รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ *Bacillus* sp. ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ที่คัดแยกจากดินป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี

Study on draft genome sequence of *Bacillus* sp. against pathogenic microorganisms isolated from mangrove forest soil, Chonburi Province

คณะผู้วิจัย

อลิสา เทียมสกุล

รวิวรรณ วัฒนดิลก

โครงการวิจัยประเภททุนอุดหนุนการวิจัยและนวัตกรรม

งบประมาณเงินอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ส่วนงาน ประจำปีงบประมาณ 2567

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (draft genome) ของเชื้อกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี และระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, และ *Candida albicans* รวมถึงศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากการคัดแยกเชื้อกลุ่ม *Bacillus* จำนวน 14 ไอโซเลท พบว่าสารสกัดหยาบของเชื้อจากไอโซเลท A1-3 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งสามชนิด เมื่อประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (MBC) ด้วยวิธีวิธีเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแบบไมโคร พบว่าสารสกัดจากเชื้อ A1-3 มีฤทธิ์ยับยั้งต่อ *C. albicans* โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 50,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* มีค่า MIC และ MBC มากกว่า 50,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การระบุสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rRNA แสดงให้เห็นว่าเชื้อ A1-3 มีความใกล้เคียงกับ *Halobacillus mangrovi* 99.52% และเมื่อทำการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *H. mangrovi* โดยมีค่าความเชื่อมั่น (bootstrap value) 97% กับเชื้อ *H. mangrovi* อีกทั้งยังสอดคล้องกับการวิเคราะห์ draft genome ที่บ่งชี้ความเหมือนของสายพันธุ์ (Homologous species) ด้วยโปรแกรม Nr Annotation พบว่าเชื้อ A1-3 มีลำดับโปรตีนที่เหมือนกับ *H. mangrovi* 86.29% นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์จีโนมด้วยโปรแกรม antiSMASH พบว่าจีโนมของเชื้อ *H. mangrovi* มีกลุ่มยีนที่สามารถสังเคราะห์สารทุติยภูมิ กลุ่ม Terpene บริเวณ Region 1.4 โดยมีลำดับยีนและโครงสร้างที่เหมือนกับลำดับยีนของเชื้อ *Halobacillus halophilus* DSM 2266 ในฐานข้อมูล BGCs (MIBiG accession number: BGC0000645) ที่มีค่า % similarity เท่ากับ 100% การค้นพบกลุ่มยีนสังเคราะห์สารกลุ่ม Terpene นี้สนับสนุนผลการทดลององค์ประกอบเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งสามชนิดด้วยวิธี TLC-Bioautography ซึ่งตำแหน่งของสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เมื่อตรวจสอบด้วย anisaldehyde-sulfuric acid แสดงว่าเป็นสารกลุ่ม terpene หรือ terpenoid ข้อมูล draft genome ของเชื้อ *H. mangrovi* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งสามชนิดนี้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลระดับยีน เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาต่อยอดสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติโดยใช้องค์ความรู้ด้านพันธุวิศวกรรม ซึ่งอาจเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อดื้อยาในปัจจุบัน

คำสำคัญ: *Bacillus* sp.,จีโนม, สารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

Abstract

This research focused on studying the draft genome of a *Bacillus* species isolated from mangrove sediment in Chonburi Province, Thailand. The objective was to identify genes associated with the production of antimicrobial substances that affect against three pathogenic microorganisms: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*. Additionally, the study examined the preliminary composition of compounds that inhibit these microorganisms. Out of 14 *Bacillus* isolates tested, the crude extract from isolate A1-3 showed inhibitory activity against all three pathogens. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were evaluated using the broth micro dilution method. The results revealed that the crude extract from isolate A1-3 inhibited *C. albicans* with MIC and MBC values of 50,000 µg/ml. For *E. coli* and *S. aureus*, the MIC and MBC values exceeded 50,000 µg/ml. The analysis of the 16S rRNA gene sequence identified isolate A1-3 as being closely related to *Halobacillus mangrovi*, with a 99.52% sequence identity. A phylogenetic tree indicated a close relationship with *H. mangrovi* with 97% bootstrap support.

Additionally, draft genome analysis indicated a similarity with homologous species using the Nr Annotation program, revealing that isolate A1-3 shared 86.29% protein sequence identity with *H. mangrovi*. Further genomic analysis using the antiSMASH program identified gene clusters in the *H. mangrovi* genome that are capable of synthesizing Terpene-group secondary metabolites, particularly within Region 1.4. These gene sequences and structures were found to be identical to those of *Halobacillus halophilus* DSM 2266 in the BGCs database (MIBiG accession number: BGC0000645), with a 100% similarity. The identification of these terpene biosynthetic gene clusters supports preliminary findings from TLC-Bioautography, which indicated the presence of active compounds that inhibit all three pathogens. The active compound spots, visualized with anisaldehyde-sulfuric acid, suggest that they belong to the terpene or terpenoid group. The draft genome data of *H. mangrovi*, which is related to the production of active compounds that inhibit three specific pathogens, can serve as a gene-level database. This information can guide the further development of natural active compounds using genetic engineering techniques. Such an approach may provide a new alternative for treating diseases caused by drug-resistant pathogens.

Keywords: *Bacillus* sp., Genome, Antimicrobial substances

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนด้านทุนวิจัยจากโครงการทุนอุดหนุนการวิจัยและนวัตกรรม ประเภทงบประมาณเงินอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ส่วนงาน สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 ตามเอกสารสัญญาเลขที่ 001/2567 ซึ่งมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการขับเคลื่อนการศึกษาเชิงลึกในระดับจีโนมของเชื้อแบคทีเรียจากระบบนิเวศป่าชายเลน เพื่อค้นหาสารสกัดจากธรรมชาติที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีความดื้อยา เพื่อเป็นข้อมูลสำคัญในการพัฒนายารักษาโรคที่มีประสิทธิภาพสูง ลดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย และส่งเสริมการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมอย่างยั่งยืนผ่านการประยุกต์ใช้ความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่เล็งเห็นถึงความสำคัญของงานวิจัยนี้และให้การสนับสนุนอย่างต่อเนื่อง รวมถึงคณะทำงานวิจัยของสถาบันฯ ที่ได้ทุ่มเททั้งแรงกายและแรงใจ อุทิศตนเพื่อให้งานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ตามเป้าหมายที่วางไว้ ความร่วมมือและการสนับสนุนจากทุกฝ่ายเป็นพลังสำคัญที่ทำให้งานวิจัยนี้สามารถบรรลุผลสำเร็จได้ด้วยดี

อลิสา เทียมสกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย
วันที่ 15 สิงหาคม 2568

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
อักษรย่อ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	8
ขอบเขตของโครงการวิจัย	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	10
1. การเก็บตัวอย่างดินและแหล่งเก็บตัวอย่างดิน	10
2. การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสจากดินในพื้นที่ป่าชายเลน	10
3. การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเซลล์แบคทีเรียการทดสอบฤทธิ์ชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อบาซิลลัสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยวิธี Agar well Diffusion	10
4. การทดสอบฤทธิ์ชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อบาซิลลัสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยวิธี Agar well diffusion	11
5. การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ A1-3	12
6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ A1-3	12
7. การศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค	13
8. ประเมินค่าความเข้มข้นของสารสกัดออกฤทธิ์ในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC: minimal inhibitory concentration) ด้วยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method)	14

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
9. ประเมินค่าความเข้มข้นของสารสกัดออกฤทธิ์ในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC: minimum bactericidal concentration)	15
10. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ A1-3	15
11. การวิเคราะห์ทางสถิติ	18
บทที่ 3 ผลการวิจัย	19
1. การคัดแยกเชื้อกลุ่มบาซิลลัสจากดินป่าชายเลน	19
2. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเชื้อบาซิลลัสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค	23
3. การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ A1-3	25
4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ A1-3	27
5. การศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค	32
6. ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัด A1-3	36
7. การระบุชนิดของเชื้อ A1-3	37
8. ข้อมูลจีโนมทั้งหมด (Draft genome) ของเชื้อ A1-3	38
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	42
เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก	54
ภาคผนวก ก ภาพการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค	55
ภาคผนวก ข วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	57
ประวัตินักวิจัยและผู้ร่วมวิจัย	62

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะโคโลนีเชื้อ A1-3 ที่เจริญบนอาหารแข็งต่างชนิดกัน	25
2	แสดงรูปลักษณะสัณฐานเชื้อ A1-3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	25
3	จำนวนเชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงในอาหารต่างชนิด	27
4	สารสกัดจากเชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (NB) และ Marine broth เติม NaCl 3% (w/v) (MB) ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus, E. coli* และ *C. albicans*	29
5	แสดง TLC Chromatogram ของสารสกัดจากเชื้อ A1-3 ตรวจสอบภายใต้รังสี UV	31
6	แสดง TLC-bioautography ของสารสกัดจากเชื้อ A1-3 กับการต้าน เชื้อ *Staphylococcus aureus*	32
7	แสดง TLC-bioautography ของสารสกัดจากเชื้อ A1-3 กับการต้าน เชื้อ *Escherichia coli*	32
8	แสดง TLC-bioautography ของสารสกัดจากเชื้อ A1-3 กับการต้าน เชื้อ *Candida albicans*	33
9	แสดงตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และคุณสมบัติสาร terpene ของสารสกัดจากเชื้อ A1-3	33
10	แผนภูมิต้นไม้	35
11	การวิเคราะห์การกระจายสายพันธุ์ (Homologous species Distribution) ด้วยโปรแกรม Nr Annotation สีที่แตกต่างกันบ่งบอกถึงความแตกต่างของสปีชีย์	36
12	ข้อมูลกลุ่มยีนที่สร้างสารทุติยภูมิของเชื้อ *Halobaciilus halophilus DSM 2266* จากฐานข้อมูล MIBiG accession number: BGC0000645	37

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเตรียม PCR Mixture สำหรับการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA	14
2	รายละเอียดของขั้นตอนสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR	14
3	ลักษณะของเชื้อกลุ่มบาซิลลัสที่แยกได้จากดินป่าชายเลน	17
4	ขนาด Inhibition zone (มม.) ของสารสกัดจากเชื้อ Bacillus spp. จำนวน14 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 3 ชนิด	21
5	ขนาด Inhibition zone ของสารสกัดจากเชื้อ Bacillus sp. จำนวน 10 Isolates ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* และ *Staphylococcus aureus*	21
6	ความเค็มของอาหารแต่ละชนิด (ppt)	24
7	จำนวนโคโลนีของเชื้อ A1-3 ที่เจริญในอาหารเหลว 5 ชนิด	25
8	ลักษณะการเจริญของเชื้อ A1-3 ในอาหาร Nutrient broth + sea water และ Marine broth +3% NaCl (w/v) บ่มอุณหภูมิ 30°C และ 40°C	26
9	น้ำหนักเซลล์และสารสกัดของเชื้อ A1-3 ในอาหาร Nutrient broth ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลและ Marine broth ที่เติม NaCl 3% (w/v) เลี้ยงในอุณหภูมิ 30°C และ 40°C	27
10	ขนาด inhibition zone (มิลลิเมตร) ของสารสารสกัดจากเชื้อ A1-3 ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Candida albicans*	28
11	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบจากเชื้อ A1-3 และยาปฏิชีวนะต่อเชื้อก่อโรค	32
12	ข้อมูลจีโนมของเชื้อ A1-3	34
13	ตำแหน่งยีนที่สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ของเชื้อ A1-3	35

อักษรย่อ

มิลลิเมตร (มม.)

มิลลิลิตร (มล.)

องศาเซลเซียส (°C)

Minimum inhibitory concentration (MIC)

Minimum bactericidal concentration (MBC)

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในพืช สัตว์ และมนุษย์ ซึ่งเชื้อบางกลุ่มมีความสามารถในการหลบหลีกภูมิคุ้มกัน มีกลไกในการทำลายหรือขับยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์ ส่งผลให้เชื้อทนทานหรือดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Multiple drug resistance) เชื้อดื้อยา (Antimicrobial Resistance: AMR) ถือเป็นภัยคุกคามด้านสาธารณสุขระดับโลกที่ทวีความรุนแรงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งส่งผลกระทบอย่างมหาศาลต่อทั้งชีวิต สุขภาพ และเศรษฐกิจของประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก (Sitthiyot, 2021) ทั่วโลกมีการเสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาประมาณปีละ 7 แสนคน และคาดว่าในปี พ.ศ. 2593 การเสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาจะเพิ่มสูงถึง 10 ล้านคน (Hossain et al., 2023) ประเทศในทวีปเอเชียจะมีผู้เสียชีวิตมากที่สุด คือ 4.7 ล้านคน คิดเป็นผลกระทบทางเศรษฐกิจสูงถึงประมาณ 3.5 พันล้านล้านบาท (100 trillion USD) สำหรับประเทศไทยคาดว่ามีการติดเชื้อดื้อยาประมาณปีละ 88,000 ครั้ง เสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาประมาณ 38,000 ราย อยู่รักษาตัวในโรงพยาบาลนานขึ้น 3.24 ล้านวัน มูลค่ายาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาคิด เป็น 2,539-6,084 ล้านบาท สูญเสียทางเศรษฐกิจโดยรวมไม่ต่ำกว่า 40,000 ล้านบาทหรือประมาณร้อยละ 0.6 ของผลิตภัณฑ์มวลรวมในประเทศ (Gross Domestic Product : GDP) (Nirada Ruayajin, 2022) ผลกระทบนี้เน้นย้ำถึงความจำเป็นเร่งด่วนในการพัฒนากลยุทธ์เชิงรุกเพื่อลดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาและผลกระทบทางเศรษฐกิจที่ตามมาเชื้อดื้อยาที่มักพบบ่อยในการติดเชื้อในโรงพยาบาลได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* และ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Phumart et al., 2012) ดังนั้นโรคติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะในประเทศไทยจึงเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญและพบมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้มีการศึกษาค้นคว้าหาสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดใหม่จากแหล่งที่มีศักยภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่ผลิตจากเชื้อกลุ่มแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่มีสภาวะสุดขั้วซึ่งไม่เอื้อต่อสิ่งมีชีวิตรูปแบบอื่น เช่น พวก halophilic bacteria เป็นต้น

เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Halophilic bacteria ที่คัดแยกจากดินป่าชายเลน ได้รับความสนใจในการศึกษาเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากบริเวณพื้นที่ป่าชายเลนเป็นบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารและแร่ธาตุ มีความหลากหลายทางชีวภาพ และเป็นพื้นที่ที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็ม จึงมักพบเชื้อกลุ่ม Halophilic bacteria เจริญอยู่ เนื่องจากสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะดังกล่าวได้ (Venil et al., 2013) ในระหว่างที่เชื้อเจริญเติบโตภายใต้สภาวะสุดขั้ว เช่น อุณหภูมิร้อนจัด หรือเค็มจัด เชื้อมักจะสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites)

ที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น สารต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรค (Karim et al., 2019; Zhu et al., 2019) สารต้านอนุมูลอิสระ (Karim et al., 2019) เป็นต้น มีรายงานว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากดินป่าชายเลนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและราที่ก่อโรคได้ รวมถึงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมในมนุษย์ (adenocarcinoma) ในเซลล์เพาะเลี้ยง MCF-7 (Ramasubburayan et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียในสกุล (Genus) *Halobacillus* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และพืช อีกทั้งยังสามารถยับยั้งมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma Bel 7402 cells) ได้ (Chen et al., 2010) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Halophilic bacteria ได้รับความสนใจและถูกนำมาศึกษาด้านการแพทย์มากยิ่งขึ้น

ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคโนโลยี Next-Generation Sequencing (NGS) มาใช้ในการศึกษา draft genome ของเชื้อกลุ่ม Halophilic bacteria เช่น เชื้อกลุ่ม *Bacillus* spp. พบยีนที่มีบทบาทหน้าที่สัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น ยีนที่สร้างเพปไทด์ที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ (antimicrobial peptide) (Chung et al., 2008), ยีนในการสร้างโปรตีนที่เป็นสารพิษ (proteinaceous toxins) (Daas et al., 2018; Palma et al., 2014), ยีนในการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (bacteriocins) (de Farias et al., 2019), ยีนเกี่ยวกับกลไกในการยับยั้งเชื้อรา (antifungal) (Khudeir et al., 2024) ที่ก่อให้เกิดโรคในพืช เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบรายงานข้อมูล draft genome ของเชื้อกลุ่ม *Halobacillus* spp. หลายชนิด เช่น *H. mangrovi* KTB 131 (Woo et al., 2017), *H. campisalis* strain ASL-17 (Srivastava et al., 2024), *H. trueperi* SS1 (Gupta et al., 2019) เป็นต้น ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ draft genome สามารถบ่งชี้หรือทำนายกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ อาจจะสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการปรับปรุงพันธุกรรมด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรม เพื่อให้เชื้อผลิตสารเป้าหมายที่มีความจำเพาะและมีปริมาณมากเพียงพอ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคและมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพที่ตรงเป้าและอาจช่วยแก้ไขปัญหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ดื้อยาได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษา draft genome ในกลุ่มเชื้อจีนัส *Halobacillus* เพื่อนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาฤทธิ์ของสารต้านเชื้อก่อโรคในมนุษย์ยังมีข้อมูลไม่มาก

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดกรองเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกจากป่าชายเลนที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด ซึ่งมักเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาในปัจจุบัน ได้แก่ เชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* โดยใช้เทคนิค Disc diffusion และทำการศึกษาองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้น โดยใช้เทคนิค TLC- Bioautography ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้หลักการโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง ในการศึกษาองค์ประกอบของสารร่วมกับการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และทำการ

ประเมินค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC: minimum inhibitory concentration) และค่าความเข้มข้นของสารสกัดในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC: minimum bactericidal concentration) และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (Draft genome sequence) ของเชื้อ *Bacillus* sp. ศึกษายีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเชื้อก่อโรค เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาปรับปรุงพันธุกรรมของเชื้อ *Bacillus* sp. ให้มีความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ตรงเป้าได้ในอนาคต

การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

โลกของจุลินทรีย์ที่ชอบเกลือ (Halophilic microorganisms) มีความหลากหลายอย่างมาก และมีตัวแทนทางอนุกรมวิธานจากทั้งสามโดเมนของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ Archaea, Bacteria และ Eucarya ซึ่งมีมากกว่า 1,000 สายพันธุ์ ประกอบด้วย Archaea 21.9%, Bacteria 50.1% และ Eukaryotes 27.9% พวก halophiles สามารถรักษาสมดุลออสโมซิสในระบบนิเวศที่มีองค์ประกอบของไอออนิกที่ผันผวนอย่างมาก และปรับตัวได้อย่างรวดเร็วต่อการเปลี่ยนแปลงของไอออนิกที่เกิดขึ้นอย่างฉับพลัน การจำแนกชนิดของพวก Halophilic microorganisms แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตาม Larsen (1962) และ Kushner (1978) โดยแบ่งตามช่วงความเข้มข้นของเกลือสำหรับความต้องการการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ ช่วง 2 – 5% NaCl จะเป็นพวกแบคทีเรียที่ชอบเกลือเล็กน้อย (weakly halophilic bacteria), ช่วง 5 - 20% NaCl เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือปานกลาง (moderate halophilic bacteria) และค่าสูงถึง 20 - 30% NaCl จะเป็นพวก extreme halophilic bacteria นอกจากเกลือที่แบ่งระดับของความทนทานแล้วยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ค่า pH และการพัฒนาของ medium อีกด้วย พวกแบคทีเรียที่ชอบเกลือมีศักยภาพสูงสามารถนำไปประยุกต์ทางเทคโนโลยีชีวภาพได้ เนื่องจากสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติที่รุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการมีส่วนร่วมต่อกระบวนการทางชีวเคมี การก่อตัวและการละลายของคาร์บอเนต และการตรึงฟอสเฟต (Rodriguez-Valera, 1993)

