้งดีที่สุดวัดได้เท่ากับ 7.69 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.11 และ 4.12 [b] ดังนั้นจึงเลือกภาวะที่เหมาะสมให้กับแบคทีเรียเพื่อสร้างสารไปยับยั้งราชนิดต่างๆ โดยการเลี้ยงแบคทีเรีย N3 ในอาหารเหลว TSB pH7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะสร้างสารออกมายับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง และเลี้ยงแบคทีเรีย N3 ในอาหารเหลว TSB pH6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง จะสร้างสารออกมายับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ดีที่สุด



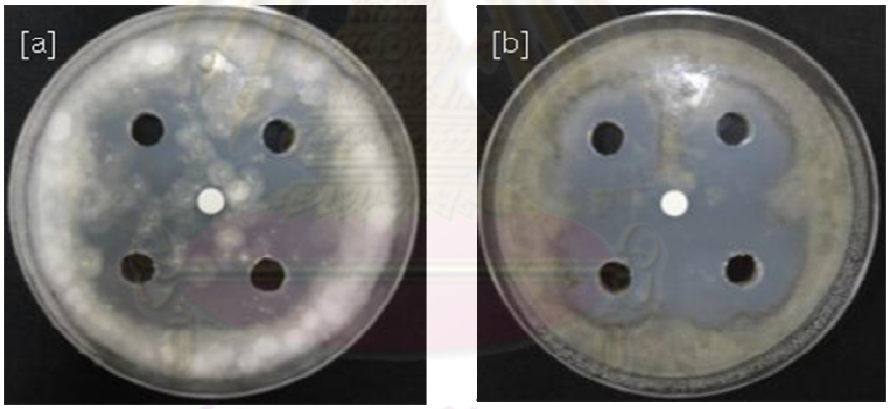
รูปที่ 4.9 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย N3 ในอาหารเหลว TSB ที่ pH6 และ 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ ในชั่วโมงที่ 0 – 24



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย N3 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ที่ pH7 อุณหภูมิต่างๆ ในชั่วโมงที่ 9 – 24



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* โดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย N3 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB ที่ pH6 อุณหภูมิต่างๆ ในชั่วโมงที่ 9 – 24



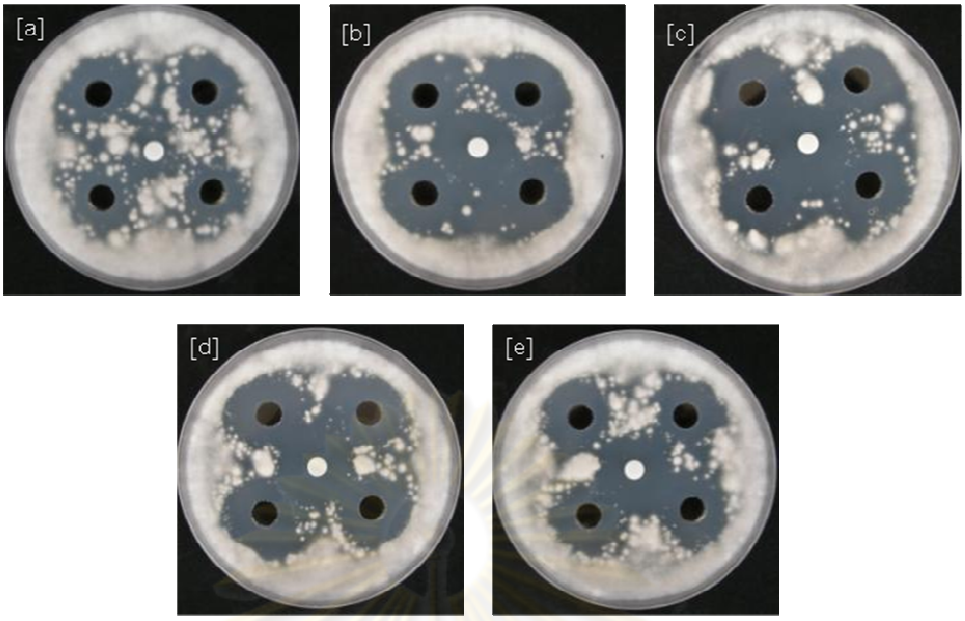
รูปที่ 4.12 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* [a] และ *C. lunata* [b] โดยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลว TSB ที่ pH7 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา18 ชั่วโมง และ pH6 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง ตามลำดับ (หมายเหตุ: บริเวณหลุมรอบนอกคือ ชุดทดลองที่มีส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ และแผ่นดิสก์กลางคือ ชุดควบคุมเป็น บีโนมิล 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร [a] และ นิสทาทิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร [b])

4.3 การทดสอบความเสถียรของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งราซึ่งผลิตโดยแบคทีเรีย

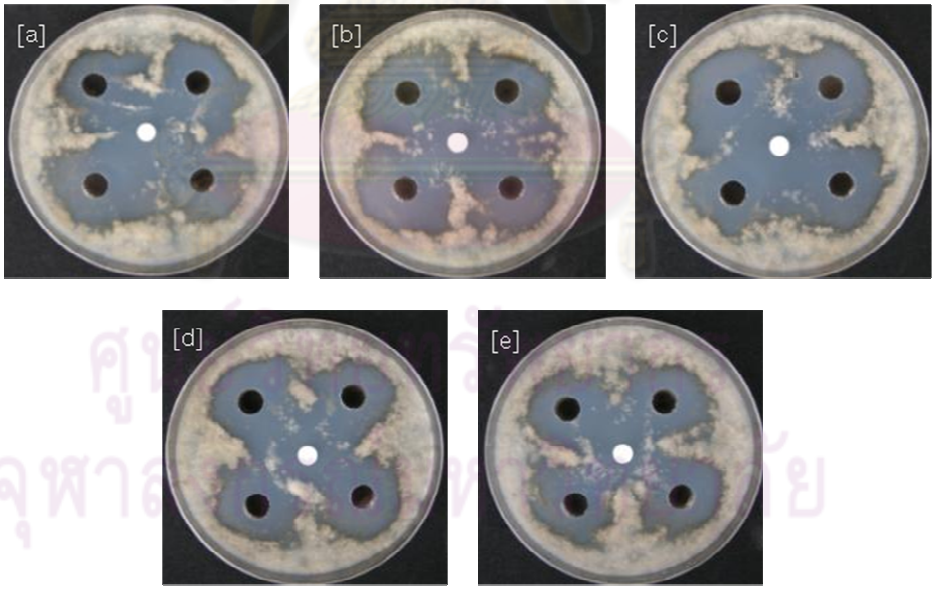
4.3.1 การทดสอบความเสถียรต่อ pH

เมื่อทราบภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อให้สร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา โดยเลี้ยงแบคทีเรีย N3 ในอาหารเหลว TSB pH7 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และเลี้ยงแบคทีเรีย N3 ในอาหารเหลว TSB pH6 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 21 ชั่วโมง สำหรับยับยั้งการเจริญของรา *C. lunata* แล้ว จากนั้นนำทั้งสองภาวะไปทดสอบหาความเสถียรของสารนั้น โดยเลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงและกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออก แล้วนำส่วนน้ำใสมาปรับ pH ด้วย 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก หรือ 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้มี pH เท่ากับ 2, 4, 6, 8, และ 10 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับ pH กลับเป็น pH เริ่มต้น นำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion ผลการทดลองพบว่าสารที่ยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* สามารถทน pH ได้ตั้งแต่ pH2 ถึง pH10 ดังแสดงในรูปที่ 4.13 และ 4.14 ตามลำดับ โดยแนวโน้มของความเสถียรของสารที่ยับยั้งรานั้น พบว่าที่ความเป็นกรดหรือเบสสูงมากๆ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* จะลดลง และที่ pH2 ถึง pH6 สารที่ออกฤทธิ์ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ดีกว่าที่ pH8 ถึง pH10 ดังนั้นแสดงว่าสารที่ยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดสามารถทนต่อ pH ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.15

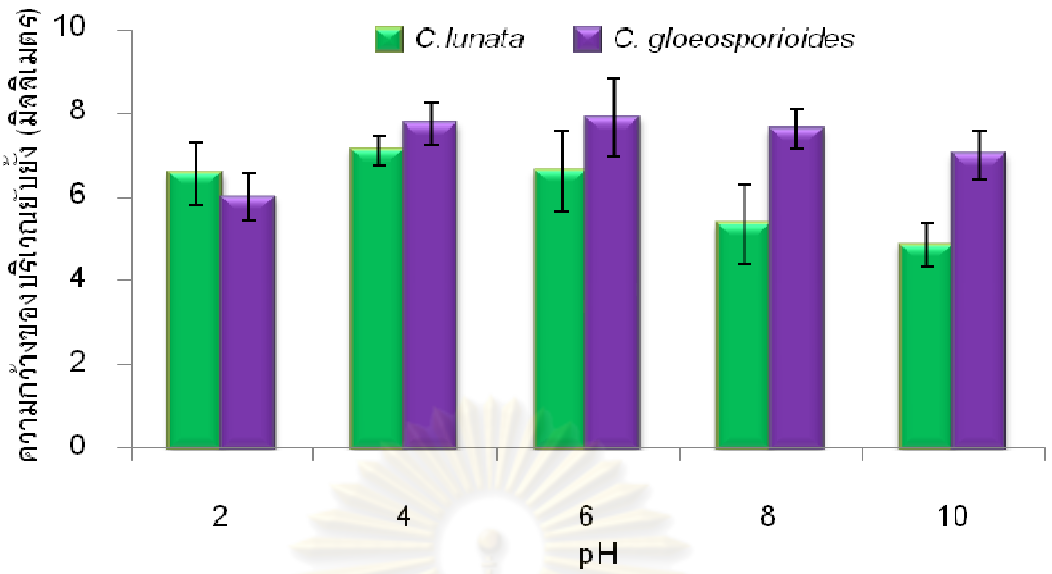
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.13 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* โดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่ผ่านการทดสอบหาความเสถียรต่อ pH ที่ pH ต่างๆ ได้แก่ pH2 [a], pH4 [b], pH6 [c], pH8 [d], และ pH10 [e] (หมายเหตุ: บริเวณหลุมรอบนอกคือ ชุดทดลองและแผ่นดิสก์ตรงกลางคือ ชุดควบคุมเป็น บีโนมิล 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร)



รูปที่ 4.14 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* โดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่ผ่านการทดสอบหาความเสถียรต่อ pH ที่ pH ต่างๆ ได้แก่ pH2 [a], pH4 [b], pH6 [c], pH8 [d], และ pH10 [e] (หมายเหตุ: บริเวณหลุมรอบนอกคือ ชุดทดลองและแผ่นดิสก์ตรงกลางคือ ชุดควบคุม ได้แก่ นิสทาทิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร)

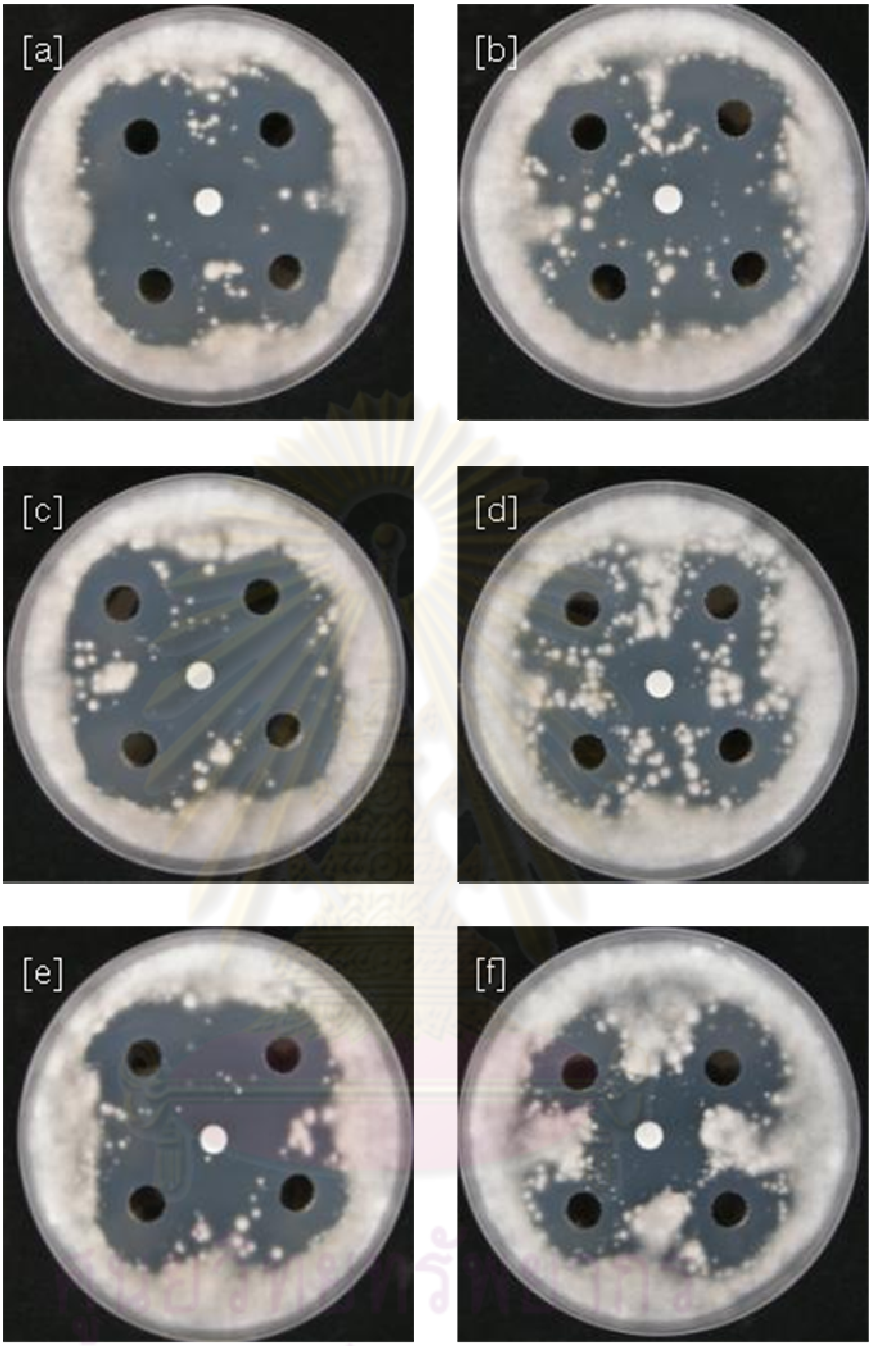


รูปที่ 4.15 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* โดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่ผ่านการทดสอบหาความเสถียรต่อ pH ที่ pH ต่างๆ

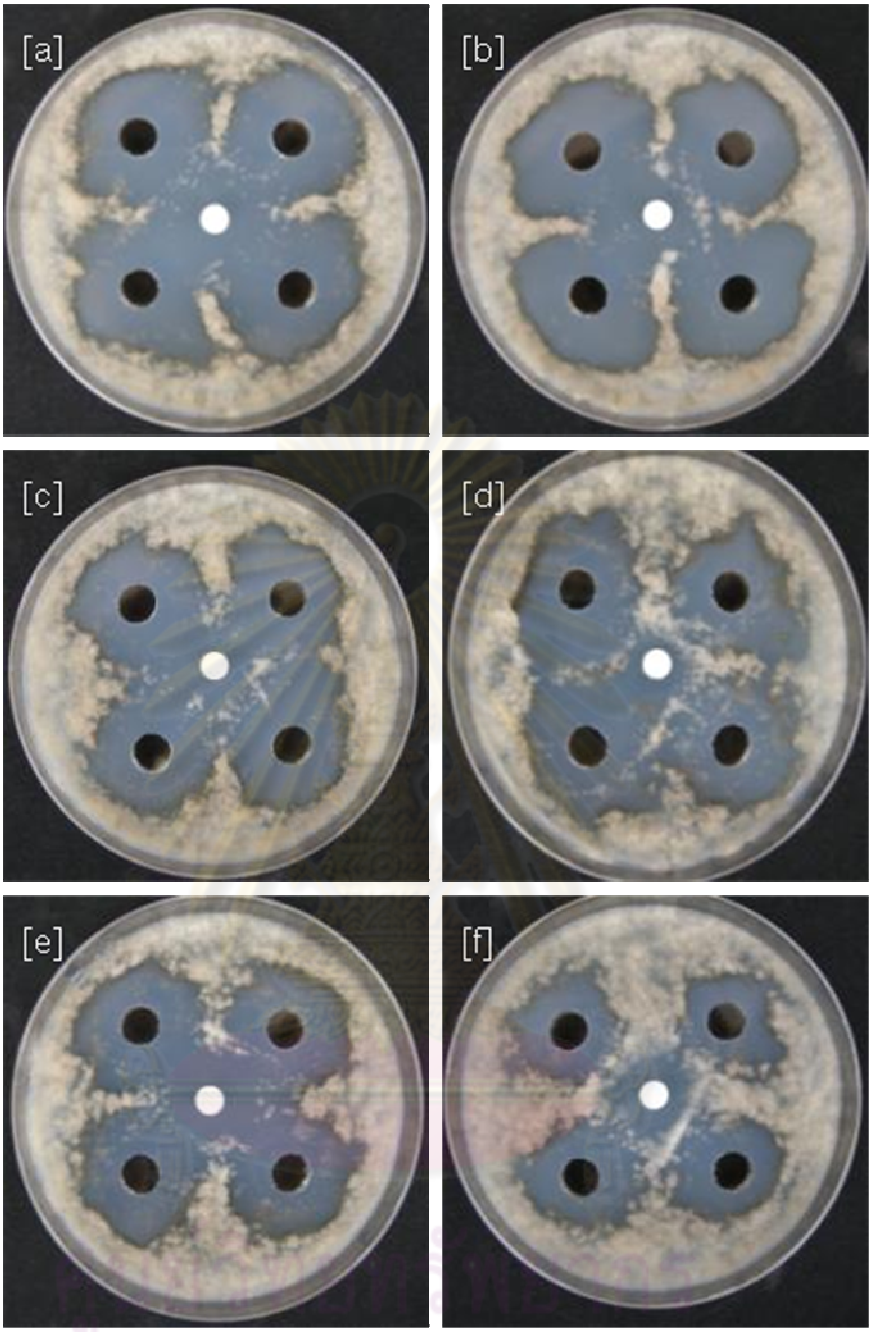
4.3.2 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ

นำแบคทีเรีย N3 ที่เลี้ยงในภาวะที่เหมาะสมไปปั่นเหวี่ยงและกรองด้วยเมมเบรน เพื่อแยกเซลล์ออก จากนั้นนำส่วนน้ำใสไปทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ โดยบ่มส่วนน้ำใสที่อุณหภูมิ 20, 40, 60, 80, 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้จนเย็นเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion ผลการทดลองพบว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ที่ได้จากแบคทีเรีย N3 สามารถทนอุณหภูมิได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ถึง 121 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.16 และ 4.17 ตามลำดับ) โดยแนวโน้มของความเสถียรของสารที่ยับยั้งรานั้น ที่อุณหภูมิ 20°C ถึง 60°C สามารถยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 80°C ถึง 121°C (รูปที่ 4.18)

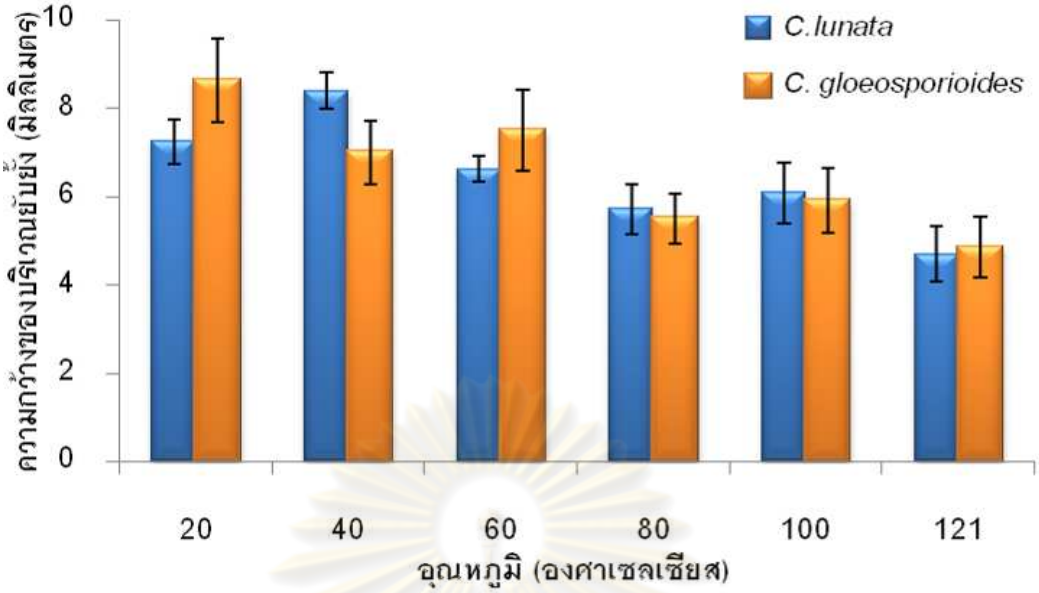
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.16 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* โดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่ผ่านการทดสอบหาความเสถียรต่ออุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 20 [a], 40 [b], 60 [c], 80 [d], 100 [e] และ 121 [f] องศาเซลเซียส (หมายเหตุ: บริเวณหลุมรอบนอกคือ ชุดทดลองและแผ่นดิสก์ตรงกลางคือ ชุดควบคุม ได้แก่ บีโนมิล 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร)



รูปที่ 4.17 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* โดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่ผ่านการทดสอบหาความเสถียรต่ออุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 20 [a], 40 [b], 60 [c], 80 [d], 100 [e] และ 121 [f] องศาเซลเซียส (หมายเหตุ: บริเวณหลุมรอบนอกคือ ชุดทดลองและแผ่นดิสก์ตรงกลางคือชุดควบคุม ได้แก่ นิสทาทิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร)



รูปที่ 4.18 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* โดยส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่ผ่านการทดสอบหาความเสถียรต่ออุณหภูมิต่างๆ

4.4 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC: minimum inhibitory concentration) ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสมแล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออก นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปไลโอฟิไลซ์ ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปวัดความปริมาณโปรตีนด้วยชุด Bio-Rad Protein Assay แล้วเจือจางสารละลายที่ได้แบบลำดับส่วน โดยกำหนดความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, และ 3.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ได้แก่ บีโนมิล 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับรา *C. gloeosporioides* และนิสทาทิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับรา *C. lunata* ผลการทดลองพบว่า สารละลายโปรตีนสามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* ได้ 10.34, 9.50, 5.75, 6.50, 5.00, 0 และ 0 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. lunata* ได้ 10.00, 9.00, 8.60, 8.00, 7.00, 5.00 และ 0 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างของประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และเมื่อวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างของบริเวณยับยั้งกับความเข้มข้น

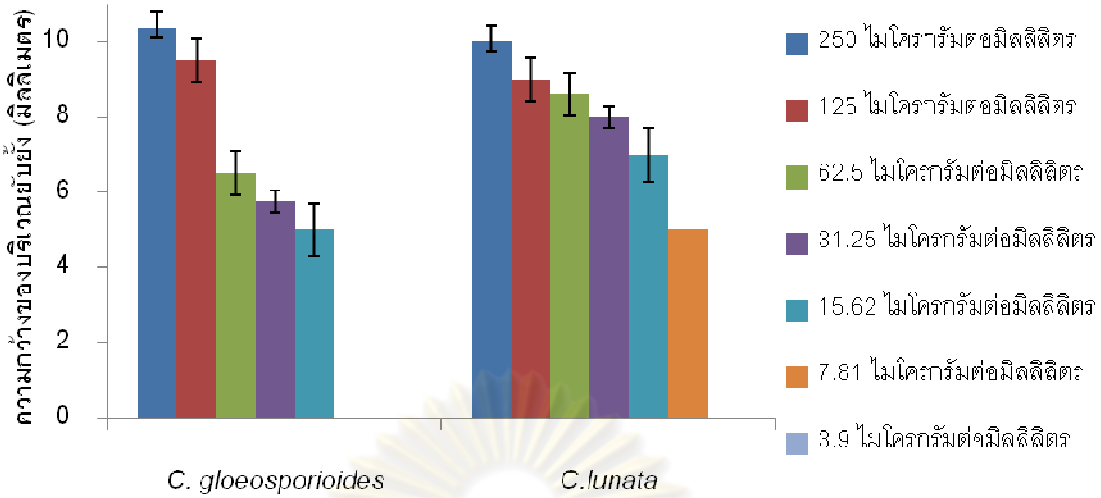
ของสารละลายโปรตีนที่มีต่อรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ดังรูปที่ 4.19 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนสูงบริเวณยับยั้งของราจะมากตาม และเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนลดลงบริเวณยับยั้งก็จะลดลงตามไปด้วย และความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ คือ สารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้น 15.62 และ 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.20)

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้งของราทั้งสองชนิด ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

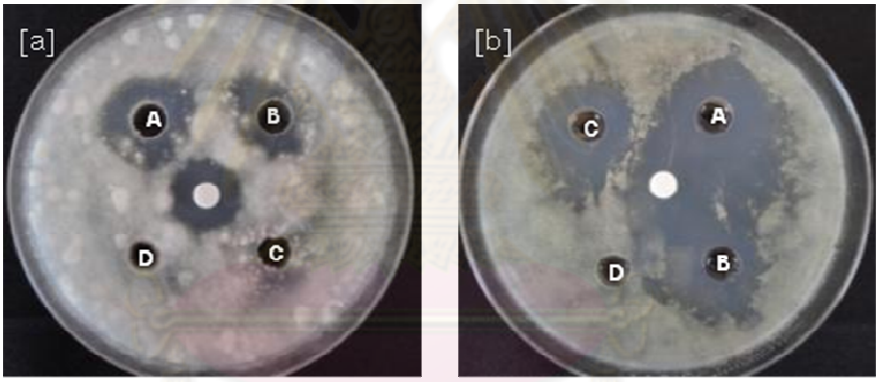
ความเข้มข้นของส่วนน้ำใส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	C. gloeosporioides	*C. lunata*
250.00	10.34 ± 0.118[a]	10.00 ± 0.440[a]
125.00	9.50 ± 0.577[b]	9.00 ± 0.245[b]
62.50	5.75 ± 0.289[d]	8.60 ± 0.455[b]
31.25	6.50 ± 0.577[c]	8.00 ± 0.456[c]
15.62	5.00 ± 0.707[e]	7.00 ± 0.408[d]
7.81	0.00 ± 0.000[f]	5.00 ± 0.000[e]
3.90	-	0.00 ± 0.000[f]