กลุ่มเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Halobacillus* จัดเป็น moderate halophilic bacteria ซึ่งสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ในระดับความเค็มที่หลากหลาย ทำให้เป็นที่สนใจสำหรับการวิจัย และสามารถพบได้บริเวณดินป่าชายเลน, solar salterns, ดินตะกอนเกลือและด่าง และดอกไม้ทะเล ค้นพบครั้งแรกโดย Spring et al. (1996) ได้แก่ *H. litoralis* และ *H. trueperi* เป็นกลุ่มของ Halophilic aerobic bacteria มีคุณลักษณะเป็น Gram-positive, rod-shaped, heterotrophic และ endospore-producing ในปัจจุบันมีประมาณ 20 สายพันธุ์

ปัจจุบันมีรายงานข้อมูลวิจัยการค้นคว้ายาชนิดใหม่ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติเพื่อยับยั้งเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะเชื้อกลุ่ม halophilic bacteria โดยมีรายงานว่าเชื้อ *Halobacillus* sp. มีความสามารถในการสร้างสาร secondary metabolites ยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* และ *C. albicans* จากผลการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งต่อเชื้อ *P. aeruginosa* เท่ากับ 14 มม., *E. coli* และ *C. albicans* เท่ากับ 13 มม. ส่วน *S. aureus* เท่ากับ 11 มม. เมื่อทำการทดสอบค่า MIC ของสารสกัดต่อ *E. coli, P. aeruginosa*, และ *C. albicans* พบว่ามีค่าเท่ากับ 128 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบสารประกอบจำนวน 17 ชนิด ซึ่งมี 4 ชนิดที่เป็นสารประกอบหลัก (major compounds) ได้แก่ (i) cyclo(L-prolyl-L-valine) (probability 95.63%), (ii) pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione,hexahydro-3-(2-methylpropl) (probability 94.45%), (iii) 2,5-piperazinedione,3,6-bis(2-methylpropyl) (probability 71.94%) และ (iv) pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione,hexahydro-3-(phenylmethyl) (probability 88.01%) (Saleem et al., 2024) และพบรายงานว่าสารสกัดจากเชื้อ *H. marinus* HMALI004 ที่คัดแยกจากจากฟาร์มกุ้งทะเล ในซานโถว ประเทศจีน เมื่อแยกองค์ประกอบของสารองค์ประกอบของสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) และเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography) จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี mass spectrometry (MS) และ nuclear magnetic resonance (NMR) พบสารสำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ 1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid และ 4-chloro-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid เมื่อทดสอบค่า MIC ของสารทั้ง 2 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของสารในการยับยั้งต่อเชื้อ *Vibrio cholerae* พบว่าสาร 1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid มีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสาร 4-chloro-1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid มีค่าเท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Ali et al., 2022) นอกจากนี้ยังพบรายงานว่าเชื้อ *H. karajiensis* ที่คัดแยกจากดินเค็มบริเวณ Khewra Salt Mines ประเทศปากีสถาน สามารถสกัดสาร biosurfactants ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC 4617, *S. aureus* ATCC 6538, *B. subtilis* ATCC 6633, และ *Enterococcus faecalis* JH22 (Ali et al., 2022) และมีการค้นพบสารกลุ่ม cyclopeptides ชนิดใหม่ที่สกัดจากเชื้อ *H. litoralis* YS3106 ที่คัดแยกจากตะกอนดินทะเล จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ cyclo (Pro-Val), cyclo (Pro-Leu) และ cyclo (Ile-Val) ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ (Yang et al., 2002) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า เชื้อกลุ่ม *Halobacillus* มีความสามารถในการสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อก่อโรคได้หลากหลายชนิด

แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคของสารสกัดจากเชื้อกลุ่ม *Halobacillus* ในประเทศไทย

การวิเคราะห์ Draft genome ของแบคทีเรียเป็นการสำรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดภายในจีโนม ซึ่งจีโนมหมายถึงชุดข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของแบคทีเรียที่ถูกจัดเก็บในรูปแบบของดีเอ็นเอ ทำหน้าที่เป็นรหัสในการสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ ด้วยความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านพันธุศาสตร์ในปัจจุบัน เทคนิค Next Generation Sequencing นำมาใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือรหัสสารพันธุกรรมอย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถดำเนินการวิเคราะห์ข้อมูลได้จำนวนมาก (High-throughput) ในการตรวจสอบยีนเป้าหมายและตัวอย่างหลาย ๆ ชุดได้พร้อมกัน มีความไวสูงในการวิเคราะห์ (High sensitivity) ที่สามารถระบุยีนสำคัญต่าง ๆ ของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค หรือยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับความสามารถในการดื้อยาปฏิชีวนะ ในปัจจุบัน วิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ที่ได้รับความนิยม คือ อิลลูมินา (Illumina dye sequencing) ซึ่งถูกคิดค้นโดย Bruno Canard และ Simon Sarfati และพัฒนาเพิ่มเติมโดย Shankar Balasubramanian และ David Klenerman ก่อนที่จะร่วมก่อตั้ง Solexa ภายใต้บริษัท Illumina หลักการทำงานของวิธีนี้อิงอยู่กับการตรวจจับสีที่เกิดขึ้นที่ปลายนิวคลีโอไทด์ (dye-terminators) ช่วยให้สามารถระบุชนิดของนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ ขณะเดียวกันก็เชื่อมต่อกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ (1) การเตรียมตัวอย่าง โดยการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างที่สนใจ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์และความเข้มข้นเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ (2) การเตรียม Library คือการจัดการดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่าง โดยการตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แบบสุ่มด้วยการใช้เอ็นไซม์ทรานโพเอส (Transposases) จากนั้นจะทำการเชื่อมต่ออะแดปเตอร์ (adaptors) ที่ปลายทั้งสองข้างของดีเอ็นเอที่ถูกตัดผ่านกระบวนการ Ligation (3) การ Sequencing ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับกระบวนการ PCR amplifications มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างสาย DNA คู่สมของสาย DNA แม่แบบ โดยที่นิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดจะถูกติดตามด้วยสาร Fluorescent ที่มีสีและอัตราการปล่อยแสงที่แตกต่างกัน เครื่อง Sequencer จะอ่านค่าสีในแต่ละรอบที่มีการเติมนิวคลีโอไทด์ (4) การวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งนิวคลีโอไทด์จำนวนมากนี้จะถูกจัดกลุ่มและซ้อนทับกัน หากมีลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง สามารถเปรียบเทียบข้อมูลกับลำดับอ้างอิงได้ รวมถึงสามารถวิเคราะห์ส่วนประกอบของจีโนม (Genome component analysis) และระบุหน้าที่ของยีน (Gene function annotation) โดยการเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูลจากศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ NCBI (The National Center for Biotechnology Information)

หรือใช้โปรแกรมเฉพาะที่พัฒนาขึ้นเพื่อคาดการณ์หรือทำนายผลผลิตที่เกิดจากการทำงานของยีน เช่น โปรตีน เอนไซม์ หรือสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ เป็นต้น (Wilantho et al., 2012)

ปัจจุบันได้มีการศึกษา Draft genome หรือจีโนมทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์เพื่ออธิบายถึงกลไกในการสร้างสารสำคัญที่ทำหน้าที่ในการต้านหรือยับยั้งเชื้อก่อโรค จากรายงานพบว่าจีโนมเชื้อกลุ่ม *Bacillus* ประกอบด้วยยีนที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งเชื้อก่อโรคหลายชนิด เช่น ในด้านการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช จากรายงานการศึกษา Draft genome พบเชื้อ *Bacillus* sp. มียีนที่สามารถผลิตเพพไทด์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช ได้ถึง 24 ชนิด เช่น iturin, bacilysin, bacillomycin, fengycin, surfactin, mersacidin, ericin, subtilin, subtilosin, และ mycosubtilin (Chung et al., 2008; Mora et al., 2011), การศึกษาเชื้อ *B. glycinifermentans* พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) กลุ่มเชื้อราและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในพืช (Karim et al., 2019), การศึกษาเชื้อ *B. velezensis* ที่คัดแยกจากดินเค็ม ในประเทศจีน พบยีนที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งเชื้อราในพืช สามารถนำไปใช้ประยุกต์ใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ (Biocontrol) (Zhu et al., 2019) และการศึกษาเชื้อ *B. cereus* CITVM-11.1 พบยีนที่แสดงออกในการยับยั้งเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* ที่ก่อให้เกิดโรครากดำ (charcoal root rot) อีกทั้งยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อโลหะหนักที่เป็นพิษหลายชนิด และยีนที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของสารพิษจากเชื้อรา (Khudeir et al., 2024) ในด้านการยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ มีรายงานการศึกษาเชื้อโปรไบโอติกส์ *B. pumilus* 36R ATNSAL และ *B. safensis* 13L LOBSAL ในการยั้บยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งมักก่อให้เกิดโรคตายด่วนในกุ้ง (acute hepatopancreatic necrosis disease) พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเมแทบอไลด์ในการต้านเชื้อก่อโรค (Sánchez-Díaz et al., 2022) นอกจากนี้ยังมีรายงานข้อมูล Draft genome ของเชื้อ *Halobacillus* sp. Nhm2S1 พบว่าจีโนมมียีน (redP/R) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ทางชีวภาพของเม็ดสีโพรดิจิโอซินซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าสาหร่าย ซึ่งเชื่อว่ามีประโยชน์ในการอธิบายถึงคุณสมบัติหรือกลไกในการฆ่าสาหร่ายได้ (Oh & Roh, 2021) จากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่าการศึกษา Draft genome สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการบ่งบอกความสัมพันธ์ของตำแหน่งยีนและการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาในระดับยีนหรือจีโนมของเชื้อกลุ่ม *Haloacillus* sp. ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ยังคงมีไม่มากนัก จึงยังไม่ทราบถึงตำแหน่งยีนที่ยืนยันกลไกการสร้างสารออกฤทธิ์ดังกล่าว

เทคนิค TLC - bioautography เป็นการนำหลักการโครมาโทกราฟ ซึ่งเป็นการจำแนกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด เพื่อบอกตำแหน่งของสารบริสุทธิ์ที่อยู่ในสารละลายผสม ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็ว มีขั้นตอนการทดสอบไม่ซับซ้อน มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบ เช่น ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น และสามารถนำ

ผลเบื้องต้นไปสู่กระบวนการสกัดและพัฒนาเพื่อหาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียต่อไป ความสามารถในการแยกสารเกิดจากสมบัติของการมีขั้วของสารแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน จึงทำให้การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC มีระยะที่แตกต่างกัน จากนั้นนำสารสกัดมาทดสอบการต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถบ่งบอกชนิดของสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เทคนิค TLC- Bioautography เหมาะกับการศึกษาสารประกอบของสารสกัด เนื่องจากมีความจำเพาะสูง ทำงานง่าย สะดวก และค่าใช้จ่ายน้อย จึงนิยมนำมาศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค หรือสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant compounds) (Horváth et al., 2011) ในการศึกษาฤทธิ์ของสารในการต้านเชื้อจุลินทรีย์จำเป็นต้องทำการประเมินค่าความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC: minimum inhibitory concentration) และค่าความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC: minimum bactericidal concentration) เพื่อให้ทราบถึงความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

ปัจจุบันเราสามารถพบสารเทอร์พีนอยด์ (terpenoids) หรือเทอร์พีน (terpenes) ได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งหมด รวมถึงสาหร่ายสีแดง พืชบก แบคทีเรีย อาร์เคีย เชื้อรา โปรติสต์ และสัตว์ สารเทอร์พีนอยด์พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งบนบกและในน้ำ และมีหน้าที่มากมายทั้งที่จำเป็นและเฉพาะทาง ได้แก่ การรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การบรรเทาความเครียด การปกป้องแสงเพื่อการดึงดูดหรือขับไล่สิ่งมีชีวิต และการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการป้องกันของพืช ความหลากหลายของหน้าที่ที่มากมายนี้สะท้อนให้เห็นได้จากโครงสร้างของสารประกอบมีความหลากหลายเพิ่มมากขึ้น จุลินทรีย์ได้พัฒนากระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ 2 แบบที่แตกต่างกัน ได้แก่ methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathways และ mevalonate (MVA) pathways เพื่อสร้างองค์ประกอบพื้นฐานของ terpenes ซึ่งหลอมรวมกับ oligomers ที่สามารถแปลงต่อไปเป็นโมเลกุลที่แตกต่างกันได้โดยใช้ terpene synthase (TPS) ตัวเดียว สารเทอร์พีนอยด์มีความเกี่ยวข้องอย่างยิ่งกับมนุษย์สำหรับการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์ยา น้ำหอม สารปรุงแต่งรส สีผสมอาหาร ยาฆ่าแมลง และเชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นต้น การสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์มี 3 ขั้นตอน ในขั้นตอน (1) terpene monomer จะถูกสร้างขึ้นแล้วหลอมรวมเพื่อให้ได้โอลิโกเมอร์ผ่าน patway ซึ่งเป็น primary metabolism (2) ปฏิกิริยา cyclisation มีลักษณะเฉพาะคือเร่งปฏิกิริยาโดย TPS เพื่อสร้างโครงสร้างเทอร์พีนที่มีหมู่ฟังก์ชันต่ำ โดยขึ้นอยู่กับจำนวนการสร้างวงแหวน และ (3) “เอนไซม์ปรับแต่ง” เช่น ไซโตโครม P450 โมโนออกซิเจเนส ดีไฮโดรจีเนส รีดักเตส และ/หรือ ทรานสเฟอเรส จะทำให้เกิดออกซิเดชันและการดัดแปลงอื่นๆ ซึ่งบางครั้งเกี่ยวข้องกับการจัดเรียงโครงสร้างใหม่หรือการแตกกลุ่ม ขั้นตอนเหล่านี้ทำให้เกิดสารที่เรียกว่า terpenoids ซึ่งแยกจาก "terpenes" โดยเด็ดขาด terpenes ไม่มีขั้วและระเหยได้ (โดยระเหยได้น้อยลงตามจำนวนอะตอมคาร์บอน) ในขณะที่ terpenoids มีความเกี่ยวข้อง

กับขั้วที่เพิ่มขึ้น กล่าวคือ ละลายน้ำได้ และด้วยเหตุนี้จึงระเหยได้น้อยกว่า ขั้นตอนการทำงานเหล่านี้มักเกี่ยวข้องกับกิจกรรมทางชีวภาพที่เพิ่มขึ้น (เช่น antimicrobials) เนื่องจากช่วยให้จับกับโครงสร้างเป้าหมายทางชีวภาพ เช่น เอนไซม์ หรือไรโบโซมได้อย่างเฉพาะเจาะจง ฤทธิ์ต้านจุลชีพในแบคทีเรียทะเลเป็นปรากฏการณ์ที่รู้จักกันดีและได้รับการพิสูจน์แล้วจากการศึกษามากมาย ตั้งแต่ช่วงปลายปี 1940 นักจุลชีววิทยาและเภสัชกรได้ให้ความสำคัญกับแบคทีเรียทะเลในฐานะแหล่งที่มีศักยภาพสำหรับการค้นพบและพัฒนายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ (Norhana & Darah, 2005) สมาชิกของ Halorubrum และ Haloferax ได้รับการระบุว่าเป็นสกุลที่ผลิต Halocin ได้มากที่สุด โดยพบฤทธิ์ต้านจุลชีพแบบ cross-domain กับแบคทีเรียในสกุล Halomonas, Rhodovibrio, Salisaeta หรือ Pontibacillus ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างที่มีเกลือสูง (Shand & Leyva, 2007) ความสามารถในการผลิตยาปฏิชีวนะหลายชนิดอาจช่วยยับยั้งการแข่งขันของจุลินทรีย์ที่หลากหลายได้ แบคทีเรียที่ชอบเกลือไม่ได้รับการสำรวจมากนักเพื่อผลิตสารประกอบออกฤทธิ์ดังกล่าว sulfonolipids สองชนิด (SL1 และ SL2) ที่แยกได้จากสารสกัดไขมันของ *Salisaeta longa* ที่ชอบเกลือ และ sulfonolipids เหล่านี้มี sphingoid base ซึ่งเป็นอนาล็อกของ capnine โดยที่สารแคปนินของแบคทีเรียที่ชอบเกลือมากมีชื่อเฉพาะว่า Halocapnine ในทำนองเดียวกัน *Actinoalloteichus* sp. AH97 ผลิตสารประกอบชีวภาพ 2 ชนิด ได้แก่ สารประกอบ aminoglycosidic (ชอบน้ำ) และสารประกอบ dioctylphthalate (ไม่ชอบน้ำ) (Boudjelal et al., 2010) นอกจากนี้ Sawale et al. (2013) ค้นพบโครงสร้างบางส่วนของสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ของ CH_3, O=C, C-H, CH_2, กลุ่ม C-N ที่ยืดออกด้วยวงแหวนเบนซินทดแทนที่แยกได้จากเชื้อ *B. pumilus* เป็นสายพันธุ์ที่ชอบเกลือ สายพันธุ์แบคทีเรียที่ชอบเกลือแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพที่สูงกว่าในแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ผลลัพธ์เหล่านี้ไม่สอดคล้องกับการศึกษาครั้งก่อน ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกมีความอ่อนไหวต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Peláez et al., 1998) สภาพแวดล้อมที่มีเกลือสูงและแบคทีเรียที่ชอบเกลือเป็นทรัพยากรที่มีแนวโน้มดีสำหรับสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการค้นพบในอนาคต ดังนั้น สภาพแวดล้อมที่มีเกลืออาจเป็นช่องทางนิเวศน์ที่ยังไม่ได้รับการสำรวจอย่างเพียงพอสำหรับการค้นพบสารเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และจุลินทรีย์ที่ชอบเกลือเหล่านี้เป็นแหล่งที่มีศักยภาพสำหรับสารประกอบบำบัดใหม่ๆ มากมาย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของเชื้อ *Bacillus* sp. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาปรับปรุงพันธุกรรมของเชื้อ *Bacillus* sp.
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค
3. ประเมินฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดจากเชื้อ *Bacillus* sp.