หมายเหตุ : [x] แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT (ภาคผนวก จ หมายเลข 1 และ 2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.19 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำไลโอฟิไลซ์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 4.20 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* [a] และ *C. lunata* [b] โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำไลโอฟิไลซ์ ที่ความเข้มข้น 31.25 (A), 15.62 (B), 7.81 (C) และ 3.9 (D) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หมายเหตุ: บริเวณหลุมรอบนอกคือ ชุดทดลองและแผ่นดิสก์กลางคือ ชุดควบคุมเป็น บีโนมิล 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร [a] และ นิสทาทิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร [b])

4.5 การสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราทั้งสองชนิด

4.5.1 การสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสมแล้วนำไปแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียออกด้วยการปั่นเหวี่ยง จากนั้นวัดปริมาตรของส่วนน้ำใสเพื่อเติมตัวทำละลายชนิดต่างๆ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ ดังนี้ *n*-บิวทานอล, *n*-เฮกเซน, อีเทอร์ หรือคลอโรฟอร์ม จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 1 นาที จำนวน 4 ครั้ง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหย ชั่งน้ำหนักสารที่เหลือ นำสารที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งได้แก่ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ผลการทดลองพบว่าตัวทำละลายอีเทอร์ และ *n*-บิวทานอล ไม่มีการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุม ส่วนในตัวทำละลาย *n*-เฮกเซนและคลอโรฟอร์ม พบว่ามีการเจริญของราทั้งสองชนิดได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุม จึงบอกได้ว่าการยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิด ด้วยการสกัดจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ ไม่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้

4.5.2 การแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยช่วงของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม

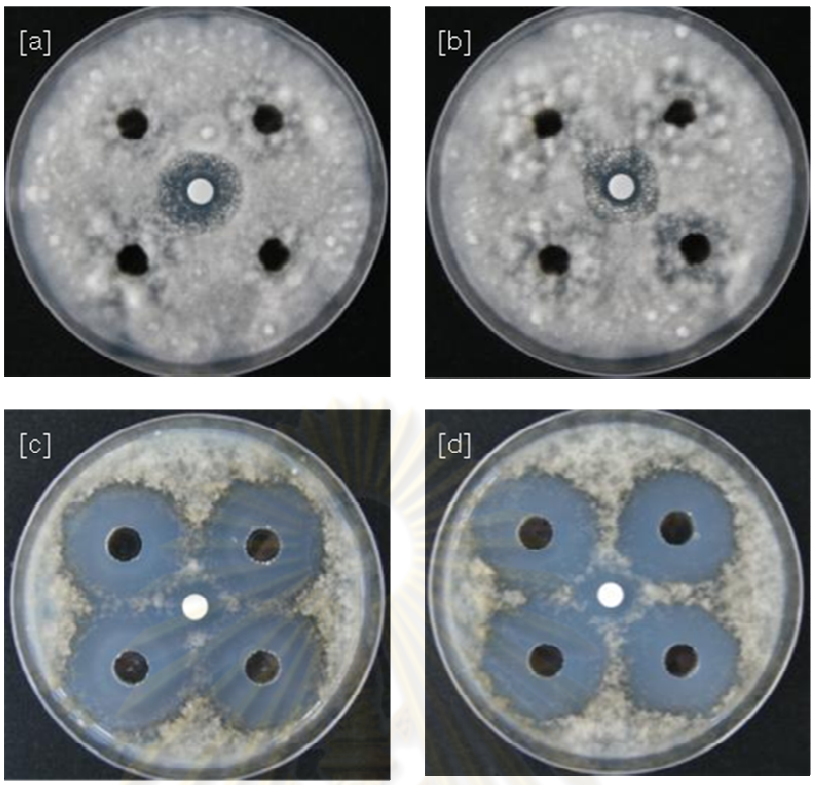
หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสม ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียออกด้วยการปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นในช่วงต่างๆ ได้แก่ 0 – 40%, 40 – 80%, และ 80 – 100% แล้วละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ให้มีปริมาตรน้อยที่สุด จากนั้นนำไปขจัดเกลือด้วยการไดแอไลซ์ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง และในครั้งที่ 4 ไดแอไลซ์ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ที่มีกลีเซอรอล 30% ผสมอยู่ด้วยเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทดสอบด้วยวิธี agar diffusion โดยทดสอบบนจานเพาะเลี้ยงที่เกลี่ยเชื้อราเป้าหมายไว้แล้ว ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 80 – 100% โปรตีนที่ได้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ และสำหรับรา *C. gloeosporioides* พบว่ามีสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40 – 80% เท่านั้นที่สามารถลดการเจริญได้ (รูปที่ 4.21 a, b) โดย

มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.007 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ส่วนรา *C. lunata* พบว่าสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนในช่วง 0 – 40% และ 40 – 80% สามารถยับยั้งการเจริญของราได้เท่ากับ 6.79 และ 5.19 มิลลิเมตร โดยมีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.21 c, d) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าบริเวณยับยั้งของรา *C. lunata* มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบระหว่างจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 – 40% และ 40 – 80% และเมื่อเปรียบเทียบปริมาตรและความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40 – 80% พบว่าทั้งปริมาตรและปริมาณของโปรตีนที่ได้มีมากกว่าการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0 – 40% ดังนั้นในเบื้องต้นนี้จึงเลือกการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40 – 80% เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.3 การยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* จากสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยความเข้มข้นของแอมโมเนียมในช่วง 0 – 40%, 40 – 80%, และ 80 – 100%

แอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	C. gloeosporioides	*C. lunata*
0 – 40	-	6.79
40 – 80	ลด	5.19
80 – 100	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.21 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. gloeosporioides* [a], [b] และ *C. lunata* [c], [d] โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0 – 40% [a], [c] และ 40 – 80% [b], [d] (หมายเหตุ: บริเวณหลุมรอบนอกคือ ชุดทดลองที่มีและแผ่นดิสก์กลางคือ ชุดควบคุมเป็น บีโนมิล 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร [a], [b] และ นิสทาทิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร [c], [d]; “ลด” หมายถึง บริเวณรอบหลุมที่ทดสอบกับโปรตีนจะมีการเจริญที่น้อยกว่าบริเวณรอบๆ)

4.6 การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา

4.6.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

หลังจากหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมในช่วงต่างๆ แล้วพบว่าการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมในช่วง 40 – 80% ให้ผลการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเพิ่มปริมาตรในการเลี้ยงแบคทีเรีย N3 เป็น 2,000 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้น โดยเลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสม จากนั้นแยกเซลล์แบคทีเรียออกด้วยการปั่นเหวี่ยงตกตะกอน แล้วนำส่วนน้ำใสไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วง 0 – 40% และ 40 – 80% ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ให้มีปริมาตรน้อยที่สุด จากนั้น

นำไปขจัดเกลือด้วยการไดแอไลซ์ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีในการยับยั้งรา *C. gloeosporioides* จากส่วนน้ำใส พบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 266.76 มิลลิกรัม, มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 142.45 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 38,000 AU เมื่อนำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วง 0 – 40% และ 40 – 80% พบว่าสามารถละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 มีปริมาตรเท่ากับ 1 และ 6 มิลลิลิตร, มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 2.63 และ 15.23 มิลลิกรัม, มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 121.68 และ 63.04 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 320 และ 960 AU ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่าต่างๆ หลังจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตของแบคทีเรีย N3 ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการลดการเจริญของรา *C. gloeosporioides*

ตัวอย่าง	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตี (AUต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน)	แอกทิวิตีรวม (AU)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารสกัดโปรตีนเริ่มต้น	1,900	0.14	266.76	20	142.45	38,000	1
ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 0 – 40%	1	2.63	2.63	320	121.68	320	0.85
ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 40 – 80%	6	2.54	15.23	160	63.04	960	0.44

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีในการยับยั้งรา *C. lunata* จากส่วนน้ำใส พบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 235.03 มิลลิกรัม, มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,293.45 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 304,000 AU เมื่อนำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วง 0 – 40% และ 40 – 80% พบว่าสามารถละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 มีปริมาตรเท่ากับ 2.2 และ 8.42 มิลลิลิตร, มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 7.12 และ 29.46 มิลลิกรัม, มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 6,325.28 และ 5,852.60 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 45,000 และ 172,000 AU ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่สามารถลดและยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตารางที่ 4.5 ค่าต่างๆ หลังจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีของแบคทีเรีย N3 ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการลดการเจริญของรา *C. lunata*

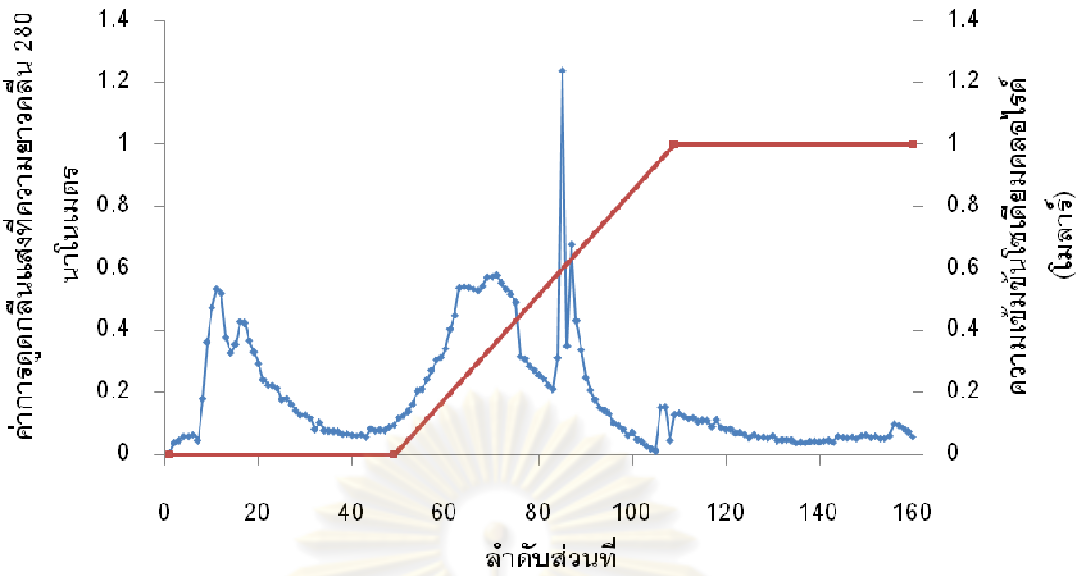
ตัวอย่าง	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตี (AUต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน)	แอกทิวิตีรวม (AU)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารสกัดโปรตีนเริ่มต้น	1,900	0.12	235.03	160	1,293.45	304,000	1
ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 0 – 40%	2.2	3.24	7.12	20,480	6,325.28	45,000	4.89
ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 40 – 80%	8.42	3.50	29.46	20,480	5,852.60	172,000	4.52
ผ่านคอลัมน์ DEAE Bio-gel A ลำดับส่วนที่ 96 – 100	1.4	0.14	0.20	160	1,104.97	220.99	0.85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร (ion exchange chromatography)

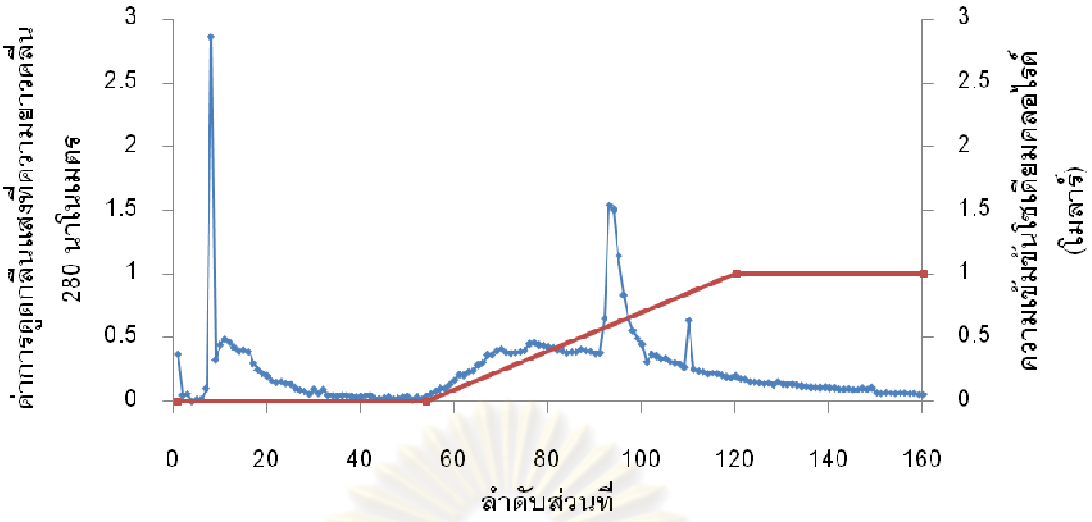
นำสารละลายโปรตีนจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40 – 80% ซึ่งละลายอยู่ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ที่มีกลีเซอรอล 30% มาปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ (anion exchanger) ตามวิธีในข้อ 3.10.3.5 จากนั้นล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 และเก็บลำดับส่วนๆ ละ 2 มิลลิลิตร แล้วติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เมื่อปริมาณโปรตีนลดลงเกือบเป็นศูนย์จึงชะด้วยเกรเดียนต์ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 แล้วติดตามโปรตีนต่อ ผลการติดตามปริมาณโปรตีนที่มีฤทธิ์ลดการเจริญของรา *C. gloeosporioides* พบว่ามีพีค (peak) ของโปรตีนประมาณ 4 ช่วง ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.22 ดังนั้นจึงรวมแต่ละช่วงของลำดับส่วนเข้าด้วยกัน โดยรวมช่วงละประมาณ 3 – 5 ลำดับส่วน ทั้งหมด 12 ช่วง ได้แก่ ลำดับส่วนที่ 8 – 12, 13 – 16, 17 – 20, 21 – 24, 54 – 57, 58 – 62, 63 – 66, 67 – 70, 71 – 75, 76 – 80, 84 – 86 และ 87 – 89 จากรูปที่ 4.22 จะเห็นว่าช่วงที่ 1 – 4 ลำดับส่วนจะอยู่ช่วงก่อนชะด้วยเกรเดียนต์ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ และช่วงที่ 5 – 12 ลำดับส่วนจะอยู่ช่วงหลังชะด้วยเกรเดียนต์ของโซเดียมคอลไรด์ และเมื่อนำแต่ละช่วงของลำดับส่วนไปทดสอบกับรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี agar diffusion พบว่าโปรตีนในทุกช่วงลำดับส่วนไม่มีฤทธิ์ในการลดหรือยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

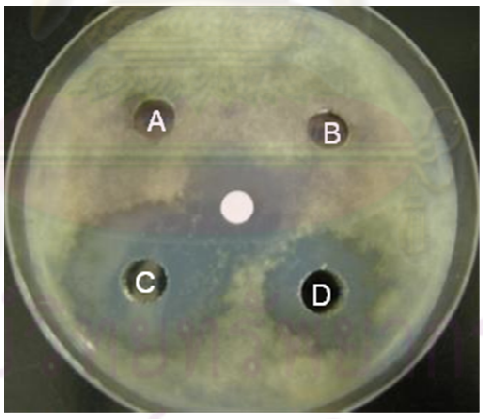


รูปที่ 4.22 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ในแต่ละลำดับส่วนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนของแบคทีเรีย N3 ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการลดการเจริญของรา *C. gloeosporioides* ในช่วง 40 – 80% โดยนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A

เมื่อติดตามปริมาณโปรตีนที่มีฤทธิ์ลดการเจริญของรา *C. lunata* พบว่ามีพีค (peak) ของโปรตีนประมาณ 3 ช่วง ดังผลการทดลองในรูปที่ 4.23 ดังนั้นจึงรวมแต่ละช่วงของลำดับส่วนเข้าด้วยกัน โดยรวมช่วงละประมาณ 3 – 5 ลำดับส่วน ทั้งหมด 6 ช่วง ได้แก่ ลำดับส่วนที่ 7 – 9, 10 – 13, 75 – 78, 79 – 82, 92 – 95 และ 96 – 100 จากรูปที่ 4.23 จะเห็นว่าช่วงที่ 1 – 2 ลำดับส่วนจะอยู่ช่วงก่อนชะด้วยเกรเดียนต์ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ และช่วงที่ 3 – 6 ลำดับส่วนจะอยู่ช่วงหลังชะด้วยเกรเดียนต์ของโซเดียมคลอไรด์ และเมื่อนำแต่ละช่วงของลำดับส่วนไปทดสอบกับรา *C. lunata* ด้วยวิธี agar diffusion พบว่าโปรตีนในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *C. lunata* ได้ความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.5 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.24 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของลำดับส่วนที่ 96 – 100 พบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 0.20 มิลลิกรัม และเมื่อตรวจสอบแอกทิวิตีในการยับยั้งรา *C. lunata* จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่ามีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,104.97 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 220.99 AU ดังแสดงในตารางที่ 4.5 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าหลังการทำให้บริสุทธ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A มีโปรตีนจากช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. lunata* ได้



รูปที่ 4.23 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ในแต่ละลำดับส่วนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนของแบคทีเรีย N3 ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการลดการเจริญของรา *C. lunata* ในช่วง 40 – 80% โดยนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A

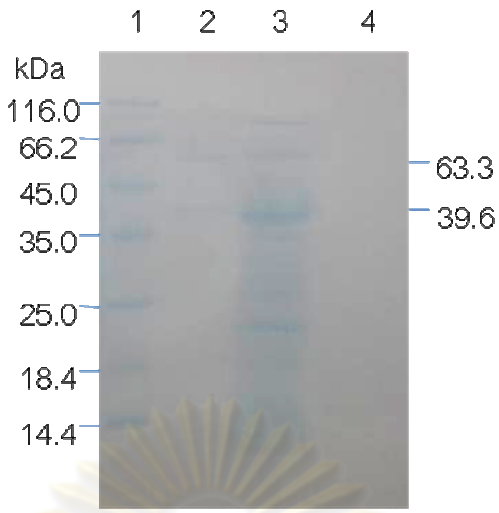


รูปที่ 4.24 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งของรา *C. lunata* โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40 – 80% (C) และการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 92 – 95 (A), 79 – 82 (B) และ 96 – 100 (D) (หมายเหตุ: บริเวณหลุมรอบนอกคือ ชุดทดลองและแผ่นดิสก์กลางคือ ชุดควบคุมเป็น นิสทาทิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร)

4.6.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ โดยการทำอิเล็กโทรโฟเรซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

นำส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB pH6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *C. lunata* มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40 – 80% และทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 นำทั้งหมดมาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ ด้วยวิธี SDS – PAGE ใช้โปรตีนจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40 – 80% ประมาณ 70 ไมโครกรัม ส่วนโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์จากการผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 ใช้ประมาณ 5 ไมโครกรัม และจากส่วนน้ำใสใช้ประมาณ 2.5 ไมโครกรัม เปรียบเทียบทั้งสามตัวอย่างกับโปรตีนมาตรฐาน ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.25 พบว่า โปรตีนที่ตกตะกอนจากแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราเกิดแถบโปรตีนเป็นจำนวนมาก และเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์จะเห็นได้ว่าโปรตีนในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 มีจำนวนของแถบโปรตีนลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ตกตะกอนจากแอมโมเนียมซัลเฟต และหลังจากวิเคราะห์กราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโปรตีนมาตรฐานกับระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 บน SDS – PAGE พบว่าแถบโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 63.3 และ 39.6 kDa

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.25 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและทดสอบความบริสุธิ์ของโปรตีนโดยวิธี SDS – PAGE

ช่องที่ 1	โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง
ช่องที่ 2	โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100
ช่องที่ 3	โปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 40 – 80%
ช่องที่ 4	ส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N3 มีมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา *C. lunata*

4.7 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา

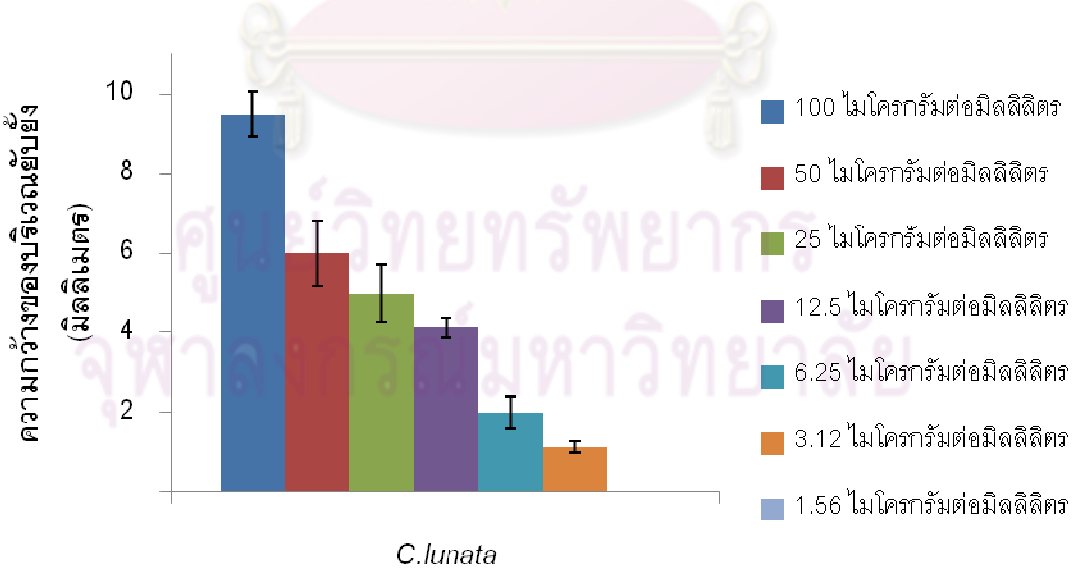
4.7.1 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC: minimum inhibitory concentration) ของโปรตีนบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้

นำโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 มาวัดปริมาณของโปรตีนด้วยวิธี Bio-Rad Protein Assay แล้วเจือจางแบบลำดับส่วน คือ กำหนดให้ความเข้มข้นมีค่าเท่ากับ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งราด้วยวิธี agar diffusion ผลการทดลองพบว่าจากตารางที่ 4.6 และ รูปที่ 4.26 มีความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 9.5, 6.0, 5.0, 4.13, 2.0, 1.12 และ 0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของโปรตีนบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. lunata* ได้มีค่าเท่ากับ 3.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.27

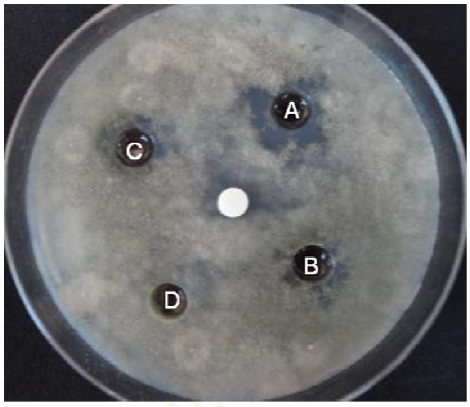
ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้งของรา *C. lunata* ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสารละลายโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ที่ช่วงของลำดับส่วน 96 - 100 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* (มิลลิเมตร)
100.00	9.50 ± 0.577 [a]
50.00	6.00 ± 0.816 [b]
25.00	5.00 ± 0.707 [c]
12.50	4.13 ± 0.250 [d]
6.25	2.00 ± 0.408 [e]
3.13	1.12 ± 0.144 [f]
1.56	0.00 ± 0.000 [g]

หมายเหตุ : [a, b, c, d, e, f และ g] แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT (ภาคผนวก จ หมายเลข 3)



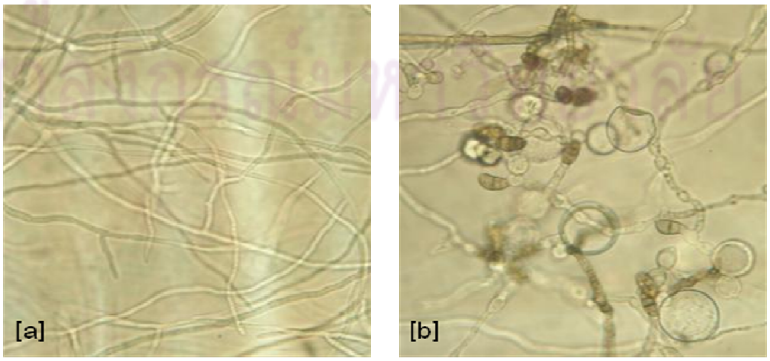
รูปที่ 4.26 กราฟแสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *C. lunata* โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 4.27 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งของรา *C. lunata* โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 12.5 (A), 6.25 (B), 3.125 (C) และ 1.56 (D) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (หมายเหตุ: บริเวณหลุมรอบนอกคือ ชุดทดลองและแผ่นดิสก์กลางคือ ชุดควบคุมเป็น นิสทาทิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร)

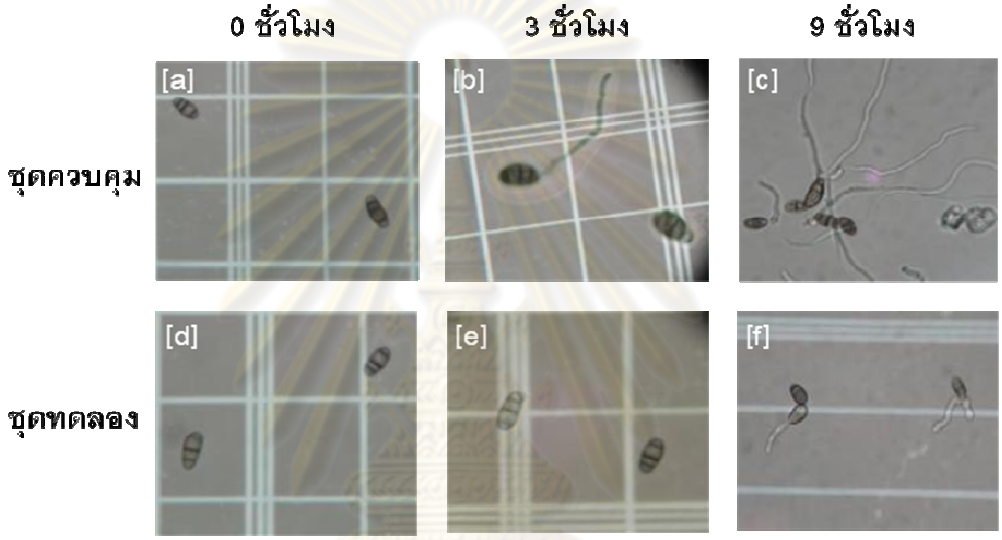
4.7.2 การตรวจสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา

เมื่อนำสปอร์ของรา *C. lunata* ความเข้มข้น 2 X 10^4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาผสมกับโปรตีนบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์รา *C. lunata* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าในชุดควบคุมซึ่งไม่ใส่โปรตีนบริสุทธิ์ มีการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยราได้ปกติ ดังรูปที่ 4.28 [a] และ 4.29 [b], [c] ส่วนชุดทดสอบที่ใสโปรตีนในอาหารเหลวนั้น พบว่าสปอร์ของรา *C. lunata* ที่งอกออกมาเป็นเส้นใยเกิดการบวมและมีการโป่งพอง ดังแสดงในรูปที่ 4.28 [b]