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อ *Bacillus* sp. อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ต่อเชื้อก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ด้วยวิธี disc diffusion
2. ศึกษาองค์ประกอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น ด้วยเทคนิค TLC-Bioautography
3. ประเมินฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดจากเชื้อ *Bacillus* sp. โดยประเมินค่าความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC: minimum inhibitory concentration) และค่าความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC: minimum bactericidal concentration) ด้วยวิธี broth microdilution
4. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม วิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องในการแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำเอาองค์ความรู้และเทคโนโลยีสมัยใหม่ด้านพันธุศาตร์จุลินทรีย์ที่ได้ ไปต่อยอดพัฒนาสร้างสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อนำไปแก้ปัญหาการรักษาโรคจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้ และนำข้อมูลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ในด้านวิชาการโดยการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดินและแหล่งเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลนบริเวณศูนย์การเรียนรู้เชิงอนุรักษ์ป่าชายเลน ตำบลคลองตำหรุ อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี โดยแบ่งสถานีเก็บเป็น 4 สถานี ได้แก่ บริเวณชายฝั่งป่าชายเลน 1 สถานี (A) เป็นบริเวณที่มีน้ำท่วมขัง มักพบต้นแสมขาว, บริเวณห่างจากฝั่งป่าชายเลน 500 เมตร 2 สถานี (B และ C) เป็นสถานีด้านซ้ายและขวาของร่องทางเดินน้ำ มักพบต้นโกงกางเจริญอยู่ และบริเวณห่างจากฝั่งป่าชายเลน 500 เมตร 1 จุด (D) เป็นสถานีที่ลักษณะดินแห้งมากกว่าสถานีอื่น เก็บดินที่บริเวณผิวดินของแต่ละจุด ประมาณ 10 กรัม ใส่ดินในถุงซิปล็อคที่ปราศจากเชื้อ เก็บใส่กล่องที่แช่น้ำแข็งระหว่างที่ขนส่ง นำไปแช่ตู้เย็นที่ 4°C เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

2. การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสจากดินในพื้นที่ป่าชายเลน

ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มบาซิลัสโดยปรับจากวิธีการศึกษาของ Maitong และคณะ (2021) เริ่มจากชั่งน้ำหนักดิน 5 กรัม ละลายใน 0.85% NaCl ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (10^{-1}) เจือจางตัวอย่างโดยการทำแบบอนุกรมให้ได้ความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} แล้วนำตัวอย่าง แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเป็นการทำลายเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่นและคัดเลือกเฉพาะเชื้อกลุ่ม *Bacillus* ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วทำการเกลี่ย บนจานอาหาร Marine agar (MA) ความเจือจางละ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วทำการคัดแยกโคโลนีที่แตกต่างกันให้บริสุทธิ์ และย้อมสีแกรม โดยคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่แสดงลักษณะเป็นกลุ่มของเชื้อบาซิลลัสเท่านั้น ได้แก่ เซลล์สามารถย้อมติดสีแกรมบวกและมีรูปร่างเป็นท่อน

3. การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเซลล์แบคทีเรีย

3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อกลุ่มบาซิลลัส

เพาะเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ บนอาหาร Nutrient agar ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (NA+sea water) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเชื้อ 10-15 โคโลนี ลงในอาหารเหลว Nutrient broth ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ปั่นที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบ (rpm) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเก็บส่วนตะกอนเซลล์ เพื่อทำการสกัดสารภายในเซลล์แบคทีเรีย สำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อต่อไป

3.2 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเซลล์แบคทีเรีย

นำเชื้อบาซิลลัสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงในอาหารและบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาเฉพาะเซลล์ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบ เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นทำการสกัดสารภายในเซลล์แบคทีเรียอ้างอิงตามวิธีการของ Sabdaningsih และคณะ (2017) โดยนำตะกอนเซลล์ละลายใน methanol แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูงโดยใช้เครื่อง homogenizer ความถี่ 20 kHz เป็นเวลา 10-15 นาที ตั้งทิ้งไว้ จากนั้นนำไปกรองเก็บส่วนของสารละลาย methanol ที่กรองได้ นำส่วน solid residue สกัดซ้ำด้วย methanol 2 ครั้ง กรองและรวมในส่วนของสารละลายแอลกอฮอล์ จากนั้นนำไประเหยให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้ “สารสกัดหยาบชั้นเซลล์” ชั่งน้ำหนักสารสกัด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอวิเคราะห์ต่อไป

4. การทดสอบฤทธิ์ชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อบาซิลลัสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยวิธี Agar well diffusion

4.1 ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคของเชื้อบาซิลลัสเบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli* TISTR 527, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Candida albicans* TISTR 5554 (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี) ด้วย วิธี Agar well diffusion ตามวิธีของ Kirby-Bauer (Kirby et al., 1956) ใช้หลักการแพร่สารออกฤทธิ์เข้าไปในรูพรุนของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Agar) ที่มีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคกระจายตัวอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง หากสารสกัดที่ต้องการทดสอบมีฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งกระบวนการเติบโตของเชื้อก่อโรคได้จะปรากฏบริเวณใส (Clear zone) ขึ้น

4.2 การเพาะเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* และ *S. aureus* เพาะเชื้อในอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญแล้วเขี่ยโคโลนีเชื้อมาแขวนลอยใน normal saline 0.85% NaCl (NNS) ปลอดเชื้อ ปรับปริมาณของเชื้อให้มีจำนวนประมาณ 1-2×10^8 CFU/มิลลิลิตร (Colony Forming Unit per milliliter: CFU/ml) สำหรับการเพาะเชื้อ *C. albicans* เลี้ยงเชื้อในอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วปรับปริมาณของเชื้อให้มีจำนวนประมาณ 10^7 CFU/มิลลิลิตร ใน NSS ใช้ไม้พันสาลี (Cotton swab) ปลอดเชื้อจุ่มลงในหลอดเพาะเชื้อทดสอบแต่ละชนิดเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารแข็งให้ทั่วผิวหน้าอาหารแล้ววางไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง (เชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ใช้อาหารแข็ง MHA ส่วนเชื้อ *C. albicans* ใช้อาหาร SDA) จากนั้นเจาะรูบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งให้ได้หลุมขนาด 10 มิลลิเมตร ด้วย Pipette tip ปราศจากเชื้อ

4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น (Pre-screening antimicrobial activity) เตรียมสารละลายที่ต้องการทดสอบของสารสกัดหยาบทั้ง 14 ไอโซเลท ละลายสารด้วย DMSO และ

หยอดลงไปในแต่ละหลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใช้สาร DMSO เป็นชุดควบคุม จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 -24 ชั่วโมง

4.4 บันทึกผลการทดลอง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสการยับยั้ง (Inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร (mm) โดยรายงานผล positive เป็นสัญลักษณ์ “+, ++, +++” ซึ่งกำหนดเกณฑ์ Inhibition zone ขนาด 11-12 มิลลิเมตร ให้สัญลักษณ์ “+”, ขนาด 13-15 มิลลิเมตรให้สัญลักษณ์ “++” และขนาด 16-20 มิลลิเมตร ให้สัญลักษณ์ “+++”และ negative เป็นสัญลักษณ์ “-”

4.5 คัดเลือกเชื้อที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง “+++” ไปทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์อีกครั้งหนึ่ง โดยทำการเตรียมตัวอย่างสารสกัดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หยอดลงไปในแต่ละหลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ปริมาณสาร 250 ไมโครกรัม) จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค โดย DMSO เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และยา Ketoconazole และ Gentamicin ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/หลุม เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการบันทึกผลการทดลอง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสการยับยั้ง ในหน่วยมิลลิเมตร โดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (vernier caliper) และรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

5. การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ A1-3

ทำการเลี้ยงเชื้อ A1-3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เพื่อตรวจสอบลักษณะของเชื้อ ได้แก่ สี และขนาดของโคโลนี การทดลองได้ทำการขีดเชื้อ (cross streak) บนอาหารแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ Nutrient agar ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (NA+sea water), Marine agar (MA), Marine agar ที่เติม 1% NaCl (MA+1%NaCl) , Marine agar ที่เติม 3% NaCl (MA+3%NaCl) และ Marine agar ที่เติม 5% NaCl (MA+5%NaCl) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48-120 ชั่วโมง บันทึกผลของสีและขนาดโคโลนี จากนั้นเลือกโคโลนีของเชื้อ A1-3 ที่ดีที่สุดไปถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ยี่ห้อ LEO รุ่น LEO 1450 VP ณ ห้องปฏิบัติการห้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ A1-3

6.1 การศึกษาผลของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ A1-3

การเพาะเลี้ยงเชื้อ A1-3 ในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ อาหาร Nutrient broth ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (NB+sea water), Marine broth สูตรปกติ (MB), Marine broth ที่เติม 1% NaCl (NB+1%NaCl), Marine broth ที่เติม 3% NaCl (MB+3%NaCl) และ Marine broth ที่เติม 5% NaCl (MB+5%NaCl) (รายละเอียดวิธีการเตรียมอาหารแสดงในภาคผนวกข้อที่ 7) และวัดความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดด้วย salinity meter (หน่วยวัด ppt) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C

เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที สังเกตผลการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการนับจำนวนโคโลนีด้วยเทคนิค drop plate ตามวิธีการของ Naghili et al. (2013) ทำการบันทึกผลการเจริญเติบโตทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 120 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละการทดสอบ

6.2 การศึกษาผลของอุณภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ A1-3

เลือกอาหารที่มีผลการเจริญเติบโตของเชื้อ A1-3 ดีที่สุด นำเชื้อ A1-3 เลี้ยงในอาหาร ทำการทดสอบการเจริญภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 30°C และ 40°C บันทึกผลการทดลองโดยการวัดค่าการชั่งน้ำหนักตะกอนเซลล์เปียก และน้ำหนักปริมาณสารสกัดที่ได้ ทำ 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดสอบ

6.3 การเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดเชื้อ A1-3

นำเชื้อ A1-3 เลี้ยงในอาหาร NB+Sea water และ MB+3%NaCl เก็บส่วนตะกอนเซลล์และทำการสกัดสารภายในเซลล์ เช่นเดียวกับวิธีการในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเซลล์แบคทีเรีย เตรียมสารสกัดหยาบของเชื้อ A1-3 ให้มีความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หยอดลงไปในแต่ละหลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ปริมาณสาร 500 ไมโครกรัม/หลุม) ทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใช้ยา Gentamicin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/หลุม เป็นชุดควบคุมเชิงบวกสำหรับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ส่วนยา Ketoconazole ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/หลุมเป็นตัวควบคุมเชิงบวกสำหรับเชื้อยีสต์ก่อโรค และสาร DMSO เป็นชุดควบคุมเชิงลบ บันทึกผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณวงใส ในหน่วยมิลลิเมตร

7. การศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

7.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

จากการทดลองข้อการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ A1-3 ทำการแยกสารประกอบของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย A1-3 ที่สามารถเจริญได้ดีภายใต้ 3 สภาวะ ได้แก่

หมายเลข 1 = NB+น้ำทะเล บ่มที่อุณหภูมิ 30°C

หมายเลข 2 = MB+3%NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 30°C

หมายเลข 3 = NB+น้ำทะเล บ่มที่อุณหภูมิ 40°C

โดยละลายตัวอย่างทั้ง 3 ด้วย Chloroform: Methanol 2:1 หยดสารละลายตัวอย่างบนแผ่น TLC (silica gel 60 F_{254}) และจุ่มแผ่น TLC ใน TLC chamber ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ Chloroform: Methanol อัตราส่วน 83 : 17 มิลลิลิตร เมื่อสารตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงขอบที่กำหนด นำแผ่น TLC มาผึ่งให้แห้งในตู้ดูดควัน จากนั้นนำไปส่องภายใต้เครื่อง UV viewing cabinet เพื่อดูแถบสีของสารที่

ปรากฏที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร ตรวจบันทึกแถบสีที่ปรากฏ จากนั้นสเปรย์แผ่น TLC ด้วย anisaldehyde reagent (TCI, Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) ใน sulfuric acid และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105°C (ตรวจหาสารประกอบกลุ่ม terpene) และตรวจสอบผลการทดลองโดยดูสีที่ปรากฏบนแผ่น TLC และวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสารในแต่ละแถบสี (ค่า R_f) บันทึกผล

7.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี TLC-bioautography

TLC-bioautography เป็นการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียโดยการนำสารที่ต้องการทดสอบซึ่งอยู่ในรูปสารละลายผสมและอาศัยการแยกสารชนิดต่างๆออกจากกันโดยวิธีการโครมาโทกราฟี และเททับด้วยเชื้อที่ผสมอยู่ในอาหารวุ้นหลอมเหลว โดยใช้เทคนิค Agar-overlay ปรับวิธีการตามวิธีของ Grzelak et al. (2016) โดยเริ่มจากการหยดสารสกัดจากเชื้อ A1-3 บนแผ่น TLC และนำไปแยกองค์ประกอบ จากนั้นนำแผ่น TLC ที่แยกสารแล้วมาแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกใช้เป็นแผ่นอ้างอิงเพื่อตรวจหาองค์ประกอบของสารด้วยรังสี UV และการสเปรย์สารเคมี อีกส่วนหนึ่งนำไปเททับด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (agar overlay) ซึ่งได้แก่ *S. aureus*, *E. coli*, และ *C. albicans* ที่เตรียมความเข้มข้นไว้ จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อและพ่นสาร MTT (Sigma-Aldrich, Germany) เพื่อตรวจหาบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโต (inhibition zone) ซึ่งจะปรากฏเป็นจุดใสบนแผ่น TLC

8. ประเมินค่าความเข้มข้นของสารสารสกัดออกฤทธิ์ในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC: minimal inhibitory concentration) ด้วยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method)

การเตรียมสารทดสอบและชุดควบคุม สารสกัดจากเชื้อ A1-3 เริ่มจากเตรียม stock solution ที่มีความเข้มข้น 100,000 µg/mL โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำไปเจือจางใน Mueller Hinton broth (MHB) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย หรือ Sabouraud dextrose broth (SDB) สำหรับเชื้อยีสต์ ให้มีความเข้มข้นในช่วง 50,000 – 97.656 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับชุดควบคุมเชิงบวก เตรียม stock solution ยา Gentamicin ที่ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย (*E. coli* และ *S. aureus*) แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 50 – 0.097 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเตรียมยา Ketoconazole ที่ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบกับเชื้อ *C. albicans* แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 5,000 – 9.765 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนชุดควบคุมเชิงลบ ใช้ DMSO (ตัวทำละลาย), อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเชื้อและสารสกัด (sterility control) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแต่ไม่มีสารสกัดหรือยา (growth control)

การทดสอบเริ่มจากเจือจางสารโดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมของถาด microplate ชนิด 96 หลุม จากนั้นเติมสารทดสอบ (สารสกัดหรือยามาตรฐาน) 100 ไมโครลิตร ในหลุมแรก แล้วทำการเจือจางแบบ 2 เท่า (2-fold serial dilution) จนครบ 10 ระดับความเข้มข้น เติมเชื้อจุลินทรีย์ 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมทดสอบ โดยเชื้อแบคทีเรียจะมีความเข้มข้น 10^6 CFU/mL และเชื้อ *C. albicans* จะมีความเข้มข้น 10^5 CFU/มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และบ่มเพาะเชื้อ *C. albicans* ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านค่า MIC โดยสังเกตจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมที่ใสที่สุด ซึ่งเป็นหลุมที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

9. ประเมินค่าความเข้มข้นของสารสารสกัดออกฤทธิ์ในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC: minimum bactericidal concentration)

วิธีการทดลองดัดแปลงตามวิธีของ Hasson และคณะ (2011) เป็นการทดสอบที่ทำต่อจากการหาค่า MIC โดยใช้เทคนิค drop plate ดูดอาหารในทุกหลุมที่พบลักษณะใสจากการทดลองประเมินค่าความเข้มข้นของสารสารสกัดออกฤทธิ์ในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธีเจือจางในอาหารเหลว หยดลงบน agar plate ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วบ่มในสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเชื้อที่ทำการทดสอบ จากนั้นจึงอ่านผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) หรือไม่พบโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหาร (ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

10. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ A1-3

10.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA (16S rRNA sequencing)

การสกัด Genomic DNA, การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน (16S rRNA amplification) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ดำเนินการโดยบริษัท Macrogen (Macrogen, Seoul, South Korea) โดยส่งตัวอย่างในรูปแบบโคโลนีเชื้อ A1-3 ที่แยกให้บริสุทธิ์แล้วบนอาหาร Nutrient agar ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล การสกัด Genomic DNA ทำโดยวิธี The boiling method แล้วทำการเพิ่มจำนวน DNA บริเวณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ใช้ forward primer คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', ซึ่ง M หมายถึงเบส A หรือ C) และ Reward primer คือ 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') เตรียมปริมาณสารตามตารางที่ 1 จากนั้นทำการ sequencing โดยใช้ Primer 785F (5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3') และ907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') ด้วยเครื่อง 3730XL automated DNA sequencing system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, California, United States) โดยใช้

ขั้นตอนตามตารางที่ 2 และทำการยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อที่คัดแยกได้โดยวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับเชื้อในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) โดยใช้โปรแกรม BLASTN (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)

ตารางที่ 1 การเตรียม PCR Mixture สำหรับการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA

สาร	ปริมาตรต่อ 1 หลอด (ไมโครลิตร)
Axen™ H *Taq* PCR Master Mix (2X)	10
Primer F, R (10 pmole/µl)	1
Template DNA (20 ng/µl)	1-2
Distill Water (HPLC Grade)	7
Total reaction volume	20

ตารางที่ 2 รายละเอียดของขั้นตอนสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน		อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
	Initial Denaturation	95	5	1
Cycling	Denaturation	95	0.5	31
	Annealing	57	0.5	
	Extension	72	1.4	
	Final Extension	72	10	1
	Hold	4	∞	

10.2 วิเคราะห์ภาพแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic Tree)

ทำการสร้างแผนภาพที่แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่สืบเชื้อสายมาจากบรรพบุรุษ โดยเปรียบเทียบเชื้อ A1-3 (accession no. PV739571) กับเชื้อจำนวน 15 ชนิด ได้แก่ *Halobacillus dabanensis* (accession no. NR 042860.1), *Halobacillus karajensis* (accession no. NR 025545.1), *Halobacillus profundi* (accession no. NR 041246.1), *Halobacillus litoralis*(accession no. NR 029304.1), *Halobacillus trueperi* (accession no. NR 025459.1), *Halobacillus faecis* (accession no. NR 114247.1), *Halobacillus faecis* (accession no. NR 041360.1), *Halobacillus mangrovi* (accession no. NR 044002.1), *Halobacillus marinus* (accession no. NR 178679.1), *Halobacillus locisalis* (accession no. NR 025715.1), *Halobacillus salicampi* (accession no. NR 146669.1), *Halobacillus*

yeomjeoni (accession no. NR 043251.1), *Halobacillus fulvus* (accession no. NR 179252.1), *Halobacillus fulvus* (accession no. NR 180873.1), *Halobacillus andaensis* (accession no. NR 135887.1), *Halobacillus campisalis* (accession no. NR 044247.1), *Halobacillus alkaliphilus* (accession no. NR 042545.1), *Halobacillus halophilus* (accession no. NR 075035.2) และ *Halobacillus halophilus* (accession no.NR 114092.1) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA จาก GenBank ของ NCBI มาทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) เวอร์ชั่น 12 (Kumar et al., 2024) ด้วยวิธี Maximum Likelihood และ ใช้โมเดล Tamura-Nei (1993) ซึ่งเป็นโมเดลการแทนที่ดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่สุดกับข้อมูล จากการคัดเลือกด้วยวิธี Bayesian Information Criterion (BIC) โดยใช้โปรแกรม MEGA12 วิเคราะห์ความเชื่อมั่นของแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง

10.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (Draft genome sequence) ของเชื้อ A1-3

นำตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ A1-3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมกับบริษัท Novogene (Novogene, Beijing, China) โดยใช้วิธี Illumina sequencing ซึ่งขั้นตอนเริ่มจากทำการสกัด Genomic DNA ให้มีความบริสุทธิ์ แล้วทำการย่อยให้เป็น DNA สายสั้นๆ โดยการ sonication ให้ได้ชิ้นส่วน fragments ความยาว 200-500 bp จากนั้นทำการติดส่วน Sequencing adapters เข้ากับ fragments ของ DNA เมื่อเข้าสู่กระบวนการ PCR amplification เบสคู่สมที่ติดฉลากด้วยสี fluorescent จะเข้าจับกับ DNA แม่แบบ แล้วส่งสัญญานแสง (emission) ออกมา เครื่องจะทำการตรวจจับสัญญาณและแปลงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูล Bioinformatics

10.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของจีโนม (Genome component analysis) ได้แก่ Genome size (bp), G + C content (%), Contig number, Contig N50 (bp), Contig N90 (bp), Geneset number (CDS: coding sequences) และ Non-coding RNA (tRNA และ rRNA)

10.3.2 Nr Annotation (Non-Redundant Protein Database) เป็นฐานข้อมูลโปรตีนที่ไม่มีข้อมูลซ้ำซ้อน โดยการรวมลำดับโปรตีนที่เหมือนกันหรือเกือบเหมือนกันไว้เป็นลำดับเดียวกัน ซึ่งเป็นการรวบรวมข้อมูลจาก Swiss-Prot, PIR (Protein Information Resource), PRF (Protein Research Foundation), PDB (Protein Data Bank) และข้อมูลโปรตีนที่แปลจาก CDS ในฐานข้อมูล GenBank และ RefSeq ข้อมูลจาก Nr Annotation สามารถระบุว่าโปรตีนนั้นมี homologs ในสิ่งมีชีวิตใดบ้าง แสดงถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือการถ่ายโอนยีนที่สำคัญได้ และยังใช้ในการ functional annotation ของยีนใน draft genome เพื่อระบุฟังก์ชันของยีนโดย

เปรียบเทียบกับโปรตีนที่รู้จักใน Nr และใช้ในการวิเคราะห์ phylogenetic relationships หรือ homologous species โดยดูจากการกระจายของลำดับที่เหมือนกัน (homologs) ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

10.3.3 antiSMASH Annotation (Antibiotics and Secondary Metabolites Analysis Shell) เป็นการวิเคราะห์จีโนมด้วยโปรแกรม antiSMASH เวอร์ชั่น 8 (Blin et al., 2025) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ทำงานแบบอัตโนมัติสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมของแบคทีเรียและเชื้อรา เพื่อระบุและทำนายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite biosynthetic gene clusters หรือ BGCs) ซึ่งมักมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ต้านมะเร็ง กำจัดพยาธิ และอื่น ๆ ดังนั้นจึงเป็นสารตั้งต้นสำคัญสำหรับพัฒนายาหลายชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะ สารต้านมะเร็ง หรือสารเคมีอื่น ๆ โดยจะบ่งบอกตำแหน่งของยีน (region) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร secondary metabolites, ชนิดของสาร (Type) และความคล้ายคลึงกับกลุ่มสารในฐานข้อมูล แสดงผลเป็นค่า % similarity

11. การวิเคราะห์ทางสถิติ

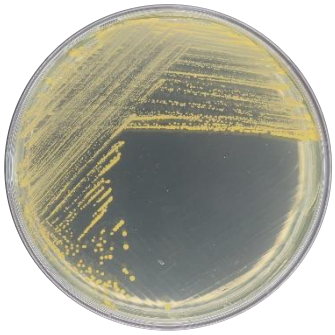
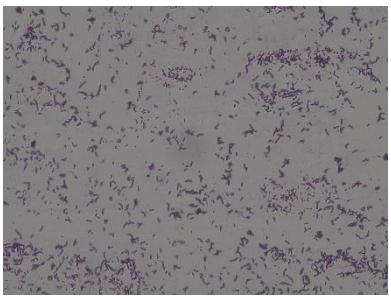
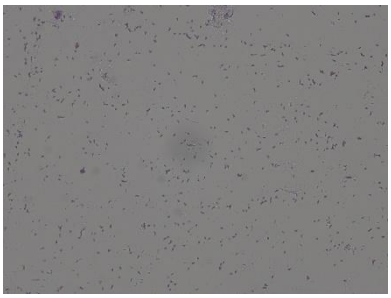
การทดสอบฤทธิ์ชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อบาซิลลัสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการนับจำนวนโคโลนีด้วยเทคนิค drop plate และการชั่งน้ำหนักเซลล์ ทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้จากการวัดถูกวิเคราะห์โดยคำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) เพื่อแสดงถึงความแตกต่างของผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรม Microsoft Excel รุ่น 2024

บทที่ 3
ผลการวิจัย

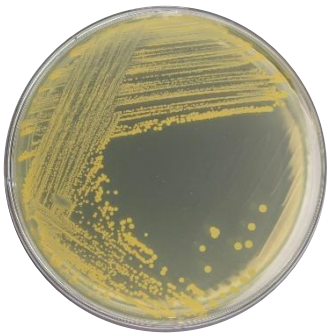
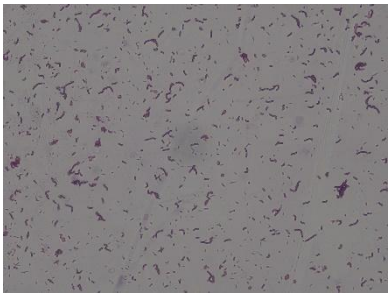
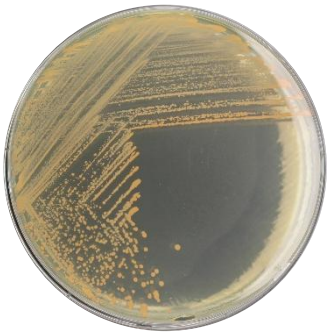
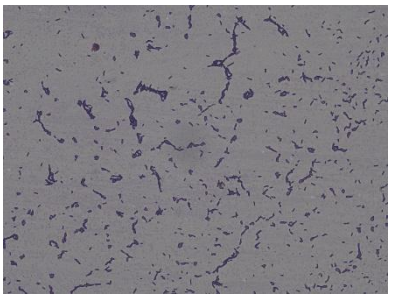
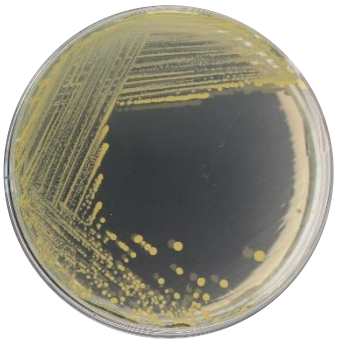
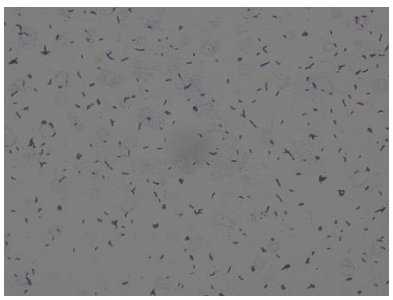
1. การคัดแยกเชื้อกลุ่มบาซิลลัสจากดินป่าชายเลน

จากการคัดแยกเชื้อกลุ่มบาซิลลัสจากตัวอย่างดินจากป่าชายเลนบริเวณศูนย์การเรียนรู้เชิงอนุรักษ์ป่าชายเลน ต.คลองตำหรุ อ.เมืองชลบุรี จ.ชลบุรี โดยแบ่งสถานีเก็บเป็น 4 สถานี พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวนทั้งหมด 14 ไอโซเลท ซึ่งทุกไอโซเลทติดสีแกรมบวก และมีรูปร่างแบบท่อน (Rod) โดยสามารถแยกเชื้อกลุ่มบาซิลลัสจากบริเวณห่างจากฝั่งป่าชายเลน 500 เมตร บริเวณร่องทางเดินน้ำ (B) มากที่สุด รองลงมาคือบริเวณชายฝั่งป่าชายเลน (A) เป็นบริเวณที่มีน้ำท่วมขัง และบริเวณห่างจากฝั่งป่าชายเลน 500 เมตร ซึ่งมีลักษณะดินแห้ง (D) รายละเอียดของข้อมูล ดังแสดงในตารางที่ 3

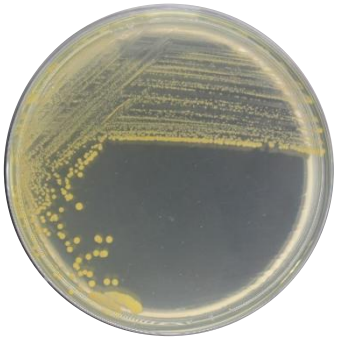
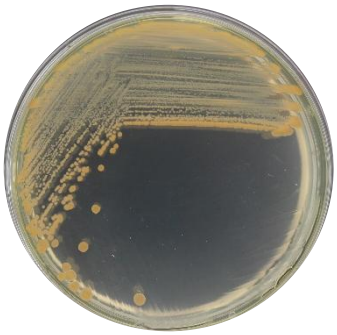
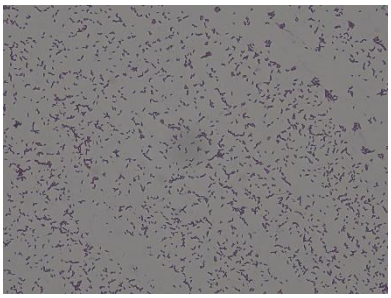
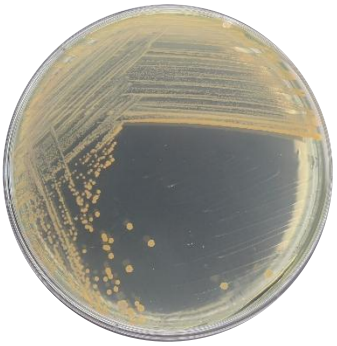
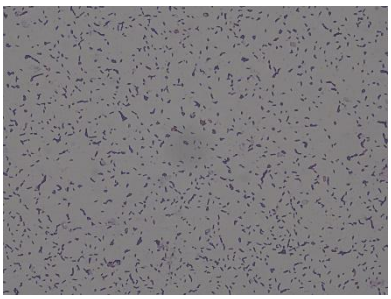
ตารางที่ 3 ลักษณะของเชื้อกลุ่มบาซิลลัสที่แยกได้จากดินป่าชายเลน

รหัสไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ภาพย้อมแกรม	ชนิดแกรม	รูปร่าง
A1-3			บวก	ท่อน
A1-4			บวก	ท่อน

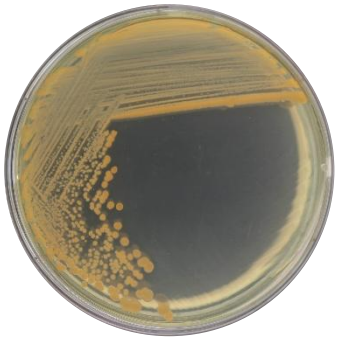
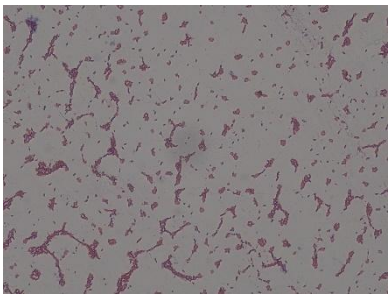
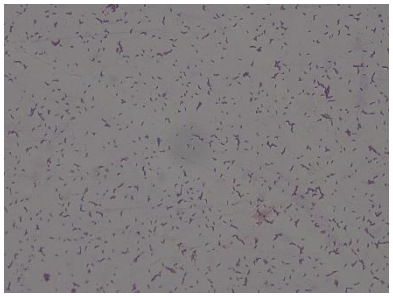
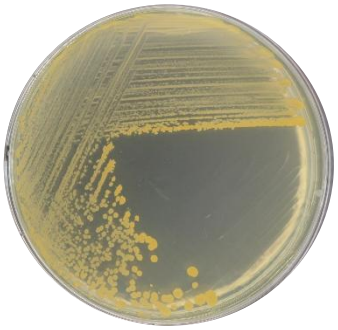
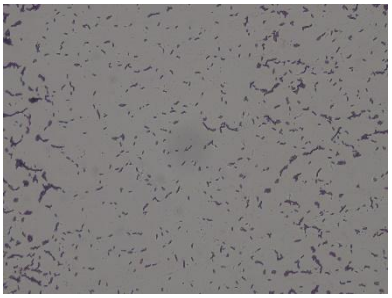
ตารางที่ 3 (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ภาพย้อมแกรม	ชนิดแกรม	รูปร่าง
A1-7			บวก	ท่อน
A1-11			บวก	ท่อน
B2-1			บวก	ท่อน

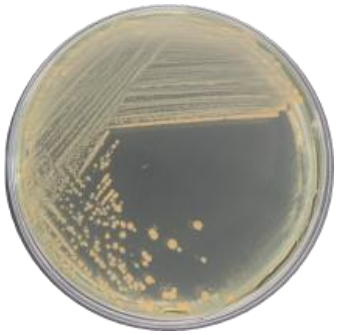
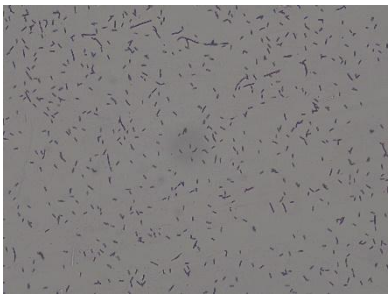
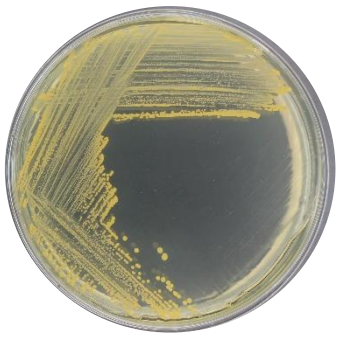
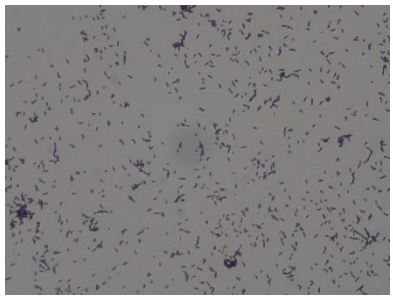
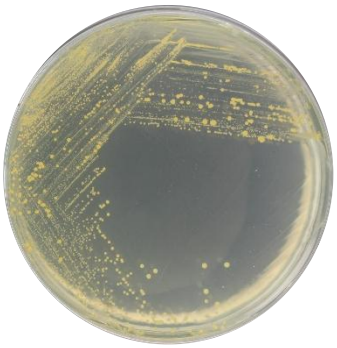
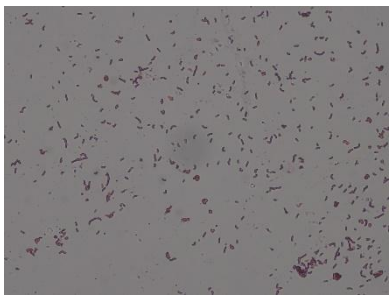
ตารางที่ 3 (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ภาพย้อมแกรม	ชนิดแกรม	รูปร่าง
B2-2			บวก	ท่อน
B2-3			บวก	ท่อน
B2-5			บวก	ท่อน

ตารางที่ 3 (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ภาพย้อมแกรม	ชนิดแกรม	รูปร่าง
B2-8			บวก	ท่อน
B2-9			บวก	ท่อน
B2-11			บวก	ท่อน

ตารางที่ 3 (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ภาพย้อมแกรม	ชนิดแกรม	รูปร่าง
C3-6			บวก	ท่อน
D5-3			บวก	ท่อน
D5-4			บวก	ท่อน

2. การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเชื้อบาซิลลัสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

การทดสอบฤทธิ์สารสกัดเบื้องต้น (Pre-screening antimicrobial activity) ของเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกจากดินป่าชายเลนทั้งหมด 14 ไอโซเลท ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ด้วยวิธี agar well

diffusion ผลพบว่าสารสกัดเชื้อจำนวน 10 ไอโซเลท แสดงบริเวณยับยั้ง ขนาด 16-20 มิลลิเมตร (+++) ได้แก่ A1-3, A1-4, A1-7, A1-11, B2-1, B2-3, B2-8, B2-11, C3-6 และ D5-4 ดังแสดงในตารางที่ 4 จากนั้นนำเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อกับเชื้อก่อโรค *S. aureus* และ *C. albicans* เนื่องจากสารสกัดแสดงฤทธิ์การยับยั้งได้ดี พบว่า สารสกัดเชื้อ A1-3 สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม/หลุม และแสดงขนาด Inhibition zone กว้างที่สุด คือ 16.83 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 5 จึงคัดเลือกเชื้อ A1-3 ไปทำการทดลองต่อไป แต่อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท ไม่พบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

ตารางที่ 4 ขนาด Inhibition zone (มม.) ของสารสกัดจากเชื้อ *Bacillus* sp. จำนวน 14 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 3 ชนิด

Isolate	*Escherichia coli*	*Staphylococcus aureus*	*Candida albicans*
A1-3	+	**+++**	**+++**
A1-4	+	+	**+++**
A1-7	-	-	**+++**
A1-11	-	++	**+++**
B2-1	-	+	**+++**
B2-2	-	+	++
B2-3	-	**+++**	++
B2-5	-	++	++
B2-8	+	+	**+++**
B2-9	-	++	++
B2-11	-	++	**+++**
C3-6	-	++	**+++**
D5-3	-	+	+
D5-4	-	++	**+++**
DMSO	-	-	-

หมายเหตุ: ขนาดหลุม 10 มม. กำหนดเกณฑ์ Inhibition zone ขนาด 11-12 มม. แทนด้วยสัญลักษณ์ “+”, ขนาด 13-15 มม. แทนด้วยสัญลักษณ์ “++”, ขนาด 16-20 มม. แทนด้วยสัญลักษณ์ “+++” ภาพ Inhibition zone แสดงในภาคผนวก