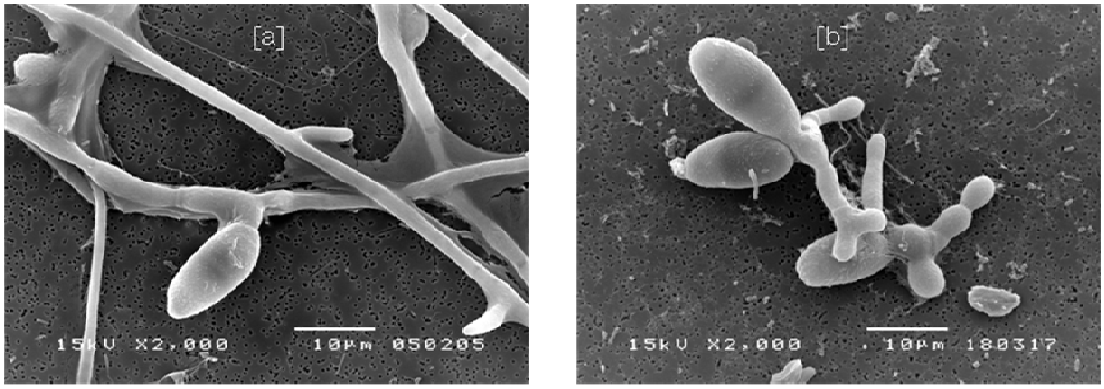
รูปที่ 4.28 แสดงลักษณะของรา *C. lunata* ในชุดควบคุม [a] และชุดทดสอบ [b] ชั่วโมงที่ 24 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

จากรูปที่ 4.29 จะเห็นได้ว่าสปอร์ของราสามารถเจริญงอกออกมาเป็นเส้นใยได้ดีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 (รูป 4.29 [b]) แต่สปอร์ของราที่ผสมกับโปรตีนบริสุทธิ์ 50 ไมโครกรัม ในชั่วโมงที่ 3 นั้นยังไม่เห็นการงอกของสปอร์รา (รูป 4.29 [e]) และเมื่อสังเกตในชั่วโมงที่ 9 จะพบว่าสปอร์ของราที่ผสมกับโปรตีนบริสุทธิ์ เพิ่งจะเริ่มงอกและเส้นใยที่งอกออกมาก็มีลักษณะบวมพองไม่เป็นสายยาว (รูป 4.29 [c]) แบบการงอกของสปอร์ราในชุดควบคุม (รูป 4.29 [f]) ดังนั้นจึงบอกได้ว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 มีผลต่อการงอกของสปอร์รา *C. lunata*



รูปที่ 4.29 แสดงลักษณะของสปอร์รา *C. lunata* ในชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 0 [a], 3 [b], และ 9 [c] และชุดทดสอบ ชั่วโมงที่ 0 [d], 3 [e], และ 9 [f] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

เมื่อนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์รา *C. lunata* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) โดยใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผลที่ได้พบว่าสปอร์ของรา ในชุดควบคุมสามารถงอกและเจริญได้เป็นปกติ มีลักษณะของเส้นใยที่ยาวและเรียบ แสดงผลดังรูปที่ 4.30 [a] และในชุดทดลองที่ผสมสปอร์ของรา *C. lunata* กับโปรตีนบริสุทธิ์ 50 ไมโครกรัม พบว่าเส้นใยที่งอกออกจากสปอร์ของรามีลักษณะโป่งพอง ขดงอ เป็นปล้องๆ และที่บริเวณปลายของเส้นใยเกิดการแตกแขนง ดังแสดงในรูปที่ 4.30 [b]

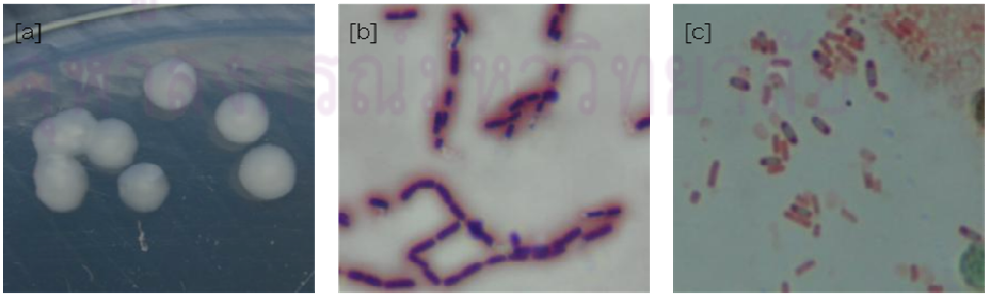


รูปที่ 4.30 แสดงลักษณะของสปอร์รา *C. lunata* ในชุดควบคุมชั่วโมงที่ 24 [a] และชุดทดสอบชั่วโมงที่ 5 [b] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

4.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

4.8.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย N3 ทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่าโคโลนีมีสีขาวขุ่น, กลม, ขอบเรียบ และผิวด้าน ดังรูปที่ 4.31 [a] ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงมีรูปร่างเป็นท่อน ต่อกันเป็นสาย ติดสีแกรมบวก ดังรูปที่ 4.31 [b] และแบคทีเรีย N3 สามารถสร้างสปอร์ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.31 [c] เมื่อทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีต่างๆ พบว่าแบคทีเรีย N3 สามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลส (รูปที่ 4.32), เจลาติเนส และไนเตรตรีดักเทสได้ สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและผลิตอะเซทิลเมธิลคาร์บินอล, แต่ไม่ใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในตารางที่ 4.7



รูปที่ 4.31 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย N3 บนอาหารแข็ง NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง [a], ลักษณะของแบคทีเรีย N3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง [b] และสปอร์ของแบคทีเรีย N3 [c]

รูปที่ 4.32 แสดงปฏิกิริยาระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับโคโลนีของแบคทีเรีย N3

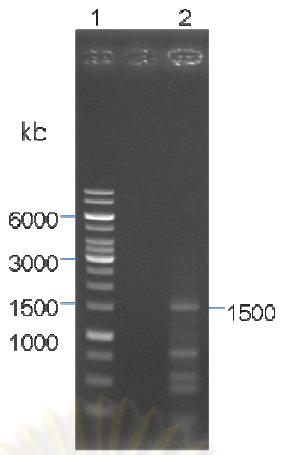
ตารางที่ 4.7 แสดงการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย N3

การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี	Catalase	TSI	citrate	nitrate	gelatinase	IMViC
แบคทีเรีย N3	+	Alkaline butt /acid slant w/o gas	-	+	+	- - + -

4.8.2 **การพิสูจน์เอกลักษณทางชีววิทยาระดับโมเลกุล**

4.8.2.1 **การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส**

เมื่อผสมสารต่างๆสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้าด้วยกัน โดยมี 10F และ 1500R เป็นไพรเมอร์ แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้ผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย N3 ซึ่งตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส จะพบว่ามีผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส แสดงผลดังรูปที่ 4.33 (ช่องที่ 2) นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pGEM โดยใช้ชุดสำเร็จ pGEM® -T และ pGEM® -T Easy Vectors ต่อไป



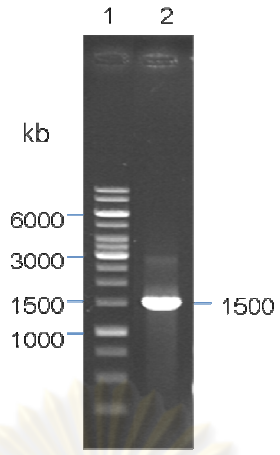
รูปที่ 4.33 แสดงผลผลิตภัณฑ์ชิ้นดีเอ็นเอของแบคทีเรีย N3 จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ช่องที่ 1 1kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรีย N3 เป็นแม่แบบ

4.8.2.2 การโคลนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย N3 จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้ากับเวกเตอร์ pGEM โดยใช้ชุดสำเร็จ pGEM® -T และ pGEM® -T Easy Vectors

นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย N3 จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEM โดยใช้ชุดสำเร็จ pGEM® -T และ pGEM® -T Easy Vectors จากนั้นทรานสฟอร์มสารละลายผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock และนำไปคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น จากนั้นนำไปคัดเลือกทรานฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย N3 ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 10F และ 1500R และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสได้ผลดังในรูปที่ 4.34



รูปที่ 4.34 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 10F และ 1500R เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย N3

ช่องที่ 1 1kb DNA Ladder

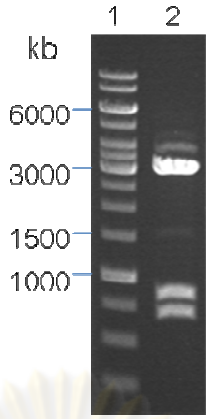
ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ 10F และ 1500R ซึ่งใช้โคโลนีที่สามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือกเป็นแม่แบบ

จากรูปที่ 4.34 แสดงให้เห็นว่าทรานสฟอร์แมนท์ดังกล่าวได้รับพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย N3 แทรกอยู่ ดังนั้นจึงนำไปสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย N3 แทรกอยู่

4.8.3 การตรวจสอบพลาสมิดว่ามีดีเอ็นเอของแบคทีเรียอยู่ โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

นำสารละลายพลาสมิดที่ได้จากการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพื่อยืนยันการมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ 16S rDNA แทรกอยู่ แล้วตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ซึ่งผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.35

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.35 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของพลาสมิดที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit นำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ช่องที่ 1 1kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิดจากโคโลนีพีซีอาร์

จากรูปที่ 4.35 จะเห็นว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ให้ชิ้นส่วนของเวกเตอร์ที่ขนาดประมาณ 3000 คู่เบส และมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย N3 แทรกอยู่ โดยสังเกตได้จากมีดีเอ็นเอขนาด 1500 คู่เบส 1 แถบ และขนาดต่ำกว่า 1000 คู่เบส 2 แถบ จากผลการทดลองนี้แสดงว่าปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 1500 คู่เบส คือแถบของชิ้นส่วนที่แทรกเข้าไปในเวกเตอร์ และชิ้นส่วนขนาดเล็กสองแถบที่เกิดขึ้น เกิดจากชิ้นส่วน 1500 คู่เบส มีตำแหน่งที่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ดังนั้นจึงนำสารละลายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย N3 ต่อไป

4.8.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ด้วยโปรแกรม Blastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Bacillus subtilis* มากถึง 99% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1 และ 2 ดังนั้นจึงสามารถบอกได้ว่าแบคทีเรีย N3 เป็น *Bacillus subtilis*

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดเลือกหาแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* จากแบคทีเรียที่คัดแยกไว้โดย คงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549) ซึ่งได้แก่ไอโซเลต M10, M15, M22, M23, M25, M26, M27, N1, N3 และ N9 พบว่าแบคทีเรีย N3 สามารถยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดได้ดี โดยมีค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.5 และ 4.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ จึงได้นำแบคทีเรีย N3 มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยวิธีทางสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมี ซึ่งพบว่าแบคทีเรีย N3 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ และให้ผลบวกกับการทดสอบแคทาเลส เมื่อศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* มากถึง 99% จึงสามารถระบุได้ว่าแบคทีเรีย N3 น่าจะเป็น *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในดินและมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้ เนื่องจากสามารถสร้างสารต้านราได้หลายชนิด และแบคทีเรียพวกนี้สามารถสร้างสปอร์ได้ ทำให้ทนต่อความแห้งแล้ง, ความร้อน, รังสียูวี และตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ได้ดี (Romero และคณะ, 2007)

เมื่อได้แบคทีเรีย *B. subtilis* N3 ที่มีความสามารถในการยับยั้งรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* แล้ว จึงนำไปหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อให้สร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดดีที่สุด โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียส่วนใสที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงและกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 µm เพื่อแยกแบคทีเรียออกแล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดด้วยวิธี agar diffusion พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดได้ แสดงว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรานั้นเป็นสารที่แบคทีเรียผลิตแล้วหลั่งออกนอกเซลล์ เช่นเดียวกับสารยับยั้งราหลายชนิดที่ผลิตโดยแบคทีเรียพวก *Bacillus* (Yoshida และคณะ, 2001; Chan และคณะ, 2003; Sun และคณะ, 2006; Snook และคณะ, 2009; Thasana และคณะ, 2010)

เมื่อแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ อาหารเหลว NB, LB และ TSB แล้วติดตามการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าในอาหารเหลว TSB ส่งผลทำให้มีการเจริญของแบคทีเรียมากที่สุด และยังสามารถผลิตสารที่ยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดได้ดีที่สุดอีกด้วย เมื่อแปรผัน pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH6, 7, 8 และ 9 พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญที่ใกล้เคียงกันใน pH

ต่างๆที่ทดสอบ และสำหรับความสามารถในการยับยั้งรา พบว่า pH7 ที่เวลา 18 ชั่วโมง เหมาะสมต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* และ pH6 ที่เวลา 21 ชั่วโมง เหมาะสมต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* เมื่อแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย แล้ววัดการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า *B. subtilis* N3 เจริญได้ใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิต่างๆ โดยที่อุณหภูมิ 37°C ทำให้ *B. subtilis* N3 สามารถสร้างสารมายับยั้งได้ทั้งรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ดีที่สุด ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมของ *B. subtilis* N3 ในการสร้างสารไปยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด คือ เมื่อเลี้ยง *B. subtilis* N3 ในอาหารเหลว TSB pH7 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ดีที่สุด คือ เลี้ยง *B. subtilis* N3 ในอาหารเหลว TSB pH6 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 21 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารที่ *B. subtilis* N3 ผลิตขึ้นมาเพื่อยับยั้งการเจริญของรานั้นผลิตขึ้นเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ stationary phase แล้ว ดังนั้นจึงจัดว่าสารที่ผลิตขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ประเภท non growth associate