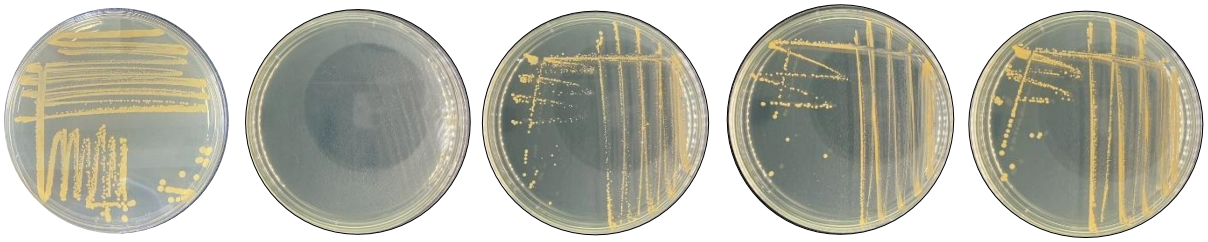
ตารางที่ 5 ขนาด Inhibition zone ของสารสกัดจากเชื้อ *Bacillus* sp. จำนวน 10 Isolates ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* และ *Staphylococcus aureus*

Isolate	*Candida albicans* (มม.)	*Staphylococcus aureus* (มม.)
A1-3	**16.83±0.76**	0
A1-4	14±1.00	0
A1-7	14.33±1.5	0
A1-11	15±0.00	0
B2-1	13.67±0.58	0
B2-3	13±0.00	0
B2-8	13±0.00	0
B2-11	13±0.00	0
C3-6	14±0.00	0
D5-4	14±0.00	0
DMSO	0	0
Ketoconazole	28±0.00	-
Gentamicin	-	26.67±0.58

หมายเหตุ: ความเข้มข้นตัวอย่าง 250 ไมโครกรัม/หลุม, ความเข้มข้นยา ketoconazole และ gentamicin 5 ไมโครกรัม/หลุม

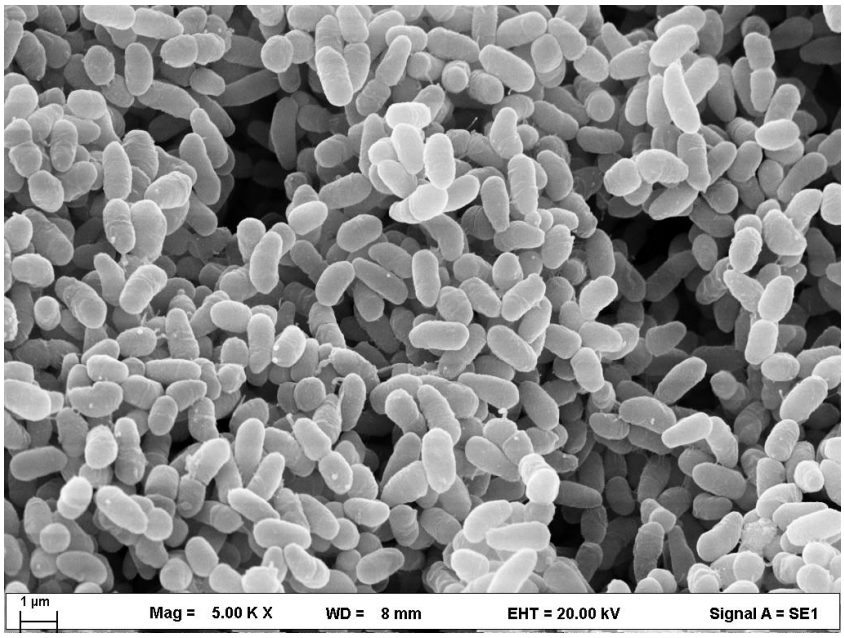
3. การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ A1-3

จากการเลี้ยงเชื้อ A1-3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง สี และขนาดของโคโลนี ของเชื้อบนอาหารแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ Nutrient agar ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (NA+sea water), Marine agar (MA), Marine agar ที่เติม 1% NaCl (w/v) (MA+1%NaCl), Marine agar ที่เติม 3% NaCl (w/v) (MA+3%NaCl) และ Marine agar ที่เติม 5% NaCl (w/v) (MA+5%NaCl) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48-120 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ A1-3 เจริญได้ดีบนอาหารแข็งชนิด NA+sea water เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อนอมส้ม มีขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อเจริญได้ช้า เมื่อเพาะเชื้อบนอาหาร MA+1%NaCl (w/v) หลังบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีขนาดโคโลนีประมาณ 1 มิลลิเมตร ส่วนในอาหาร MA+3%NaCl (w/v) และ MA+5%NaCl (w/v) มีขนาดโคโลนีประมาณ 2 มิลลิเมตร โคโลนีมีสีเหลือง อมส้ม และไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร MA สูตรปกติ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีเชื้อ A1-3 ที่เจริญบนอาหารแข็งต่างชนิดกัน ได้แก่ Nutrient agar ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (NA+sea water), Marine agar (MA), Marine agar ที่เติม 1% NaCl (w/v) (MA+1%NaCl), Marine agar ที่เติม 3% NaCl (w/v) (MA+3%NaCl) และ Marine agar ที่เติม 5% NaCl (w/v) (MA+5%NaCl)

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานของเชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงบนอาหาร NA+sea water ด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope พบว่ามีลักษณะรูปร่างท่อนสั้น มีความยาวประมาณ 1-2 ไมโครเมตร และมีความกว้างประมาณ 0.5-1.0 ไมโครเมตร ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงรูปลักษณะสัณฐานเชื้อ A1-3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ A1-3

4.1 ผลของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ A1-3

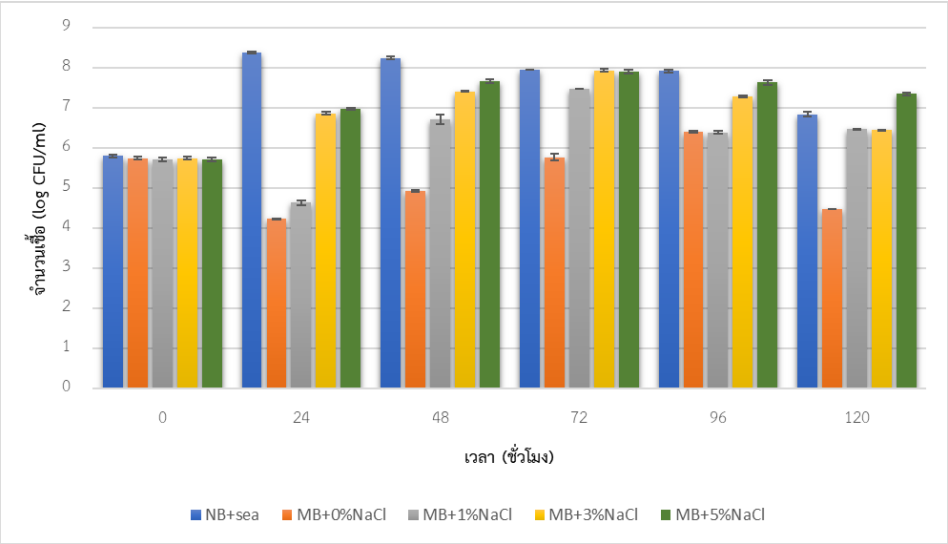
จากการทดลองหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ A1-3 โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ Nutrient broth ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (NB+sea water), อาหาร Marine broth (MB) สูตรปกติ, อาหาร Marine broth ที่เติม NaCl 1% (w/v) (MB+1%NaCl), 3% (w/v) (MB+3%NaCl) และ 5% (w/v) (MB+5%NaCl) ตามลำดับ โดยวัดค่าความเค็มอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ด้วย salinity meter หน่วยวัด ppt (Parts Per Thousand) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความเค็มของอาหารแต่ละชนิด (ppt) ได้แก่ Nutrient agar ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (NA+sea water), Marine agar (MA), Marine agar ที่เติม 1% NaCl (w/v) (MA+1%NaCl), Marine agar ที่เติม 3% NaCl (w/v) (MA+3%NaCl) และ Marine agar ที่เติม 5% NaCl (w/v) (MA+5%NaCl)

ชนิดอาหาร	NB+sea water	MB	MB+1%NaCl	MB+3%NaCl	MB+5%NaCl
ความเค็ม	47	35	47	63	80

หมายเหตุ: น้ำทะเลมีความเค็ม ~34 ppt

หลังจากนำทุกชุดการทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และวัดการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยเทคนิค drop plate โดยวัดการเจริญทุกๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 120 ชั่วโมง ผลพบว่าเชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร NB+sea water เจริญได้ดีที่สุด ในเวลา 24 ชั่วโมง และจำนวนเชื้อลดลงเรื่อย ๆ เมื่อบ่มเป็นระยะเวลานาน รองลงมาคือเชื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารอาหาร MB+3% NaCl (w/v) และ MB+5% NaCl (w/v) มีจำนวนเชื้อใกล้เคียงกัน ซึ่งมีจำนวนสูงที่สุดที่เวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นจำนวนเชื้อลดลงเมื่อบ่มเป็นเวลานาน ส่วนเชื้อที่เลี้ยงด้วยอาหาร MB สูตรปกติ และ MB+1% NaCl (w/v) พบว่าจำนวนเชื้อลดลงในช่วง 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึงค่อยๆ เพิ่มจำนวน แต่อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตช้ากว่าอาหารชนิดอื่น (ภาพที่ 1 และตารางที่ 7) จากข้อมูลความเค็มในตารางที่ 6 แสดงว่าเชื้อ A1-3 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเค็มในช่วง 47- 80 % salinity ที่ระยะเวลา 24-72 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 จำนวนโคโลนีของเชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงในอาหารต่างชนิด ได้แก่ Nutrient agar ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (NA+sea water), Marine agar (MA), Marine agar ที่เติม 1% NaCl (w/v) (MA+1%NaCl), Marine agar ที่เติม 3% NaCl (w/v) (MA+3%NaCl) และ Marine agar ที่เติม 5% NaCl (w/v) (MA+5%NaCl)

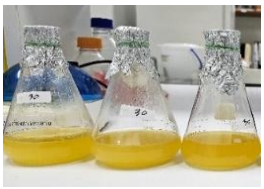
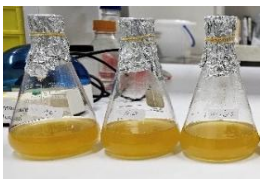
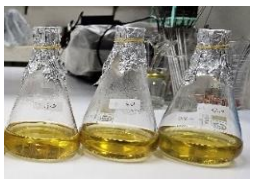
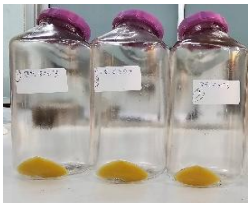
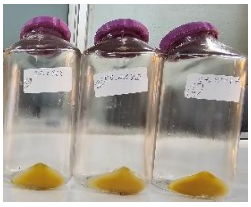
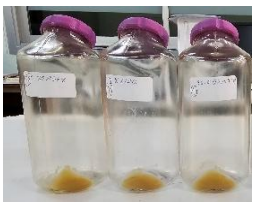
ตารางที่ 7 จำนวนโคโลนีเชื้อ A1-3 ที่เจริญในอาหารเหลว 5 ชนิด ได้แก่ Nutrient broth ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (NB+sea water), อาหาร Marine broth (MB) สูตรปกติ, อาหาร Marine broth ที่เติม NaCl เข้มข้น 1% (MB+1%NaCl), 3% (MB+3%NaCl) และ 5% (MB+5%NaCl)

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนโคโลนี (CFU/mL)				
	NB+sea water	MB	MB+1%NaCl	MB+3%NaCl	MB+5%NaCl
0	6.33×10^{5}	5.67×10^{5}	5.33×10^{5}	5.67×10^{5}	5.33×10^{5}
24	2.40×10^{8}	1.73×10^{4}	4.33×10^{4}	7.33×10^{6}	9.33×10^{6}
48	1.77×10^{8}	8.67×10^{4}	5.3×10^{6}	2.60×10^{7}	4.67×10^{7}
72	9.00×10^{7}	6.00×10^{5}	3.00×10^{7}	8.67×10^{7}	8.00×10^{7}
96	8.33×10^{7}	2.53×10^{6}	2.47×10^{6}	1.90×10^{7}	4.33×10^{7}
120	7.00×10^{6}	3.00×10^{4}	2.93×10^{6}	2.77×10^{6}	2.23×10^{7}

4.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ A1-3

ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร NB+sea water และ MB+3% NaCl (w/v) ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อมากที่สุด และบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ 30°C และ 40°C เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีใน 3 สภาวะ ได้แก่ การเลี้ยงในอาหาร NB+sea water ที่อุณหภูมิ 30°C, MB+3% NaCl (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และ NB+sea water บ่มที่อุณหภูมิ 40°C แต่ไม่พบการเจริญเติบโตในอาหาร MB+3% NaCl (w/v) ที่อุณหภูมิ 40°C (ตารางที่ 7) เมื่อทำการสกัดสารจากภายในเซลล์แบคทีเรียจาก 3 สภาวะดังกล่าวพบว่าได้ปริมาณสารสกัดที่ใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดที่เลี้ยงด้วยอาหาร NB+sea water ที่อุณหภูมิ 30°C, MB+3% NaCl (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และ NB+sea water บ่มที่อุณหภูมิ 40°C มีน้ำหนัก 0.036, 0.032 และ 0.037 ตามลำดับ (ตารางที่ 8) จากผลการทดลองจึงเลือกเชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงด้วย 3 สภาวะดังกล่าว คือ (1) NB+น้ำทะเล บ่มที่อุณหภูมิ 30°C, (2) MB+3% NaCl (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และ (3) NB+น้ำทะเล บ่มที่อุณหภูมิ 40°C ไปทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบาง

ตารางที่ 8 ลักษณะการเจริญของเชื้อ A1-3 ในอาหาร Nutrient broth + sea water และ Marine broth+3% NaCl (w/v) บ่มอุณหภูมิ 30°C และ 40°C

ชนิดอาหาร	**Nutrient broth+sea water**	**Marine broth+3% NaCl (w/v)**
ความเค็มรวม (ppt)	47	63
ลักษณะความขุ่นของเชื้อ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เวลา 72 ชั่วโมง		
ลักษณะความขุ่นของเชื้อ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เวลา 72 ชั่วโมง		
ตะกอนเซลล์หลังบ่ม ที่อุณหภูมิ 30°C เวลา 72 ชั่วโมง		
ตะกอนเซลล์หลังบ่ม ที่อุณหภูมิ 40°C เวลา 72 ชั่วโมง		

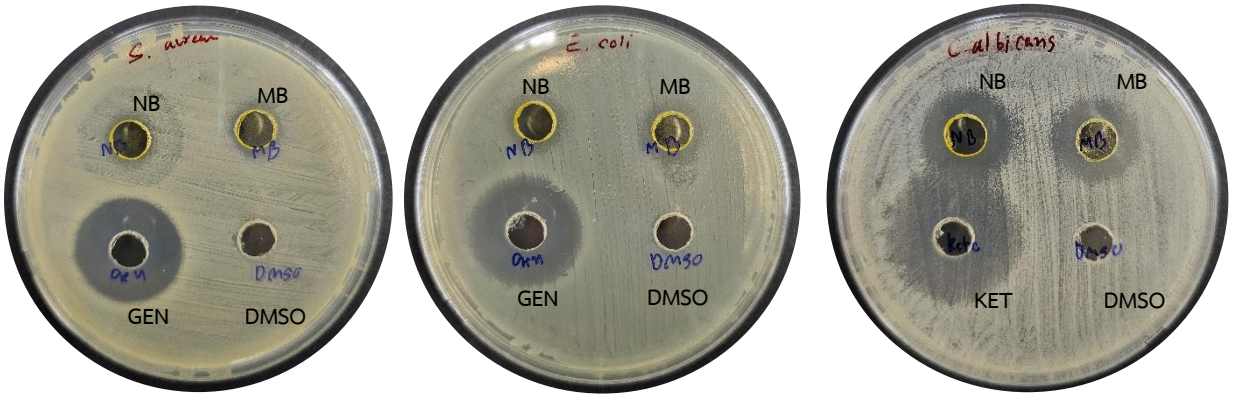
ตารางที่ 9 น้ำหนักเซลล์และสารสกัดของเชื้อ A1-3 ในอาหาร Nutrient broth ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล และ Marine broth ที่เติม NaCl 3% (w/v) เลี้ยงในอุณหภูมิ 30°C และ 40°C

ตัวอย่าง	น้ำหนักเซลล์เปียก (กรัม)	น้ำหนักรวมเซลล์เปียก (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)
NB+น้ำทะเล, 30°C	1.324±0.15	2.768	0.036
MB+3%NaCl, 30°C	1.382±0.04	3.248	0.032
NB+น้ำทะเล, 40°C	1.221±0.08	2.250	0.037
MB+3%NaCl, 40°C	0.540±0.04	0.340	0.002

หมายเหตุ: รวมตะกอนเซลล์จาก 3 ซ้ำ นำไปสกัดสารเนื่องจากเซลล์มีปริมาณน้อย จึงไม่มีค่า SD

4.2.1 การเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดจากเชื้อ A1-3

จากการนำเชื้อ A1-3 เลี้ยงในอาหาร NB+Sea water และ MB+3%NaCl (w/v) ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion ที่ความเข้มข้นสารสกัด 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หยอดลงไปในแต่ละหลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ปริมาณ 500 ไมโครกรัม) พบว่าสารสกัดจากเชื้อ A1-3 ปริมาณสาร 500 ไมโครกรัม สามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อยีสต์ *Candida albicans* และสารสกัดเชื้อ A1-3 ที่มาจากการเลี้ยงในอาหาร NB+Sea water และ MB+3%NaCl (w/v) แสดงฤทธิ์การยับยั้งไม่แตกต่างกันมีขนาด Inhibition zone เท่ากับ 22±0.00 และ 20.66±0.57 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนการทดสอบเชิงบวกของยา Ketoconazole มีขนาด 31.33±0.57 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4 และตารางที่ 10)



Staphylococcus aureus *Escherichia coli* *Candida albicans*

ภาพที่ 4 การยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดจากเชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (NB) และ Marine broth เติม NaCl 3% (w/v) (MB) ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Candida albicans* (Positive control:GEN=Gentamicin, KET=Ketoconazole, Negative control: DMSO=Dimethyl sulfoxide)

ตารางที่ 10 ขนาด inhibition zone (มิลลิเมตร) ของสารสกัดจากเชื้อ A1-3 ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Candida albican*

สารทดสอบ	ขนาด Inhibition zone (มิลลิเมตร)		
	Staphylococcus aureus	*Escherichia coli*	*Candida albicans*
A1-3 เลี้ยงในอาหาร NB	0±0.00	0±0.00	22±0.00
A1-3 เลี้ยงในอาหาร MB	0±0.00	0±0.00	20.66±0.57
Gentamicin	27±0.00	27.33±0.57	-
Ketoconazole	-	-	31.33±0.57
DMSO	0±0.00	0±0.00	0±0.00

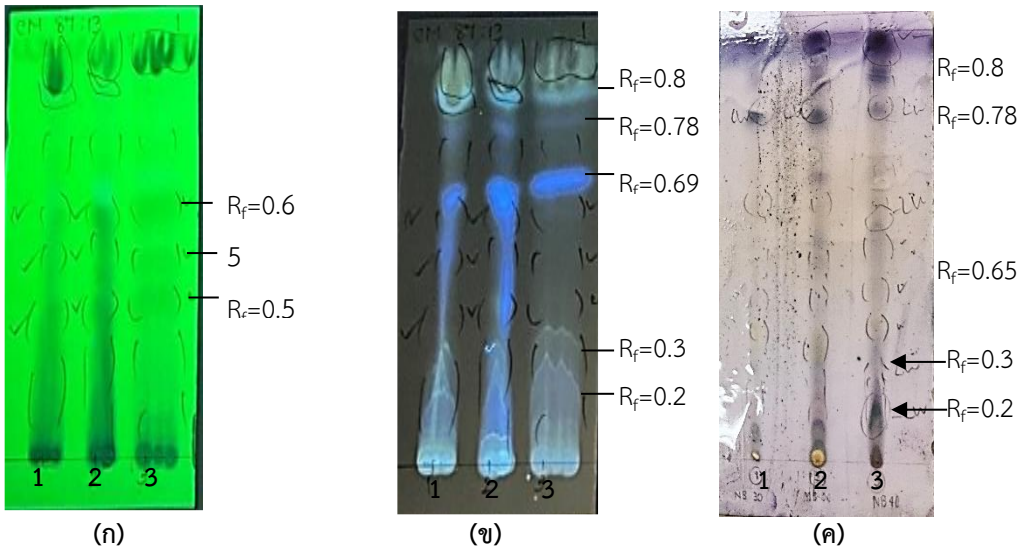
5. การศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

5.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

เชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน ได้แก่ หมายเลข 1 = NB+น้ำทะเล ที่ 30°C; หมายเลข 2 = MB+3% NaCl (w/v) ที่ 30°C และ หมายเลข 3 = NB+น้ำทะเล ที่ 40°C เมื่อนำมา

ทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น โดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography ที่เป็น silica gel และใช้ระบบ eluent ด้วย Chloroform : Methanol (87:13) แสดงดังภาพที่ 5 พบว่าองค์ประกอบของสาร A1-3 ทั้ง 3 สภาวะไม่แตกต่างกัน จากการตรวจสอบแถบสีที่ปรากฏภายใต้รังสี UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ภาพที่ 5 (ก)) มีแถบสีดำ (quenching zone) บนพื้นหลังสีเขียวของแสง fluorescent มีค่า R_f = 0.65, 0.58 และ 0.44 และเปรียบเทียบกับแผ่น TLC ภายใต้รังสี UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร (ภาพที่ 5 (ข)) พบว่า จากแถบที่ปรากฏมีค่า R_f = 0.8, 0.78, 0.69, 0.3 และ 0.2

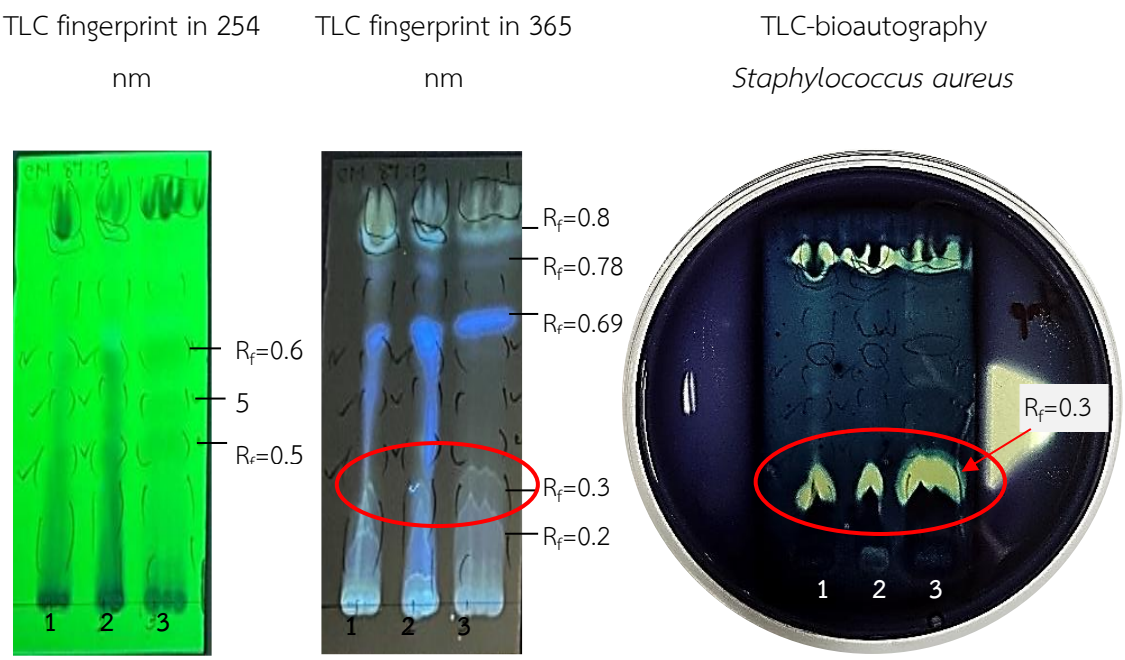
สำหรับการตรวจหา terpenoid โดยใช้ anisaldehyde-sulfuric acid และหลังจากการให้ความร้อนที่ 105 °C พบว่าบนแผ่น TLC ปรากฏเป็นแถบสีม่วงและสีเทาเขียว ซึ่งแสดงว่าเป็นสารกลุ่ม terpenoid ดังภาพที่ 5 (ค) ซึ่งค่า R_f ของสารสกัด A1-3 ที่เป็นสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์มีค่า R_f = 0.8, 0.78, 0.65, 0.3 และ 0.2 ลักษณะของสีที่แตกต่างกันขึ้นกับองค์ประกอบเคมีว่าเป็นประเภทใด เช่น สีม่วง (terpenes), สีน้ำเงิน (น้ำตาล), สีแดง (steroids) และสีเทา-เขียว (phenol) เป็นต้น (Merck, 1980) ซึ่งสารที่ค่า R_f = 0.3 และ 0.2 เมื่อตรวจสอบภายใต้รังสี UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และเรืองแสงเมื่อตรวจสอบด้วยรังสี UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และให้แถบสีม่วงเทาเมื่อพ่นด้วย anisaldehyde-sulfuric acid คาดว่าเป็นสารกลุ่ม terpenoid



ภาพที่ 5 แสดง TLC Chromatogram ของสารสกัดจากเชื้อ A1-3 ตรวจสอบภายใต้รังสี UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ก); รังสี UV ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร (ข); สเปรย์ด้วย anisaldehyde-sulfuric acid (ค)

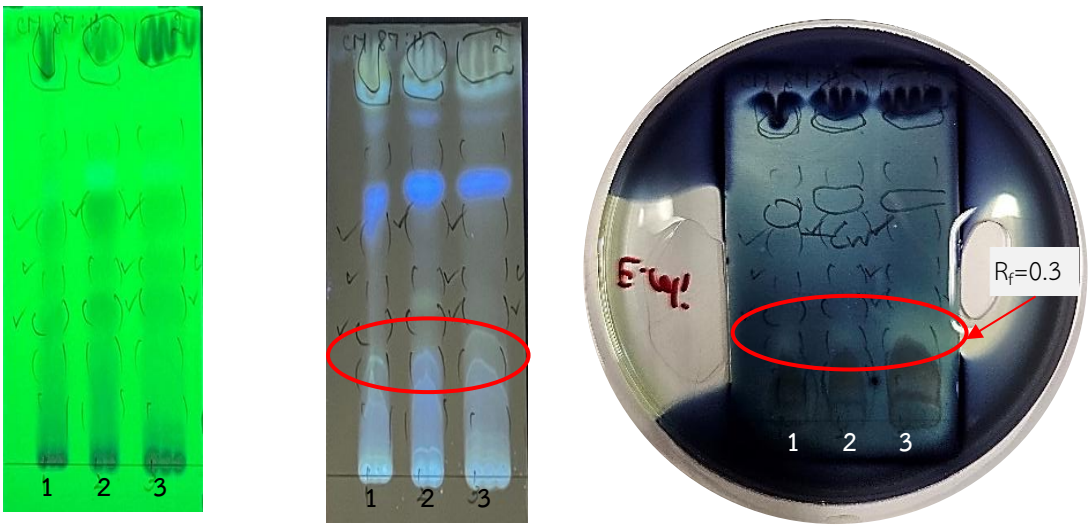
5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดของเชื้อ A1-3 เลี้ยงที่สภาวะที่แตกต่างกัน ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Candida albicans* ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC bioautography

สารประกอบที่แยกจากเชื้อ A1-3 ทั้ง 3 สภาวะ หมายเลข 1, 2, 3 (NB+น้ำทะเล ที่ 30°C, MB+3% NaCl (w/v) ที่ 30°C และ NB+น้ำทะเล ที่ 40°C) สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 6, 7 และ 8 จะเห็นว่าสารสกัดจากเชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงด้วย NB+น้ำทะเล ที่ 40°C (หมายเลข 3) จะแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งกับทุกเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเชื้อ *S. aureus* (ภาพที่ 6) จะมีศักยภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด ในขณะที่เชื้อที่เลี้ยงด้วยสภาวะอื่น ยังไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *C. albicans* ได้ (ภาพที่ 7, 8)



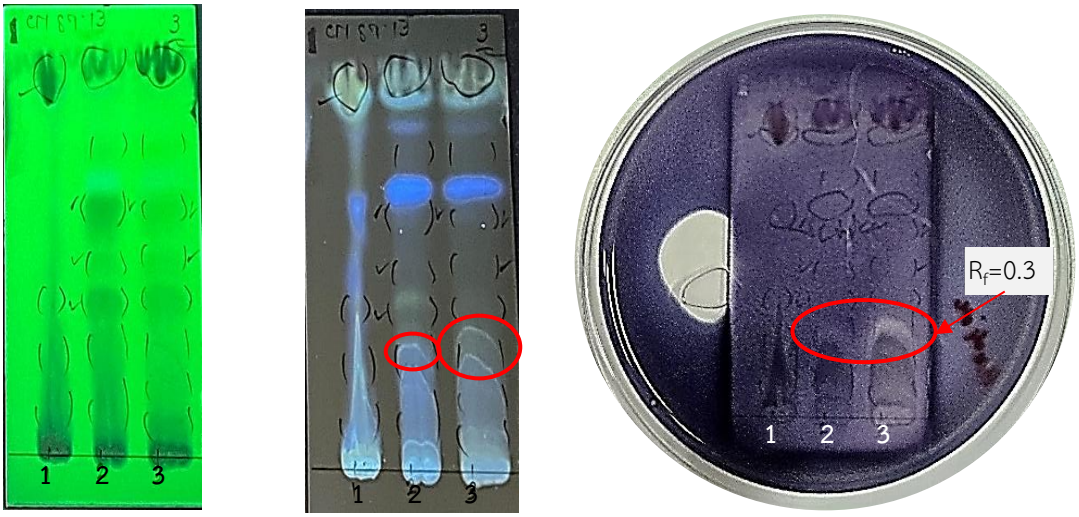
ภาพที่ 6 แสดง TLC-bioautography ของสารสกัดจากเชื้อ A1-3 กับการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*

TLC fingerprint in 254 nm | TLC fingerprint in 365 nm | TLC-bioautography *Escherichia coli*



ภาพที่ 7 แสดง TLC-bioautography ของสารจากสกัดเชื้อ A1-3 กับการต้านเชื้อ *Escherichia coli*

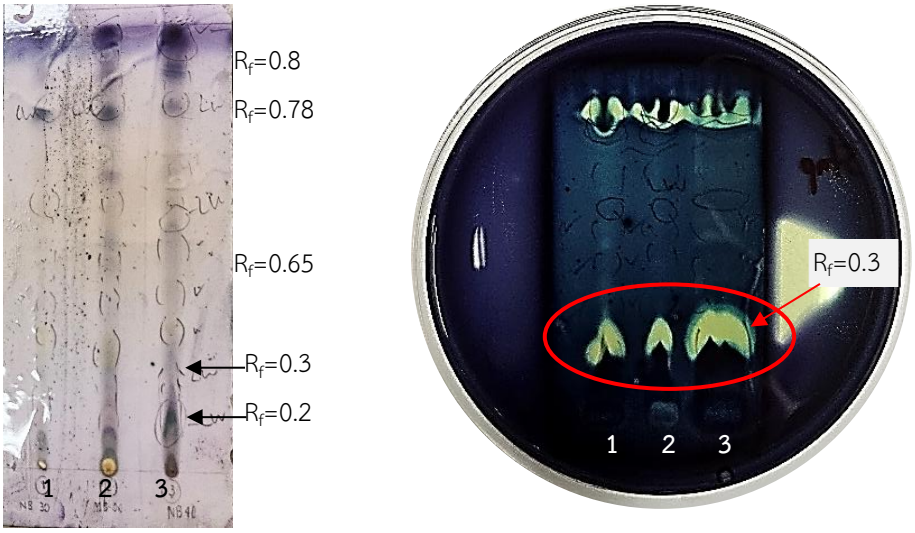
TLC fingerprint in 254 nm | TLC fingerprint in 365 nm | TLC-bioautography *Candida albicans*



ภาพที่ 8 แสดง TLC-bioautography ของสารสกัดจากเชื้อ A1-3 กับการต้านเชื้อ *Candida albicans*

จากการทดลองหลังจากการสเปรย์ด้วย MTT สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคแสดง clear zone ในตำแหน่งวงสีแดง ดังภาพที่ 6, 7, และ 8 พบว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจะเป็นกลุ่มที่มีขั้วสูง และสามารถดูดกลืนรังสี UV ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร เป็นสารที่มีค่า R_f = 0.3

จากการทดสอบคุณสมบัติของสารประกอบของ A1-3 สารประกอบที่ตำแหน่งค่า R_f=0.3 เป็นสารกลุ่ม terpenoid (สามารถดูดกลืนรังสี UV 254 นาโนเมตร และเรืองแสงที่ UV 365 นาโนเมตร และให้สีม่วงเทากับ anisaldehyde-H_2SO_4) และยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิด โดยเฉพาะกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* มีฤทธิ์การยับยั้งที่ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แสดงตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และคุณสมบัติสาร terpene ของสารสกัดจากเชื้อ A1-3

6. ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัด A1-3

สารสกัดหยาบจากเชื้อ A1-3 แสดงค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* มากกว่า 50,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่เชื้อ *Candida albicans* แสดงค่า MIC และ MBC เท่ากับ 50,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับยา Gentamicin แสดงค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S.aureus* เท่ากับ 0.39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแสดงค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *E.coli* เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนยา Ketoconazole แสดงค่า MIC และ MBC เท่ากับ 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อเชื้อ *C.albicans* (ตารางที่ 11) และยังพบว่าเชื้อก่อโรคทดสอบทุกชนิดสามารถเจริญได้ในหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่มี DMSO (growth control) ส่วนหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ไม่ได้เติมเชื้อทดสอบพบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบ (sterility control)

ตารางที่ 11 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบจากเชื้อ A1-3 และยาปฏิชีวนะต่อเชื้อก่อโรค

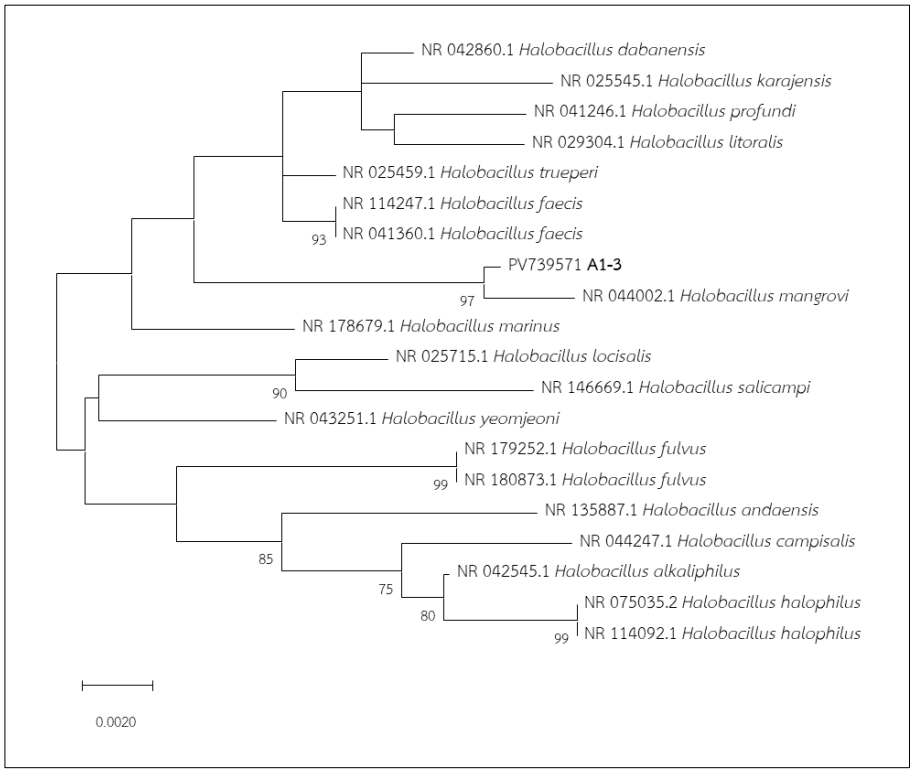
สารทดสอบ	*Staphylococcus aureus*		*Escherichia coli*		*Candida albicans*	
	MIC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	MBC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	MIC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	MBC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	MIC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	MBC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
สารสกัด A1-3	>50,000	>50,000	>50,000	>50,000	50,000	50,000
Gentamicin	0.39	0.39	1.56	1.56	-	-
Ketoconazole	-	-	-	-	625	625

*ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดจากเชื้อ A1-3 ที่ใช้ในการทดลองคือ 50,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

7. การระบุชนิดของเชื้อ A1-3

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของเชื้อ A1-3 (accession no.: PV739571 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Halobacillus mangrovi* accession no.: NR_044002 มีค่าร้อยละความเหมือน % identity = 99.52%, e-value = 0, % query coverage = 96%

7.1 วิเคราะห์ภาพแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic Tree) หรือแผนภาพที่แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้โมเดล Tamura-Nei (1993) ประเมินความน่าเชื่อถือของแผนภูมิต้นไม้โดยใช้ Bootstrap analysis 1000 รอบ จากแผนภูมิต้นไม้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ A1-3 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Halobacillus mangrovi* (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 แผนภูมิต้นไม้ ที่สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โดยใช้โมเดล Tamura-Nei (1993) แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างเชื้อ A1-3 และในสกุล *Halobacillus* จากฐานข้อมูล GenBank accession number PV739571 A1-3 ตัวเลขบนแผนภูมิแสดงค่าความเชื่อมั่นที่มากกว่า 50% จากการวิเคราะห์ bootstrap 1,000 ครั้ง