สารที่ *B. subtilis* N3 ผลิตออกมาเพื่อยับยั้งรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ในอาหารเดียวกัน แต่ที่ pH และช่วงเวลาที่แตกต่างกันนี้ อาจเป็นสารชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันก็ได้ (Moita และคณะ, 2005; Zhao และคณะ, 2010) โดยมีรายงานว่าแบคทีเรียหนึ่งชนิดสามารถผลิตสารหลายชนิดออกมาเพื่อยับยั้งการเจริญของราได้ในภาวะการเจริญที่แตกต่างกัน (Strom และคณะ, 2002) ตัวอย่างของงานวิจัยที่แบคทีเรียชนิดเดียวกันสามารถผลิตสารได้หลายชนิด เช่น งานวิจัยของ LI และคณะ (2006) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ B11 สามารถสร้างสารได้สองชนิดในภาวะเดียวกันคือ สารปฏิชีวนะ A และ B ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรค โดยสารทั้งสองชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium oxysporum* Schl f.sp. *niveum*, *Rhizoctonia solani*, *Ralstonia solanacearum* และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในขณะที่สารปฏิชีวนะ B สามารถยับยั้งการเจริญของ *Magnaporthe grisea* ได้

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองแล้วของแบคทีเรียที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ไปทดสอบความเสถียรต่อ pH พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสารยับยั้งการเจริญของราสามารถทน pH ได้ตั้งแต่ pH2 ถึง pH10 เป็นเวลา 20 นาที โดยแนวโน้มของความเสถียรของสารที่ยับยั้งรานั้น พบว่าที่ความเป็นกรดหรือเบสสูงมากๆ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* จะลดลง และที่ pH2 ถึง pH6 สารที่ออกฤทธิ์ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ดีกว่าที่ pH8 ถึง pH10 และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองแล้ว ไปทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งรา *C.*

gloeosporioides และ *C. lunata* ที่ได้จาก *B. subtilis* N3 สามารถทนอุณหภูมิได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยแนวโน้มของความเสถียรของสารที่ยับยั้งรานั้น ที่อุณหภูมิ 20°C ถึง 60°C สามารถยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 80°C ถึง 121°C นอกจากนี้จะเห็นว่าการบ่มน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* N3 ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาทีแล้ว ก็ยังพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งราได้มากกว่า 50% งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แสดงถึงประสิทธิภาพความเสถียรของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียพวก *Bacillus* ต่อ pH และอุณหภูมิและพบว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งรามีความเสถียรสูงต่อ pH ที่สูงหรือต่ำได้ดี รวมทั้งยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งราได้ในสภาพอุณหภูมิที่สูงถึง 121 องศาเซลเซียส (San-Lang และคณะ, 2002; Han และคณะ, 2005; Gong และคณะ, 2006; Tendulkar และคณะ, 2007; Carissimi และคณะ, 2009) จากสมบัติเหล่านี้แสดงถึงศักยภาพของการนำน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* N3 ไปประยุกต์ใช้เพื่อการควบคุมราก่อโรคในพื้นที่จริงซึ่งมีอุณหภูมิสูงได้

เมื่อสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ *n*-บิวทานอล, *n*-เฮกเซน, อีเทอร์ หรือคลอโรฟอร์ม พบว่าในชุดทดลองซึ่งเป็นสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และชุดควบคุมซึ่งเป็นตัวทำละลายชนิดต่างๆ ให้ผลเช่นเดียวกัน นั่นคือ ไม่พบการเจริญของราหรือพบการเจริญของราเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายเองมีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคได้ จึงไม่สามารถบอกได้ว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดได้นั้น มีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดได้หรือไม่ ทั้งนี้หากเจือจางตัวทำละลายแล้วนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งก็อาจเห็นความแตกต่างจากชุดควบคุมได้ อย่างไรก็ตามในสารละลายที่สกัดได้อาจไม่มีสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราเลยก็ได้ ซึ่งจากงานวิจัยของ Cho และคณะ (2003) พบว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *Gloeosporium gloeosporioides* ซึ่งได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ KS03 ที่สกัดได้ด้วยสารละลาย *n*-บิวทานอล เป็นสารที่มีความไม่ชอบน้ำสูง (highly hydrophobic) จึงละลายในตัวทำละลาย *n*-butanol ได้ดี ดังนั้นหากในสารละลายที่สกัดได้ไม่มีสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราอยู่ ก็อาจเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวนี้เป็นสารที่มีความชอบน้ำสูงจึงไม่สามารถสกัดได้ด้วยตัวทำละลาย

เมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 80 – 100% นั้น โปรตีนที่ได้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* ได้ เนื่องจากมีปริมาณของแอมโมเนียมมากเกินไปทำให้เกิดเป็นผลึกของแอมโมเนียม จึงไม่สามารถละลายตะกอนโปรตีนออกมาได้ ดังนั้นผลที่ได้คือไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดได้ และสำหรับรา *C. gloeosporioides* พบว่ามีสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอน

ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40 – 80% เท่านั้นที่สามารถลดการเจริญได้ ส่วนรา *C. lunata* พบว่าสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนในช่วง 0 – 40% และ 40 – 80% สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ต่างกันเพียงเล็กน้อยประมาณ 0.76 เท่าของความกว้างของบริเวณยับยั้ง และเมื่อเปรียบเทียบปริมาตรและความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40 – 80% พบว่าทั้งปริมาตรและปริมาณของโปรตีนที่ได้มีมากกว่า ดังนั้นจึงเลือกการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40 – 80% สำหรับการยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบวิธีระหว่างการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายต่างๆ กับการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลดีกว่า โดยเลือกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40 – 80% ดังนั้นจึงเลี้ยงแบคทีเรียโดยขยายขนาด เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่มากพอ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีในการยับยั้งรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* พบว่ามีโปรตีนทั้งหมด 15.23 และ 29.46 มิลลิกรัม และมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 63.04 และ 5,852.60 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน โดยมีแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 960 และ 172,000 AU ซึ่งทั้งหมดนี้มีปริมาตร 6 และ 8.42 มิลลิลิตร ตามลำดับ

หลังจากการนำโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40 – 80% ไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A พบว่าโปรตีนในทุกช่วงลำดับส่วนไม่มีฤทธิ์ในการลดหรือยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งรานี้มีประจุลบสูงมากทำให้เกาะกับไบโอเจลได้ดีมาก ซึ่งแม้แต่การชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ก็ไม่สามารถชะโปรตีนดังกล่าวออกมาได้ (Walls และคณะ, 2011) แต่สำหรับรา *C. lunata* พบว่าโปรตีนในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญได้ จากผลการศึกษานี้ยืนยันได้ว่าโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก *B. subtilis* N3 มีประจุเป็นลบ เนื่องจากในงานวิจัยการใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A จะชะด้วยเกรเดียนต์ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ดังนั้น Cl^- จะเข้าไปแย่งจับกับสารตัวกลาง ส่งผลทำให้โปรตีนถูกชะออกมา และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนพบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 0.20 มิลลิกรัม, ค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,104.97 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 220.99 AU

เมื่อวิเคราะห์โปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *C. lunata* ด้วยวิธี SDS–PAGE พบว่าโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงที่ 40 – 80% มีแถบโปรตีนเป็น

จำนวนมาก ส่วนโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมีจำนวนของแถบโปรตีนลดลง แสดงให้เห็นถึงความบริสุทธิ์ที่เกิดขึ้น ซึ่งแถบของโปรตีนที่บริสุทธิ์มีด้วยกัน 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 63.3 และ 39.6 kDa ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้นี้มีโปรตีนอยู่สองชนิด หรือโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้นี้เป็นโปรตีนชนิดเดียวแต่มีสองสับยูนิต (Leelasuphakul และคณะ, 2006)

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองแล้ว ไปหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* และ *C. lunata* พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ได้ คือ สารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีโปรตีนที่ความเข้มข้น 15.62 และ 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำโปรตีนบริสุทธิ์ในช่วงของลำดับส่วนที่ 96 – 100 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *C. lunata* มาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ พบว่ามีค่าเท่ากับ 3.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากผลการทดลองนี้สามารถนำน้ำเลี้ยงเชื้อหรือสารบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ไปใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของราก่อโรคดังกล่าวได้โดยจะต้องควบคุมความเจือจางไม่ให้ต่ำกว่าค่าที่ได้นี้เพื่อให้ยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งราเป้าหมายได้ ตัวอย่างของงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อเจือจาง 1:32 เท่า จาก *Bacillus subtilis* ทั้ง 9 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากดิน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของรา *Penicillium digitatum* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในพืช ได้มากกว่า 80% ของการเจริญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Leelasuphakul และคณะ, 2008) จึงสามารถบอกได้ว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่เจือจางแล้วยังสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ ดังนั้นการศึกษาหาความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญของราจึงมีความสำคัญ

เมื่อทดสอบโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้กับสปอร์ของรา *C. lunata* แล้วศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าในชุดควบคุมซึ่งไม่ใส่โปรตีนบริสุทธิ์ มีการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยราได้ปกติ เส้นใยจะมีลักษณะงอกยาวเป็นเส้นตรงออกไป และเมื่อสังเกตในชุดทดสอบพบว่าสปอร์ของรา *C. lunata* สามารถงอกได้ แต่เส้นใยที่เจริญนั้นเกิดการบวมและมีการโป่งพอง ดังแสดงในรูปที่ 4.28 [b] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu และคณะ (Liu และคณะ, 2010) ที่พบว่าเมื่อทดสอบการงอกของเส้นใยรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* กับโปรตีน E2 จะเห็นว่าโปรตีน E2 ทำให้การงอกของเส้นใยราผิดปกติ เช่นที่ปลายเส้นใยบวมและหนา และเส้นใยย่น, บวม และบิดเบี้ยว แสดงว่าโปรตีนที่ใช้ทดสอบกับราสามารถยับยั้งการเจริญของราได้

จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* N3 สามารถผลิตสารออกมายับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในกล้วยไม้ได้ โดยสารที่พบนั้นเป็นสารทางชีวภาพที่น่าจะมีความเป็นมิตรต่อ

สิ่งแวดล้อมและผู้ใช้ และสามารถนำตัวเซลล์แบคทีเรีย, น้ำเลี้ยงเชื้อ, หรือโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ ไปพัฒนาและใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อการเกษตรได้ต่อไป อย่างไรก็ดีควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวเป็นสารชนิดใดและมีกลไกการยับยั้งราได้อย่างไร รวมทั้งมีโทษต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นหรือไม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมส่งเสริมการเกษตร. โรคที่สำคัญและการป้องกันกำจัด. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://orchidnet.doae.go.th/home/technic_orchid.php?c=1&d=20&id=90#dissea 3 [2554, มกราคม 3]

คงยุทธ เลิศมงคลธรรม. (2549). การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งราที่ก่อโรคพืช. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ครรชิต ธรรมศิริ (2547). เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. กรุงเทพฯ: อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

เจตน์ มีญาณเยี่ยม (2009). ส่งออกกล้วยไม้ “หมื่นล้านไม่ได้ไกลเกินเอื้อม”. ใน TAFA Newsletter, pp. 3-4.

ตลาดกลางสินค้าเกษตรแห่งประเทศไทย. กล้วยไม้. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.talaadthai.com/web/resource/detail.asp?groupid=6&subjectid=253& pageno= [2554, มกราคม 1]

บริษัท BSNcenter จำกัด. ก. เกษตรฯ กำหนดยุทธศาสตร์กล้วยไม้เพิ่มยอดส่งออก 3 พันล้านบาท. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.bsnnews.com/news/index.php? NewsID=3498 [2554, มกราคม 1]

เปรม ณ สงขลา (2553). การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและการส่งออกกล้วยไม้ไทย. ในโครงการเกษตรสร้างชาติ การอบรมสัมมนา กล้วยไม้เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิต.นครปฐม: ห้องประชุมสถาบันกันตนา กันตนา มูฟวี่ทาวน์ ศาลายา.

เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล (2551). ร้อยพรรณพฤกษา กล้วยไม้ 2. กรุงเทพฯ: เศรษฐศิลป์.

เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล (2552). ร้อยพรรณพฤกษา กล้วยไม้ดอกหอม. กรุงเทพฯ: เศรษฐศิลป์.

สมบัติ รักไพบูลย์สมบัติ (2540). ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้จากประสบการณ์. กรุงเทพฯ: ธรรมสาร.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล (2520). โรคและศัตรูไม้ประดับ. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิช.

อุไร จิรมงคลการ (2548). มือใหม่หัดปลูกกล้วยไม้. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน.

ภาษาอังกฤษ

Alvindia, D. G., and Natsuaki, K. T. (2009). Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. Crop Protection 28, 236-242.

Bardas, G. A., Lagopodi, A. L., Kadoglidou, K., and Tzavella-Klonari, K. (2009). Biological control of three *Colletotrichum lindemuthianum* races using *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 and *Pseudomonas fluorescens* WCS365. Biological Control 49, 139-145.

Barefoot, S. F., and Klaenhammer, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology 45, 1808-1815.

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Reviews Microbiology 3, 238-250.

Brunskole, M., et al. (2008). Towards the first inhibitors of trihydroxynaphthalene reductase from *Curvularia lunata*: synthesis of artificial substrate, homology modelling and initial screening. Bioorganic & Medicinal Chemistry 16, 5881-5889.

Brunskole, M., et al. (2009). Trihydroxynaphthalene reductase of *Curvularia lunata*--a target for flavonoid action? Chemico-Biological Interactions 178, 259-267.

Cabrera, M. G., Galmarini, M. R., and Flachsland, E. (2003). *Colletotrichum gloeosporioides*, pathogen of orchids in the northeast of Argentina. Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia (CATIE) 68, 57-61.

Caldeira, A. T., Feio, S. S., Arteiro, J. M. S., and Roseiro, J. C. (2006). Antimicrobial activity of steady-state cultures of *Bacillus* sp. CCMI 1051 against wood contaminant fungi. Biochemical Engineering Journal 30, 231-236.

Carissimi, M., Giraudo, M. S., Germani, J. C., and Van Der Sand, S. T. (2009). Antifungal activity of *Bacillus* sp. E164 against *Bipolaris sorokiniana*. Bioci ncias (On-line) 17.

Chan, Y. K., Mccormick, W. A., and Seifert, K. A. (2003). Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. Canadian Journal of Microbiology 49, 253-262.

Chan, Y. L., et al. (2005). Gene stacking in *Phalaenopsis* orchid enhances dual tolerance to pathogen attack. Transgenic Research 14, 279-288.

Chang, W. T., Chen, Y. C., and Jao, C. L. (2007). Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. Bioresource Technology 98, 1224-1230.

Chapin, L. J. G., Wang, Y., Lutton, E., and Gardener, B. B. M. (2006). Distribution and fungicide sensitivity of fungal pathogens causing anthracnose-like lesions on tomatoes grown in Ohio. Plant Disease 90, 397-403.

Chen, X. H., et al. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. Journal of Biotechnology 140, 27-37.

Cho, K. M., et al. (2009). Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (*kanjang*) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. Food Control 20, 402-406.

Cho, S. J., Lee, S. K., Cha, B. J., Kim, Y. H., and Shin, K. S. (2003). Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. FEMS Microbiology Letters 223, 47-51.

Collins, D. O., Reynolds, W. F., and Reese, P. B. (2002). Aromadendrane transformations by *Curvularia lunata* ATCC12017. Phytochemistry 60, 475-481.

Cook, R. J., and Baker, K. F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Deising, H. B., Werner, S., and Wernitz, M. (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. Microbes and Infection 2, 1631-1641.

Export of Thailand Classified by Commodity. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www2.ops3.moc.go.th/hs/export_commodity/report.asp [2554, มกราคม 1]

Fickers, P., et al. (2008). Temperature dependence of mycosubtilin homologue production in *Bacillus subtilis* ATCC6633. Research in Microbiology 159, 449-457.

Genckal, H., and Tari, C. (2006). Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. Enzyme and Microbial Technology 39, 703-710.

Ghosh, S., Penterman, J. N., Little, R. D., Chavez, R., and Glick, B. R. (2003). Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. Plant Physiology and Biochemistry 41, 277-281.

Gong, M., et al. (2006). Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY 1 *in vitro* and identification of its antifungal substance (Iturin A). Acta Biochimica et Biophysica Sinica 38, 233-240.

Han, J. S., et al. (2005). Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua. Journal of Applied Microbiology 99, 213-221.

Isaac, S. (1992). Fungal plant interaction. London: Chapman and Hall Press.

Jetiyanon, K. (2007). Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens. Biological Control 42, 178-185.

Joshi, S., Bharucha, C., and Desai, A. J. (2008). Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. Bioresource Technology 99, 4603-4608.

Kavitha, S., Senthilkumar, S., Gnanamanickam, S., Inayathullah, M., and Jayakumar, R. (2005). Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. Process Biochemistry 40, 3236-3243.

Khan, S. H., Aked, J., and Magan, N. (2001). Control of the anthracnose pathogen of banana (*Colletotrichum musae*) using antioxidants alone and in combination with thiabendazole or imazalil. Plant Pathology 50, 601-608.

Kim, P. I., and Chung, K. C. (2004). Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. FEMS Microbiology Letters 234, 177-183.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P., and Phongpaichit, S. (2006). Purification, characterization and synergistic activity of beta-1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. Enzyme and Microbial Technology 38, 990-997.

Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., and Chuenchitt, S. (2008). Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest Biology and Technology 48, 113-121.

Leifert, C., et al. (1995). Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. Journal of Applied Bacteriology 78, 97-108.

Lewinstein, I., Matalon, S., Slutzkey, S., and Weiss, E. I. (2005). Antibacterial properties of aged dental cements evaluated by direct-contact and agar diffusion tests. The Journal of Prosthetic Dentistry 93, 364-371.

Li, Q. q., et al. (2006). Purification of two antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* strain B11 and their properties. Agricultural Sciences in China 5, 363-369.

Liu, B., Huang, L. L., Buchenauer, H., and Kang, Z. S. (2010). Isolation and partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4. Pesticide Biochemistry and Physiology 98, 305-311.

Liu, W. W., Mu, W., Zhu, B. Y., Du, Y. C., and Liu, F. (2008). Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. Agricultural Sciences in China 7, 1104-1114.

Liu, X. P., et al. (2007a). *In vitro* inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. International Journal of Food Microbiology 119, 223-229.

Liu, Y., et al. (2007b). Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. Peptides 28, 553-559.

Lowe, S. E., et al. (1997). The effect of carbon source, temperature and aeration on the production of ascosteroside, a novel antifungal agent, by *Ascotricha amphitricha*. Journal of Antibiotic (Tokyo) 50, 412-417.

Mari, M., Bertolini, P., and Pratella, G. C. (2003). Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. Journal of Applied Microbiology 94, 761-766.

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., and Drosinos, E. H. (2003). Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. Meat Science 64, 265-271.

Mizumoto, S., and Shoda, M. (2007). Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. Applied Microbiology and Biotechnology 76, 101-108.

Moita, C., Feio, S. S., Nunes, L., Curto, M. J. M., and Roseiro, J. C. (2005). Optimisation of physical factors on the production of active metabolites by *Bacillus subtilis* 355 against wood surface contaminant fungi. International Biodeterioration & Biodegradation 55, 261-269.

Morikawa, M. (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. Journal of Bioscience and Bioengineering 101, 1-8.

Munoz, Z., Moret, A., and Garces, S. (2009). Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. Crop Protection 28, 36-40.

Muthukumar, A., Eswaran, A., Nakkeeran, S., and Sangeetha, G. (2010). Efficacy of plant extracts and biocontrol agents against *Pythium aphanidermatum* inciting chilli damping-off. Crop Protection 29, 1483-1488.

Ogata, K., et al. (1997). Construction of a *Fibrobacter succinogenes* genomic map and demonstration of diversity at the genomic level. Current Microbiology 35, 22-27.

Oh, B. J., et al. (1999). A cytochrome P450 gene is differentially expressed in compatible and incompatible interactions between pepper (Capsicum annuum) and the anthracnose fungus, Colletotrichum gloeosporioides. Molecular Plant-Microbe Interactions 12, 1044-1052.

Phoulivong, S., et al. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. Fungal Diversity 44, 33-43.

Plonka, P. M., and Grabacka, M. (2006). Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects. Acta Biochimica Polonica 53, 429-443.

Prom, L. K., Waniska, R. D., Kollo, A. I., and Rooney, W. L. (2003). Response of eight sorghum cultivars inoculated with *Fusarium thapsinum*, *Curvularia lunata*, and a mixture of the two fungi. Crop Protection 22, 623-628.

Ramey, B. E., Koutsoudis, M., von Bodman, S. B., and Fuqua, C. (2004). Biofilm formation in plant-microbe associations. Current Opinion in Microbiology 7, 602-609.

Romero, D., et al. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. Molecular Plant-Microbe Interactions 20, 430-440.

Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual 3edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

San-Lang, W., et al. (2002). Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. Enzyme and Microbial Technology 31, 321-328.

Sharma, N., and Sharma, S. (2008). Control of foliar diseases of mustard by *Bacillus* from reclaimed soil. Microbiological Research 163, 408-413.

Snook, M. E., Mitchell, T., Hinton, D. M., and Bacon, C. W. (2009). Isolation and characterization of Leu7-surfactin from the endophytic bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a biocontrol agent for *Fusarium verticillioides*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 4287-4292.

Strom, K., Sjogren, J., Broberg, A., and Schnurer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. Applied and Environmental Microbiology 68, 4322-4327.

Sun, L., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., and Yang, S. (2006). Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22, 1259-1266.

Taborda, C. P., da Silva, M. B., Nosanchuk, J. D., and Travassos, L. R. (2008). Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. Mycopathologia 165, 331-339.

Tendulkar, S. R., et al. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. Journal of Applied Microbiology 103, 2331-2339.

Than, P. P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P. W., and Hyde, K. D. (2008). Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. Journal of Zhejiang University Science B 9, 764-778.

Thasana, N., et al. (2010). *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtulene A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated [beta]-amino acid. FEBS Letters 584, 3209-3214.

Theis, T., Marx, F., Salvenmoser, W., Stahl, U., and Meyer, V. (2005). New insights into the target site and mode of action of the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. Research in Microbiology 156, 47-56.

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Biagianti, S., and Aziz, A. (2008). Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. Environmental and Experimental Botany 64, 21-32.

Walls, D., Loughran, S. T., Cummins, P. M., Dowling, O., and O' Connor, B. F. (2011). Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. In Protein Chromatography, pp. 215-228: Humana Press.

Watanabe, T. (2002). Pictorial atlas of soil and seed fungi morphologies of cultured fungi and key species, 2 edn. Boca Raton: CRC Press.

Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., and Shirata, A. (2001). Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. Phytopathology 91, 181-187.

Zhao, Z. Z., et al. (2010). Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. Bioresource Technology 101, 292-297.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลว Nutrient Broth (NB)

แบคโตเปบโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 N NaOH แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลว luria broth (LB)

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 N NaOH แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเหลว tryptic soy broth (TSB)

อาหารสำเร็จรูป TSB (tryptic soy broth)	30	กรัม
Difco Laboratories, USA		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7 แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารแข็ง Nutrient Agar (NA)

แบคโตเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 N NaOH แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB)

อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) Himedia, India	24	กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้มีค่าประมาณ 5.1-5.3 แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) Himedia, India	24	กรัม
Agar	15	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้มีค่าประมาณ 5.1-5.3 แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหารแข็ง luria agar (LA)

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมสารตามลำดับ (ยกเว้นผงวุ้น) ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 N NaOH เติมผงวุ้น แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์

นำกลีเซอรอล 87 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 17.24 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่น 82.76 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Tween 20 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

ดูด Tween 20 มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. บีโนมิล (Benomyl) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายบีโนมิล (Sigma, Germany) 0.002 กรัม ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (Dimethyl formamide) 1 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาให้พ้นแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ให้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. นิสทาทิน (Nystatin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายนิสทาทิน 1 มิลลิกรัม ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (Dimethyl formamide) 1 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาให้พ้นแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์

นำสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาผสมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลายเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

7. สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH เท่ากับ 7.5

ละลาย Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$) 121 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เข้ากัน และวัดค่า pH ให้เท่ากับ 7.5 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้ให้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์

8. กลีเซอรอล ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH เท่ากับ 7.5

นำกลีเซอรอล 87 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 345 มิลลิลิตร ผสมใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH เท่ากับ 7.5 ปริมาตร 655 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

9. สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งเอทาลีนไดเอมีนเตตระแอซิติกแอซิด (EDTA) 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

10. แอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

นำแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 21 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 79 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH เท่ากับ 7.5

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 46.8 กรัม ละลายใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH เท่ากับ 7.5 ปริมาตร 800 มิลลิลิตร

12. สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH เท่ากับ 8.8

ละลาย Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$) 181.71 กรัม ในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ด้วยกรดไฮโรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วคนให้เข้ากัน วัดค่า pH ให้เท่ากับ 8.8 เติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่งโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (ปฏิบัติในตู้ดูดควัน) น้ำหนัก 10 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

14. สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไทโครฟิวจ์ที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อลงไป 1 มิลลิลิตร ละลายจนหมด

15. สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH เท่ากับ 6.8

ละลาย Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$) 60.57 กรัม ในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ด้วยกรดไฮโรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วคนให้เข้ากัน วัดค่า pH ให้เท่ากับ 6.8เติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

16. สารละลา10X อิเล็กโทรดบัฟเฟอร์

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	30	กรัม
ไกลซีน (Glycine)	145	กรัม
SDS	10	กรัม

แยกละลายสารทั้งสามชนิดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมารวมกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้นำมาเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

17. 2X Laemmli buffer

กลีเซอรอล 87 เปอร์เซ็นต์	2.29	มิลลิลิตร
สารละลาย Tris-HCl pH6.8	1.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ	2.71	มิลลิลิตร
บรอมฟีนอลบลู	0.001	กรัม
10% SDS	4.00	มิลลิลิตร

ผสมสารทุกชนิดเจ้าด้วยกัน และนำไปเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ผสม 2-เมอร์แคบโตเอทานอล ในอัตราส่วน สารละลาย 950 ไมโครลิตร ต่อ 50 ไมโครลิตร 2- เมอร์แคบโตเอทานอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

18. สารละลายสำหรับย้อมสี (staining solution)

สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 250	2	กรัม
เอทานอล	400	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