8. ข้อมูลจีโนมทั้งหมด (Draft genome) ของเชื้อ A1-3

8.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของจีโนม

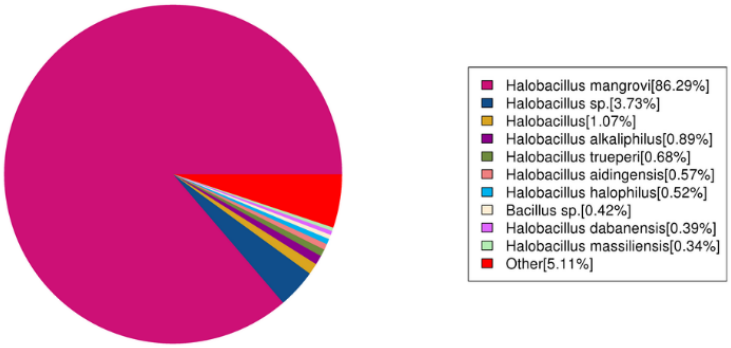
การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อจากฐานข้อมูล GenBank accession number JBPCEO000000000 เชื้อ *Halobacillus mangrovi* A1-3 (BioProject: PRJNA1274693, BioSample: SAMN48999307) พบว่ามีขนาด 3,988,660 bp มีค่า G + C content เท่ากับ 41.16% จำนวน Contig เท่ากับ 11 โดยมีค่า Contig N50 เท่ากับ 1,379,876 bp และค่า Contig N90 เท่ากับ 265,714 bp มีจำนวน coding sequences เท่ากับ 3,923 ในส่วน Non-coding RNA Prediction พบว่ามีจำนวน tRNA เท่ากับ 9 และ rRNA เท่ากับ 68 (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ข้อมูลจีโนมของเชื้อ A1-3

Feature	Value
Genome size (bp)	3,988,660
G + C content (%)	41.16
Contig number	11
Contig N50 (bp)	1,379,876
Contig N90 (bp)	265,714
Geneset number	3,923
(CDS: coding sequences)	
tRNA	9
rRNA	68
BioProject accession number	PRJNA1274693
BioSample accession number	SAMN48999307
Accession number	JBPCEO000000000

8.2 การวิเคราะห์ความเหมือนของสายพันธุ์ (Homologous species) ด้วยโปรแกรม Nr Annotation

จากข้อมูล draft genome ของเชื้อ A1-3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนที่เหมือนกันหรือ homologs กับเชื้อ *Halobacillus mangrovi* 86.29 % (ภาพที่ 11) และข้อมูลการกระจายของสายพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนเหมือนกัน (homologs) พบว่าข้อมูลส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน คือ *Halobacillus* และอาจบ่งชี้ว่าโปรตีนนี้เป็นชนิดอนุรักษ์ (conserved) ซึ่งจะพบได้เฉพาะในกลุ่มสกุลนี้



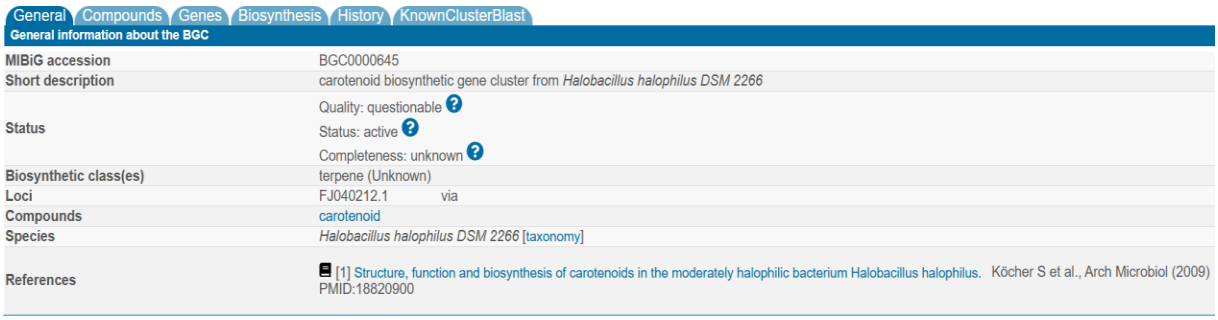
ภาพที่ 11 การวิเคราะห์การกระจายสายพันธุ์ (Homologous Species Distribution) ด้วยโปรแกรม Nr Annotation สีที่แตกต่างกันบ่งบอกถึงความแตกต่างของชนิด

8.3 การวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิด้วยโปรแกรม antiSMASH Annotation

จากการวิเคราะห์ข้อมูล draft genome ด้วยโปรแกรม antiSMASH Annotation ver.8 พบว่าเชื้อ A1-3 มี genomic regions ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารกลุ่ม secondary metabolites ทั้งหมด 7 region ได้แก่ region 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2 และ 3.1 ซึ่ง region 1.4 แสดงลักษณะที่บ่งชี้ว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารกลุ่ม Terpene ใกล้เคียงกับเชื้อ *Halobacillus halophilus DSM 2266* ในฐานข้อมูล MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster) เลข MIBiG accession number: BGC0000645 (ภาพที่ 12) และแสดงกลุ่มยีนที่มีความใกล้เคียงกับยีนที่ผลิตสาร carotenoids ในฐานข้อมูล BGCs (Biosynthetic Gene Clusters) ที่มีข้อมูลผลการทดลองเป็นที่รู้จัก (Most similar known cluster) มีค่า % similarity เท่ากับ 100% (ตารางที่ 13) บ่งชี้ได้ว่าเชื้อ A1-3 น่าจะมีกลุ่มยีนสำคัญทำหน้าที่ในการสร้างสารกลุ่ม Terpene

ตารางที่ 13 ตำแหน่งยีนที่สร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ของเชื้อ A1-3

Region	Type	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	Terpene		
Region 1.2	T3PKS	Surfactin	8%
Region 1.3	Batalactone	Fengycin	46%
Region 1.4	**Terpene**	**Carotenoid**	**100%**
Region 2.1	LAP		
Region 2.2	NI-siderophore	Schizokinen	50%
Region 3.1	Ectoine	Ectonine	75%



General | Compounds | Genes | Biosynthesis | History | KnownClusterBlast

General information about the BGC

MIBiG accession	BGC0000645
Short description	carotenoid biosynthetic gene cluster from *Halobacillus halophilus DSM 2266*
Status	Quality: questionable Status: active Completeness: unknown
Biosynthetic class(es)	terpene (Unknown)
Loci	FJ040212.1 via
Compounds	carotenoid
Species	*Halobacillus halophilus DSM 2266* [taxonomy]
References	[1] Structure, function and biosynthesis of carotenoids in the moderately halophilic bacterium Halobacillus halophilus. Köcher S et al., Arch Microbiol (2009) PMID:18820900

ภาพที่ 12 ข้อมูลกลุ่มยีนที่สร้างสารทุติยภูมิของเชื้อ *Halobaciilus halophilus DSM 2266* จากฐานข้อมูล MIBiG accession number: BGC0000645

บทที่ 4
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์มักเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ เชื้อบางสายพันธุ์มีความสามารถในการปรับตัวและพัฒนาตัวเองจนกลายเป็นเชื้อที่ดื้อยาและหายารักษาได้ยากจนเป็นเหตุให้มีการเสียชีวิตจากการติดเชื้อในที่สุด เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพเกือบทุกชนิดจัดเป็นโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ที่เป็นอันตรายร้ายแรงต่อสุขภาพของมนุษย์ ทั่วโลกประสบกับปัญหาเชื้อดื้อยาและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ส่งผลกระทบทางเศรษฐกิจและสังคม จึงมีความจำเป็นต้องค้นหาสารต้านจุลชีพจากแหล่งที่มีศักยภาพ ปัจจุบันพื้นที่ป่าชายเลนได้รับความสนใจในการเป็นแหล่งของสารสำคัญทางชีวภาพจากธรรมชาติ เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ และมีความหลากหลายทางชีวภาพ เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่คัดแยกจากป่าชายเลนมีรายงานว่าสามารถสร้างสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้ เช่น สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็ง เป็นต้น (Cahlia et al., 2023; Ramasubburayan et al., 2015) เชื้อกลุ่ม *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างสปอร์ได้ จึงมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของระบบนิเวศป่าชายเลนได้ดี เช่น การเปลี่ยนของอุณหภูมิ หรือความเค็ม การศึกษานี้ได้ทำคัดแยกเชื้อกลุ่ม *Bacillus* จากดินป่าชายเลน ได้จำนวน 14 Isolate จากนั้นทำการสกัดสารจากภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 3 สายพันธุ์ที่มักเกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus และ Candida albicans* โดยใช้เทคนิค Agar well diffusion เชื้อที่ถูกคัดเลือกคือเชื้อ A1-3 เนื่องจากสามารถแสดงการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 3 ชนิด โดยเฉพาะเชื้อ *C. albicans* ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเชื้อ A1-3 ปริมาณ 250 ไมโครกรัมสามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด มีขนาด Inhibition zone 16.83±0.76 มิลลิเมตร จึงคัดเลือกเชื้อ A1-3 ศึกษาในระดับยีนต่อไป จากรายงานการศึกษาของ Mohammad et al. (2011) พบว่าสารสกัดจากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่คัดแยกจากดินมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* มีขนาดการยับยั้ง เท่ากับ 19, 25 และ 21 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Moshafi et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค Agar well diffusion เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นในการคัดเลือกเชื้อที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเท่านั้น ยังมีข้อจำกัดด้านความไว (sensitivity) ในการทดสอบ เนื่องจากการวัดโซนยับยั้งขึ้นอยู่กับการแพร่ (diffusion) ของสารในวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจได้รับผลกระทบจากหลายปัจจัย เช่น ขนาดโมเลกุล ความสามารถในการละลาย หรือความหนืดของสาร ทำให้สารบางชนิดที่ออกฤทธิ์ดีอาจให้โซนยับยั้งเล็กหรือไม่มีโซน ไม่สามารถระบุความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ (บอกได้เพียงว่าสารนั้นแสดงฤทธิ์ยับยั้งหรือไม่) และความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม

เช่น ความหนาของวุ้น อุณหภูมิ หรือความเป็นกรดด่าง จึงพบได้ว่าบางการทดสอบเชื้อ A1-3 แสดงผลยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 3 ชนิด แต่บางการทดสอบยับยั้งได้ชัดเจนเพียงเชื้อบางตัว จึงจำเป็นต้องทำการทดสอบยืนยันและวัดประสิทธิภาพด้วยวิธีการอื่นเพิ่มเติม ได้แก่ การประเมินค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเชื้อ A1-3 ในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC: Minimum inhibitory concentration), การประเมินค่าความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC: Minimum bactericidal concentration) และการทดสอบ TLC-Bioautography

การจำแนกสายพันธุ์เชื้อ A1-3 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) บริเวณยีน 16S rRNA และการวิเคราะห์ภาพแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic Tree) แบบ Maximum likelihood โดยการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างเชื้อ A1-3 และเชื้อชนิดอื่นในสกุล *Halobacillus* จากฐานข้อมูล GenBank พบว่าเชื้อ A1-3 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อสายพันธุ์ *Halobacillus mangrovi* โดยมีค่า bootstrap support สูง 97% สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความเหมือนของสายพันธุ์ (Homologous species) ด้วยโปรแกรม Nr Annotation จากข้อมูล draft genome ซึ่งพบว่าเชื้อ A1-3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีนที่เหมือนกันกับเชื้อ *H. mangrovi* ที่ 86.29 % (ภาพที่11) จากการวิเคราะห์ข้างต้นบ่งชี้ว่าเชื้อ A1-3 มีความใกล้เคียงกับเชื้อสายพันธุ์ *H. mangrovi* ซึ่งเชื้อดังกล่าวมีรายงานการค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 2008 จากใบของต้นโกงกาง *Avicennia germinans* (black mangrove) ในบริเวณป่าชายเลน (Soto-Ramirez et al., 2008) เชื้อชนิดนี้ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างแบบท่อน ยาว 1–2 มิลลิเมตร และกว้าง 0.5–1 มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับภาพถ่ายของเชื้อ A1-3 ภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างสปอร์ และเคลื่อนที่ได้ ลักษณะโคโลนีของเชื้อเมื่อเลี้ยงบนอาหาร Sehgal–Gibbons medium มีสีครีม ขอบเรียบ รูปร่างกลม ผิวโค้งนูน และยกตัวขึ้นจากผิวหน้าอาหาร (Soto-Ramirez et al., 2008) Yaradoddi & Mudgulkar (2020) รายงานการพบเชื้อ *H. mangrovi* ที่คัดแยกจากตัวอย่างดินเพาะปลูกบริเวณชายฝั่งตะวันตกของรัฐกรณาฏกะ ประเทศอินเดีย พบลักษณะโคโลนีมีสีครีมเมื่อเลี้ยงบนอาหาร NA ที่เติม 10%NaCl (Yaradoddi Jayachandra & Mudgulkar Sulochana, 2020) อย่างไรก็ตามเชื้อ A1-3 ที่คัดแยกได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร NA+sea water แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เวลา 48 ชั่วโมง สามารถเจริญเติบโตได้ดี โคโลนีมีขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร ลักษณะสีเหลืองอ่อนอมส้ม แต่เจริญได้ช้าในอาหาร MA+1%NaCl, MA+3%NaCl และ MA+5%NaCl โคโลนีมีขนาดเล็ก สีเหลืองอมส้ม โตช้าต้องใช้เวลาบ่มมากกว่า 72 ชั่วโมง และไม่สามารถเจริญได้ในอาหาร MA สูตรปกติที่ไม่ได้เพิ่ม NaCl ในส่วนประกอบ เป็นไปได้ว่าสารอาหาร องค์ประกอบของน้ำทะเล และความเค็มของอาหารแต่ละชนิดอาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อ A1-3

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. mangrovi* (A1-3) เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ในการทดสอบ โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและปริมาณสารสกัดจากภายในเซลล์ พบว่าเชื้อที่เลี้ยงด้วยอาหาร NB+sea water เจริญได้ดีที่สุด และเชื้อสามารถเจริญได้ในช่วงความเค็ม 47-80 ppt เวลา 24-72 ชั่วโมง ซึ่งลักษณะการเจริญของเชื้อ A1-3 ในอาหารเหลวเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการเจริญบนอาหารแข็งสูตรเดียวกัน Soto-Ramires et al. (2008) รายงานว่าเชื้อ *H. mangrovi* สามารถเจริญได้ในอาหาร Sehgal–Gibbons medium ที่เติม 5-20% NaCl (w/v) และสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่เติม NaCl 10% (w/v) จึงจัดเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ชอบเกลือปานกลาง (moderate halophilic bacteria) คืออยู่ในช่วง 5 - 20% NaCl (w/v) แต่อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบความเค็มของอาหารแต่ละชนิดในหน่วย % NaCl ทำได้ยาก เนื่องจากองค์ประกอบพื้นฐานของอาหารแต่ละชนิดมีความเค็มที่ต่างกัน เช่น อาหาร Maine agar สำเร็จรูป ออกแบบมาโดยเฉพาะสำหรับแบคทีเรียในทะเล มีองค์ประกอบของเกลือหลากหลายชนิดเช่น NaCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl ฯลฯ เพื่อเลียนแบบองค์ประกอบของน้ำทะเล เมื่อวัดความเค็มด้วยเครื่อง salinometer มีความเค็มประมาณ 35% ppt หากพิจารณาเพียง NaCl ในสูตรอาหาร MA นี้มีปริมาณ 19.45 กรัม/ลิตร 19.45 ppt) ซึ่งสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Sehgal–Gibbons medium (0.5-1 กรัม/ลิตร) มาก จึงทำให้ในงานวิจัยของ Soto-Ramires et al (2008) ได้ทำการทดลองเติม 0-20% NaCl (w/v) ลงในอาหาร Sehgal–Gibbons medium แล้วพบว่าเชื้อยังสามารถเจริญได้ อย่างไรก็ตามไม่ได้มีการรายงานค่าความเค็มในหน่วย ppt จึงทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบความเค็มของอาหารทั้ง 2 สูตรที่แท้จริงได้

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีใน 3 สภาวะ ได้แก่ การเลี้ยงในอาหาร NB+sea ที่อุณหภูมิ 30°C, MB+3%NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และ NB+sea water บ่มที่อุณหภูมิ 40°C แต่ไม่พบการเจริญเติบโตในอาหาร MB+3%NaCl ที่อุณหภูมิ 40°C สอดคล้องกับรายงานที่พบว่าเชื้อ *H. mangrovi* เจริญได้ดีภายใต้สภาวะอุณหภูมิช่วง 24-45 °C (Yaradoddi Jayachandra & Mudgulkar Sulochana, 2020) เมื่อทำการสกัดสารจากภายในเซลล์ของเชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงภายใต้ 3 สภาวะดังกล่าว พบว่าได้ปริมาณสารสกัดที่ใกล้เคียงกัน และเมื่อทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus, E. coli* และ *C. albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าเชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงในอาหาร NB+Sea water และ MB+3%NaCl แสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. albicans* ไม่แตกต่างกันที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/หลุม มีขนาด Inhibition zone เท่ากับ 22±0.00 และ 20.66±0.57 มิลลิเมตร ตามลำดับ

การศึกษาองค์ประกอบของสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคจากสารสกัดจากเชื้อ *H. mangrovi* (A1-3) ที่เลี้ยงด้วยสภาวะที่ต่างกัน (หมายเลข 1, 2 และ 3) มีองค์ประกอบทางเคมีของ

สารสกัดไม่แตกต่างกัน ดังภาพที่ 6-8 พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolites) ได้ในสภาวะที่รุนแรง ได้แก่ หมายเลข 3 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40°C ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อกลุ่ม halophilic bacteria สามารถปรับตัวตามสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติที่รุนแรงได้ดี และเมื่อทำการศึกษาสารประกอบเบื้องต้นด้วย TLC พบว่าสารที่มีค่า R_f = 0.3 และ 0.2 เมื่อตรวจสอบภายใต้รังสี UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และเรืองแสงสีขาวเมื่อตรวจสอบด้วยรังสี UV ความยาวคลื่น 365 nm แสดงว่ามี aromatic ring หรือมีพันธะคู่สลับ (conjugated double bond) ในโครงสร้างสารประกอบ และให้แถบสีม่วงเทาเมื่อพ่นด้วย anisaldehyde-sulfuric acid ซึ่งเป็นสารกลุ่ม terpene เมื่อนำสารสกัดจากเชื้อ *H. mangrovi* (A1-3) มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี TLC-Bioautography (ภาพที่ 9) ปรากฏบริเวณการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ของสารประกอบที่มีค่า R_f = 0.3 (สารกลุ่ม terpene หรือ terpenoid) โดยที่สารเทอร์พีนอยด์เป็นกลุ่มสารประกอบที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติที่หลากหลายรวมถึงจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งได้รับการยอมรับมากขึ้นเรื่อยๆ ว่าเป็นผู้ผลิตเทอร์พีนอยด์ที่มีความหลากหลายทางโครงสร้างและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยจุลินทรีย์สามารถสร้างสาร terpenoids ผ่านเส้นทางการสังเคราะห์ทางชีวภาพ และแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เมื่อจับกับเอนไซม์หรือไรโบโซมที่มีความเฉพาะ นอกจากเทอร์พีนอยด์ที่ผลิตขึ้นอย่างต่อเนื่องจากจุลินทรีย์แล้ว ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตเทอร์พีนอยด์อันเป็นผลจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ได้อีกด้วย การผลิตเทอร์พีนอยด์อาจเกิดขึ้นได้จากกลไกการแข่งขันหรือการป้องกันตัวของจุลินทรีย์ (Avalos et al., 2022) ซึ่งมีรายงานว่าสารกลุ่ม terpenes สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร (food-borne microorganisms) เช่น เชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *B. cereus* (Gallucci et al., 2009) และสารกลุ่ม terpenoids ที่สร้างจากเชื้อกลุ่ม *Bacillus* อาจจะสามารถนำไปพัฒนาในการต้านเชื้อไวรัส และโรคมะเร็งได้ในอนาคต (Shukla et al., 2022) อย่างไรก็ตามข้อมูลในการศึกษาสารออกฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อ *Halobacillus* sp. ยังมีจำนวนน้อย และไม่พบข้อมูลการศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของเชื้อ *H. mangrovi* จากการที่กลุ่ม halophilic bacteria สามารถปรับตัวตามสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติที่รุนแรงได้ดี ทำให้สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีศักยภาพที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ในปี ค.ศ. 2022 Ali และคณะ พบว่าสาร 1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid และ 4-chloro- 1*H*-pyrrole-2-carboxylic acid ที่แยกจากเชื้อ *H. marinus* HMALI004 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ได้ ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Ali et al., 2022) ดังรายงานของ Saleem และคณะ (2024) พบว่า สารทุติยภูมิ ที่ได้จากเชื้อ *Halobacillus* sp. มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ปานกลาง โดยแสดงโซนการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ 11 มิลลิเมตร ขณะที่ *E. coli* และ *C. albicans* ยับยั้งที่ 13 มิลลิเมตร เมื่อทำการวิเคราะห์

สารประกอบด้วย GC-MS พบสารประกอบหลัก ได้แก่ cyclo(L-prolyl-L-valine), pyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylprop), 2,5-piperazinedione,3,6-bis (2-methylpropyl) และ pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione,hexahydro-3-(phenylmethyl) (Saleem et al., 2024) สารประกอบเหล่านี้น่าจะมีส่วนช่วยในการรักษาโครงสร้างและหน้าที่ของชุมชนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศที่มีเกลือสูง นอกจากนี้ยังพบสารแคโรทีนอยด์ ได้แก่ lycopene, lutein และ β-carotene ที่แยกจากเชื้อแบคทีเรียที่มีสี *H. yeomjeoni* ซึ่งสารสกัดหยาบจากเชื้อนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (Sricharoen et al., 2022) จากการทดสอบหาค่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) และค่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC) ของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *H. mangrove* ด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสารสกัดจากเชื้อ A1-3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีกว่าเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* โดยมีค่า MIC และ MBC สำหรับ *C. albicans* เท่ากับ 50,000 µg/mL ขณะที่เชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดแสดงค่า MIC และ MBC ที่สูงกว่า 50,000 µg/mL

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Saleem และคณะ (2024) ที่ระบุว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Halobacillus* sp. จากบ่อเกลือในประเทศอินเดียสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *C. albicans* ได้ที่ค่า MIC 128 µg/mL แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้นั้น พบว่าผลการทดลองดังกล่าวไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้โดยตรง เนื่องจากกระบวนการสกัดสารที่แตกต่างกัน โดยงานวิจัยนี้เป็นการสกัดสารจากภายในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งอาจส่งผลให้องค์ประกอบทางเคมีและความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่ได้แตกต่างกัน และเป็นเหตุผลที่ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคแตกต่างกันไป

ข้อมูลจีโนมทั้งหมด (Draft genome sequence) ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Illumina sequencing พบว่าเชื้อ *H. mangrovi* มีขนาด 3,988,660 bp มีค่า G + C content เท่ากับ 41.16% มีจำนวน 11 Contig โดยมีค่า Contig N50 เท่ากับ 1,379,876 bp และค่า Contig N90 เท่ากับ 265,714 bp มีจำนวน coding sequences เท่ากับ 3,923 ในส่วน Non-coding RNA Prediction พบว่ามีจำนวน tRNA เท่ากับ 9 และ rRNA เท่ากับ 68 แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลจากงานวิจัยมีความแตกต่างกับข้อมูล Draft genome ของเชื้อ *H. mangrovi* KTB 131 ที่คัดแยกจากเกลือในประเทศเกาหลี (Woo et al., 2017) ซึ่งวิเคราะห์จีโนมโดยใช้เครื่อง PacBio RS II พบว่าจีโนมมีขนาด 4,151,649 bp, G +C content 41.6% จำนวน 1 Contig จำนวน tRNA เท่ากับ 42 และ rRNA เท่ากับ 11 เนื่องจากการวิเคราะห์ draft genome ด้วยเครื่อง PacBio RS II ให้ long reads (ความยาวเฉลี่ย ~10-20 kb) ซึ่งช่วยแก้ปัญหาการประกอบจีโนมในบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำได้ดีกว่า ทำให้ได้จีโนมที่ยาวและสมบูรณ์กว่า อย่างไรก็ตามความแม่นยำต่อ read อาจต่ำกว่าเครื่อง Illumina ซึ่งการใช้เครื่อง Illumina ให้ short reads (ความยาว ~100-300 bp) ที่มีความ

แม่นยำสูง แต่การประกอบจีโนม (assembly) จาก short reads อาจมีปัญหาในบริเวณที่มีลำดับซ้ำ (repetitive regions) ทำให้เกิดช่องว่าง (gaps) หรือการประกอบที่ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้จีโนมที่ได้อาจสั้นกว่าหรือขาดบางส่วน ความยาวจีโนมที่ต่างกันเกิดจากความสามารถในการจัดการลำดับซ้ำและความสมบูรณ์ของการประกอบจีโนมเครื่อง PacBio ได้เปรียบในแง่ long reads ที่ให้ contigs ยาวและครอบคลุมกว่า ส่วนเครื่อง Illumina ให้ข้อมูลแม่นยำแต่มีข้อจำกัดในบริเวณซับซ้อน แม้ว่าการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์จีโนมที่ต่างกันส่งผลให้ได้ข้อมูลที่ให้ผลลัพธ์ต่างกัน (เช่น ความยาวจีโนม, ความสมบูรณ์ของ contigs, หรือจำนวนช่องว่าง) แต่ก็ยังสามารถทำนาย (annotation) หรือระบุหน้าที่ของยีน รวมถึงการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร secondary metabolites ด้วยโปรแกรม antiSMASH ได้

โปรแกรม antiSMASH (antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์จีโนมเพื่อระบุและจำแนก BGCs (Biosynthetic Gene Clusters) โดยจะตรวจจับลำดับยีนที่มีลักษณะเฉพาะของการผลิตสาร secondary metabolites โดยเปรียบเทียบในฐานข้อมูล MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลและมาตรฐานสำหรับการจัดเก็บและแบ่งปันข้อมูลเกี่ยวกับ BGCs ที่สำคัญ เช่น ยาปฏิชีวนะหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ MIBiG ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อรวบรวมข้อมูลที่ครบถ้วนและเป็นระบบเกี่ยวกับ BGCs ที่ได้รับการพิสูจน์แล้วในการทดลอง จากการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมของเชื้อ *H. mangrovi* (A1-3) พบว่า มีกลุ่มยีนที่สามารถสังเคราะห์สารกลุ่ม Terpene มีลำดับยีนและโครงสร้างที่เหมือนกับ BGCs ที่รู้จัก (Most similar known cluster) ซึ่งสามารถผลิตสาร carotenoids ได้ ซึ่งพบในเชื้อ *Halobacillus halophilus DSM 2266* (MIBiG accession number: BGC0000645) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวได้รับการยืนยันจากงานทดลองแล้ว กลุ่มยีน BCG จากเชื้อ *H. mangrovi* (A1-3) Region 1.4 มีค่า % similarity เท่ากับ 100% บ่งชี้ว่า BGC นี้มีลักษณะที่ conserved มากใน เชื้อ *H. halophilus DSM 2266* (Köcher et al., 2009) นอกจากนี้พบว่าเมื่อนำข้อมูล Draft genome ของเชื้อ *H. mangrovi* KTB 131 ที่รายงานโดย Mingyeong et al (2014) ซึ่งวิเคราะห์จีโนมโดยใช้เครื่อง PacBio RS II (GenBack accession number:CP020772.1) ไปทำการวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม antiSMASH ได้ผลเช่นเดียวกันกับการวิจัยในครั้งนี้โดยพบ BGCs ซึ่งสังเคราะห์สารกลุ่ม Terpene เดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์จีโนมด้วยเครื่อง Illumina และ PacBio ให้ผลการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่สร้าง สาร secondary metabolites ด้วยโปรแกรม antiSMASH ไม่แตกต่างกัน ซึ่งการพบตำแหน่งกลุ่มยีนที่สร้างสารกลุ่ม Terpene ดังกล่าวเป็นการสนับสนุนผลการทดลอง TLC Chromatogram ที่ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารกลุ่ม terpene หรือ terpenoid จากสารสกัดจากเชื้อ *H. mangrovi* โดยถูกตรวจสอบด้วย anisaldehyde-sulfuric acid (ภาพที่ 9) อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการวิเคราะห์ BGCs ของเชื้อ

H. mangrovi ด้วย antiSMASH ในด้านการศึกษาสาร secondary metabolites ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคในมนุษย์

ผลการศึกษานี้พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Halobacillus mangrovi* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิดได้แก่ *C. albicans, E. coli และ S. aureus* เมื่อทำการวิเคราะห์ในระดับจีโนมพบข้อมูลสอดคล้องกับการทดลององค์ประกอบสารเคมีของสารสกัด ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคนั้นอาจจะเป็นกลุ่ม Terpenes ซึ่งสามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการพัฒนาสารต้านจุลชีพที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อดื้อยาได้ในอนาคต

ขณะนี้ผลงานวิจัยอยู่ในขั้นตอนการเตรียมบทความชื่อเรื่อง *Halobacillus mangrovi* A1-3 Extracts Isolated from Thai Mangrove Ecosystems: Anti-Human Pathogen Activity and Genomic Insights เพื่อเสนอแก่วารสาร International Journal of Agricultural Technology (IJAT)

ข้อเสนอแนะ การทำวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในการประยุกต์ผลงานวิจัยที่ได้

งานวิจัยที่ล่าช้ากว่ากำหนดมีสาเหตุหลักสองประการ ดังนี้ ประการแรก การเตรียมสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงในปริมาณมากและใช้ระยะเวลานาน เพื่อให้ได้สารเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์และทดสอบ ประการที่สอง การวิเคราะห์จีโนมทั้งหมด มีปริมาณข้อมูลจำนวนมาก จึงต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ข้อมูล

งานวิจัยนี้ได้ค้นพบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับ *H. mangrovi* ซึ่งสามารถนำไปต่อยอดเพื่อผลิตเชื้อในปริมาณมากด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ และนำสารที่สกัดได้ไปใช้ในการทดสอบต่างๆ ต่อไป นอกจากนี้ ข้อมูลจากการวิเคราะห์จีโนมยังช่วยให้ระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ดังนั้น ผลการวิจัยนี้จึงมีคุณค่าอย่างยิ่งในการพัฒนาสารต้านจุลชีพเพื่อรับมือกับปัญหาเชื้อดื้อยาที่เพิ่มขึ้น โดยให้ข้อมูลเชิงลึกในระดับจีโนม ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านพันธุวิศวกรรมเพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ที่มีความเฉพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพสูงในการต่อสู้กับเชื้อก่อโรคได้อย่างแม่นยำยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Ali, S., Cai, R., Feng, H., Xie, J., Zhang, Y., & Wang, H. (2022). Identification of antibacterial metabolites produced by a marine bacterium *Halobacillus marinus* HMALI004. *Journal of Applied Microbiology*, *133*(5), 3030-3040.

Avalos, M., Garbeva, P., Vader, L., van Wezel, G. P., Dickschat, J. S., & Ulanova, D. (2022). Biosynthesis, evolution and ecology of microbial terpenoids. *Natural Product Reports, 39*(2), 249-272.

Blin, K., Shaw, S., Vader, L., Szenei, J., Reitz, Z. L., Augustijn, H. E., Cediel-Becerra, J. D., de Crécy-Lagard, V., Koetsier, R. A., & Williams, S. E. (2025). antiSMASH 8.0: extended gene cluster detection capabilities and analyses of chemistry, enzymology, and regulation. *Nucleic acids research, 53*(1),32-38.

Cahlia, U., Astuti, R. I., Nomura, J., & Wahyudi, A. T. (2023). Antioxidant properties of active fraction extract derived from yellow-red pigment produced by the marine sponge-associated bacterium *Bacillus haikouensis* AGS112 and identification of related compounds. *HAYATI Journal of Biosciences*, *30*(5), 874-884.

Chen, L., Wang, G., Bu, T., Zhang, Y., Wang, Y., Liu, M., & Lin, X. (2010). Phylogenetic analysis and screening of antimicrobial and cytotoxic activities of moderately halophilic bacteria isolated from the Weihai Solar Saltern (China). *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26*, 879-888.

Chung, S., Kong, H., Buyer, J. S., Lakshman, D. K., Lydon, J., Kim, S.-D., & Roberts, D. P. (2008). Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Applied Microbiology and Biotechnology, 80*, 115-123.

Daas, M. S., Rosana, A. R. R., Acedo, J. Z., Douzane, M., Nateche, F., Kebbouche-Gana, S., & Vederas, J. C. (2018). Insights into the draft genome sequence of bioactives-producing *Bacillus thuringiensis* DNG9 isolated from Algerian soil-oil slough. *Standards in Genomic Sciences, 13*, 1-10.

De Farias, F. M., Francisco, M. S., de Sousa Santos, I. N., Marques-Bastos, S. L. S., Miguel, M. A. L., Albano, R. M., & de Freire Bastos, M. d. C. (2019). Draft genome sequence of *Enterococcus faecium* E86, a strain producing broad-spectrum antimicrobial peptides: Description of a novel bacteriocin immunity protein and a novel sequence type. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 17, 195-197.

Gallucci, M. N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J., & Demo, M. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne *microorganisms Escherichia coli, Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus. Flavour and fragrance journal, 24*(6), 348-354.

Grzelak, E. M., Hwang, C., Cai, G., Nam, J.-W., Choules, M. P., Gao, W., Lankin, D. C., McAlpine, J. B., Mulugeta, S. G., & Napolitano, J. G. (2016). Bioautography with TLC-MS/NMR for rapid discovery of anti-tuberculosis lead compounds from natural sources. *ACS infectious diseases, 2*(4), 294-301.

Gupta, S., Sharma, P., Dev, K., Baumler, D. J., & Sourirajan, A. (2019). Draft genome sequence of *Halobacillus trueperi* SS1, isolated from Lunsu, a saltwater body in the Northwest Himalayas. *Microbiology Resource Announcements, 8*(10), 10.1128/mra. 01710-01718.

Hasson, S., Al-Balushi, M., Sallam, T., Idris, M., Habbal, O., & Al-Jabri, A. (2011). In vitro antibacterial activity of three medicinal plants-Boswellia (Luban) species. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 1*(2), S178-S182.

Horváth, G., Jámbor, N., Kocsis, E., Böszörményi, A., Lemberkovics, E., Héthelyi, E., Kovács, K., & Kocsis, B. (2011). Role of direct bioautographic method for detection of antistaphylococcal activity of essential oils. *Natural Product Communications, 6*(9), 1934578X1100600939.

Hossain, M. I., Tabash, M. I., Siow, M. L., Ong, T. S., & Anagreh, S. (2023). Entrepreneurial intentions of Gen Z university students and entrepreneurial constraints in Bangladesh. *Journal of innovation and entrepreneurship, 12*(1), 12.

Karim, A., Poirot, O., Khatoon, A., & Aurongzeb, M. (2019). Draft genome sequence of a novel *Bacillus glycinifermentans* strain having antifungal and antibacterial properties. *Journal of Global Antimicrobial Resistance, 19*, 308-310.

Khudeir, M. A., Al-sallami, D., & Alsultan, A. (2024). Draft genome sequence of multidrug resistant *Proteus mirabilis* strain MAD23. *Veterinary Integrative Sciences, 22*(1), 93-109.

Kirby, W., Yoshihara, G., Sundsted, K., & Warren, J. (1956). Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. *Antibiotics annual*, 892-897.

Köcher, S., Breitenbach, J., Müller, V., & Sandmann, G. (2009). Structure, function and biosynthesis of carotenoids in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *Archives of microbiology, 191*(2), 95-104.

Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution, 41*(12), msae263.

Maitong, S., Permpoonpattana, P., & Sowanpreecha, R. (2021). Potentiality of *Bacillus* sp. derived from mangrove soil for controlling *Fusarium* spp. *Khon Kaen Agriculture Journal, 48*, 337-344.

Mora, I., Cabrefiga, J., & Montesinos, E. (2011). Antimicrobial peptide genes in *Bacillus strains* from plant environments. *International Microbiology, 14*(4), 213-223.

Moshafi, M. H., Forootanfar, H., Ameri, A., Shakibaie, M., Dehghan-Noudeh, G., & Razavi, M. (2011). Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. strain FAS 1 isolated from soil. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 24*(3).

Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Rouhani, S. M. R., Ehsani, A., & Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary research forum, 4*(3), 179.

Nirada Ruayajin, T. C., Prapapun Singto. (2022). The outcomes of using anti-AMR guideline to prevent the spread of Drug-resistant Organisms Infections. *Singburi Hospital Journal, 1*(31), 27-40.

Oh, J.-S., & Roh, D.-H. (2021). Draft genome sequence of an algicidal bacterium *Halobacillus* sp. Nhm2S1. *Korean Journal Microbiol, 57(*3), 226-228.

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). Draft genome sequences of two *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a putative 41.9-kDa insecticidal toxin. *Toxins, 6*(5), 1490-1504.

Phumart, P., Phodha, T., Thamlikitkul, V., Riewpaiboon, A., Prakongsai, P., & Limwattananon, S. (2012). Health and Economic Impacts of Antimicrobial Resistant Infections in Thailand : A Preliminary Study. *Journal of Health Systems Research, 6*(3), 352-360.

Ramasubburayan, R., Sumathi, S., Bercy, D. M., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2015). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of mangrove associated bacterium *Bacillus subtilis* subsp. subtilis RG. *Biocatalysis and agricultural biotechnology, 4*(2), 158-165.

Sabdaningsih, A., Cristianawati, O., Sibero, M. T., Nuryadi, H., Radjasa, O. K., Sabdono, A., & Trianto, A. (2017). Screening antibacterial agent from crude extract of marine-derived fungi associated with soft corals against MDR-*Staphylococcus haemolyticus*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.

Saleem, A. A., Balakrishnan, G., Nandhagopal, M., & Manivannan, N. (2024). Secondary Metabolites of *Halobacillus* sp.: Antimicrobial and Antioxidant Activity, Biological Compatibility, and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis. *Cureus, 