19. **สารละลายสำหรับล้างสี** (destaining solution)

เอทานอล	400	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

20. **สารละลายผสมของ** dNTPs

ผสม dATP, dGTP, dCTP และ dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ชนิดละ 10 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

21. **บัฟเฟอร์** 50X TAE

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	121	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	28.55	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดประจุ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

22. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งเอธิเดียมโบรไมด์ 0.1 มิลลิกรัม จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ 100 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดมิดชิด แล้วเก็บให้พ้นแสง

23. แอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งแอมพิซิลลิน 1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมครอน เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

24. สารละลายที่ 1 สำหรับการสกัดพลาสมิดด้วยวิธีแอลคาไลน์ไลซิส (Alkaline lysis)

ซูโครส (sucrose) ความเข้มข้น 1 โมลาร์	5	ไมโครลิตร
Tris-HCl บัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH8.0	50	ไมโครลิตร
EDTA 0.5 โมลาร์ pH8.0	20	ไมโครลิตร

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จนมีปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

25. สารละลายที่ 2 สำหรับการสกัดพลาสมิดด้วยวิธีแอลคาไลน์ไลซิส (Alkaline lysis)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์	1,000	ไมโครลิตร
10% SDS	500	ไมโครลิตร

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ จนมีปริมาตรเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

26. สารละลายที่ 3 สำหรับการสกัดพลาสมิดด้วยวิธีแอลคาไลน์ไลซิส (Alkaline lysis)

ละลายโซเดียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มิลลิลิตร นำไปปรับค่า pH ให้เป็น 4.8 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

27. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

Buffer P1

Buffer P2

Buffer N3

Buffer PB

Biffer PE

RNase A

Collection tube

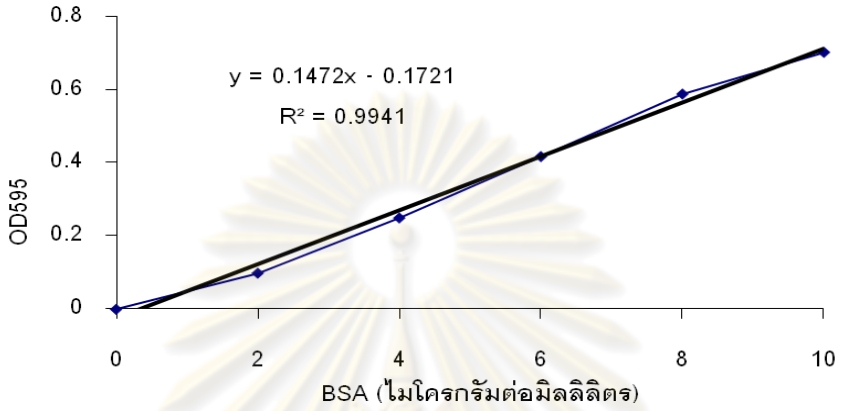
Qiaprep Spin column

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

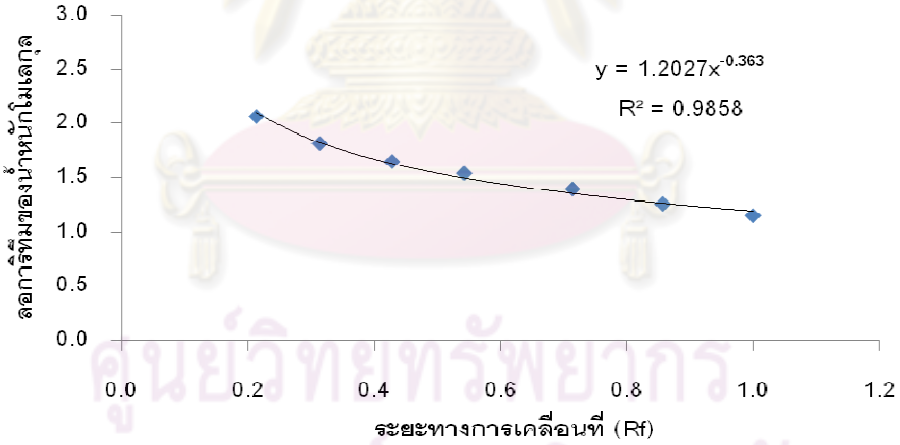
ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเติม absolute ethanol ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงใน Buffer PE

ภาคผนวก ค

1. กราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 1.2-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



2. การเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

1. ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของแบคทีเรีย N3 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	E value	Max ident	reference
HQ423381.1	*Bacillus subtilis* strain P6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	Rao, D. L. and Saxena, M. B., 2010
HQ327126.1	*Bacillus subtilis* strain TP-Snow-C17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	Zhao, M. and Ma, X., 2010
HQ328857.1	*Bacillus subtilis* strain CSY191 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	Cho, *et.al., 2010*
GU121487.1	*Bacillus subtilis* strain NEB 44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	Pandey,A., *et.al., 2010*
HQ236066.1	*Bacillus subtilis* strain TAT1-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	Wang,P., *et.al., 2010*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย N3 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

gb|HQ423381.1| *Bacillus subtilis* strain P6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1462

Score = 1186 bits (1314), Expect = 0.0

Identities = 659/660 (99%), Gaps = 0/660 (0%)

Strand=Plus/Minus

```
Query  1     ACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCG  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1456  ACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCG  1397

Query  61    ACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAATGT  120
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  1396  ACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT  1337

Query  121   ATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1336  ATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTG  1277

Query  181   CAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1276  CAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCT  1217

Query  241   GCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATT  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1216  GCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATT  1157

Query  301   TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1156  TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTG  1097

Query  361   AATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1096  AATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG  1037

Query  421   ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTAT  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1036  ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTAT  977

Query  481   CTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAA  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  976   CTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAA  917

Query  541   ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  916   ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA  857

Query  601   CCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCC  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  856   CCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCC  797
```

gb|HQ327126.1| *Bacillus subtilis* strain TP-Snow-C17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1511

Score = 1186 bits (1314), Expect = 0.0

Identities = 659/660 (99%), Gaps = 0/660 (0%)

Strand=Plus/Minus

```
Query  1     ACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCG  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1496  ACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCG  1437

Query  61    ACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAATGT  120
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  1436  ACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT  1377

Query  121   ATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1376  ATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTG  1317

Query  181   CAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1316  CAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCT  1257

Query  241   GCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATT  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1256  GCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATT  1197

Query  301   TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1196  TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTG  1137

Query  361   AATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1136  AATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG  1077

Query  421   ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTAT  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1076  ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTAT  1017

Query  481   CTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAA  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1016  CTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAA  957

Query  541   ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  956   ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA  897

Query  601   CCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCC  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  896   CCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCC  837
```

gb|HQ328857.1| *Bacillus subtilis* strain CSY191 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1532

Score = 1186 bits (1314), Expect = 0.0

Identities = 659/660 (99%), Gaps = 0/660 (0%)

Strand=Plus/Minus

```
Query  1     ACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCG  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1504  ACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCG  1445

Query  61    ACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAATGT  120
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  1444  ACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT  1385

Query  121   ATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1384  ATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTG  1325

Query  181   CAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1324  CAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCT  1265

Query  241   GCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATT  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1264  GCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATT  1205

Query  301   TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1204  TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTG  1145

Query  361   AATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1144  AATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG  1085

Query  421   ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTAT  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1084  ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTAT  1025

Query  481   CTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAA  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1024  CTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAA  965

Query  541   ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  964   ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA  905

Query  601   CCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCC  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  904   CCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCC  845
```

ภาคผนวก จ

1. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* โดยวิธี DMRT

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
conc	1.00	250.00	4
	2.00	125.00	4
	3.00	62.50	4
	4.00	31.25	4
	5.00	15.62	4
	6.00	7.81	4

Descriptive Statistics

Dependent Variable:Inhibition1

conc	Mean	Std. Deviation	N
250.00	10.3375	.11815	4
125.00	9.5000	.57735	4
62.50	6.5000	.57735	4
31.25	5.7500	.28868	4
15.62	5.0000	.70711	4
7.81	.0000	.00000	4
Total	6.1813	3.46729	24

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

Dependent Variable:Inhibition1

F	df1	df2	Sig.
7.251	5	18	.001

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + conc

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Inhibition1

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	272.717[a]	5	54.543	258.917	.000
Intercept	916.988	1	916.988	4352.937	.000
conc	272.717	5	54.543	258.917	.000
Error	3.792	18	.211		
Total	1193.498	24			
Corrected Total	276.509	23			

a. R Squared = .986 (Adjusted R Squared = .982)

Estimated Marginal Means

conc

Dependent Variable:Inhibition1

conc	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
250.00	10.338	.229	9.855	10.820
125.00	9.500	.229	9.018	9.982
62.50	6.500	.229	6.018	6.982
31.25	5.750	.229	5.268	6.232
15.62	5.000	.229	4.518	5.482
7.81	-1.776E-15	.229	-.482	.482

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Inhibition1

Duncan[a,,b]

conc	N	Subset 1	2	3	4	5	6
7.81	4	.0000					
15.62	4		5.0000				
31.25	4			5.7500			
62.50	4				6.5000		
125.00	4					9.5000	
250.00	4						10.3375
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .211.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

b. Alpha = .05.

2. **การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการหาความเข้มข้นต่ำสุด** (MIC) **ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา** *C. lunata* **โดยวิธี** DMRT

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
conc	1.00	250.00	4
	2.00	125.00	4
	3.00	62.50	4
	4.00	31.25	4
	5.00	15.62	4
	6.00	7.81	4
	7.00	3.90	4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Descriptive Statistics

Dependent Variable:Inhibition2

conc	Mean	Std. Deviation	N
250.00	10.0000	.43970	4
125.00	9.0000	.24495	4
62.50	8.6000	.45461	4
31.25	8.0000	.45644	4
15.62	7.0000	.40825	4
7.81	5.0000	.00000	4
3.90	.0000	.00000	4
Total	6.8000	3.21815	28

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

Dependent Variable:Inhibition2

F	df1	df2	Sig.
3.594	6	21	.013

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + conc

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Inhibition2

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	277.120[a]	6	46.187	387.194	.000
Intercept	1294.720	1	1294.720	10853.940	.000
Conc	277.120	6	46.187	387.194	.000
Error	2.505	21	.119		
Total	1574.345	28			
Corrected Total	279.625	27			

a. R Squared = .991 (Adjusted R Squared = .988)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Estimated Marginal Means

Conc

Dependent Variable:Inhibition2

conc	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
250.00	10.000	.173	9.641	10.359
125.00	9.000	.173	8.641	9.359
62.50	8.600	.173	8.241	8.959
31.25	8.000	.173	7.641	8.359
15.62	7.000	.173	6.641	7.359
7.81	5.000	.173	4.641	5.359
3.90	.000	.173	-.359	.359

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Inhibition2

Duncan[a,,b]

conc	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
3.90	4	.0000					
7.81	4		5.0000				
15.62	4			7.0000			
31.25	4				8.0000		
62.50	4					8.6000	
125.00	4					9.0000	
250.00	4						10.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.116	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .119.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

b. Alpha = .05.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของโปรตีนบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. lunata* โดยวิธี DMRT

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
conc	1.00	100.00	4
	2.00	50.00	4
	3.00	25.00	4
	4.00	12.50	4
	5.00	6.25	4
	6.00	3.12	4
	7.00	1.56	4

Descriptive Statistics

Dependent Variable:inhibition2

conc	Mean	Std. Deviation	N
100.00	9.5000	.57735	4
50.00	6.0000	.81650	4
25.00	5.0000	.70711	4
12.50	4.1250	.25000	4
6.25	2.0000	.40825	4
3.12	1.1250	.14434	4
1.56	.0000	.00000	4
Total	3.9643	3.09922	28

Levene's Test of Equality of Error Variances[a]

Dependent Variable:inhibition2

F	df1	df2	Sig.
1.991	6	21	.113

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + conc

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:inhibition2

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	254.089[a]	6	42.348	169.393	.000
Intercept	440.036	1	440.036	1760.143	.000
conc	254.089	6	42.348	169.393	.000
Error	5.250	21	.250		
Total	699.375	28			
Corrected Total	259.339	27			

a. R Squared = .980 (Adjusted R Squared = .974)

Estimated Marginal Means

Conc

Dependent Variable:inhibition2

conc	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
100.00	9.500	.250	8.980	10.020
50.00	6.000	.250	5.480	6.520
25.00	5.000	.250	4.480	5.520
12.50	4.125	.250	3.605	4.645
6.25	2.000	.250	1.480	2.520
3.12	1.125	.250	.605	1.645
1.56	2.220E-16	.250	-.520	.520

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

inhibition2

Duncan[a.,b]

conc	N	Subset 1	2	3	4	5	6	7
1.56	4	.0000						
3.12	4		1.1250					
6.25	4			2.0000				
12.50	4				4.1250			
25.00	4					5.0000		
50.00	4						6.0000	
100.00	4							9.5000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .250.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

b. Alpha = .05.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรพีวรรณ โสวรรณปรีชา เกิดเมื่อวันที่ 13 มกราคม 2528 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 ที่อยู่ปัจจุบัน 41/11 ซอยเจริญกรุง 109 ถนนเจริญกรุง แขวง-เขต บางคอแหลม กรุงเทพมหานคร 10120

งานวิจัยนี้ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7 ระหว่างวันที่ 7 - 8 ธันวาคม 2553 ในชื่อเรื่อง การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Curvularia lunata* ซึ่งก่อโรคในกล้วยไม้ และได้รับรางวัลผลงานวิชาการดีเด่น ประเภทการนำเสนอภาคบรรยาย สาขาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย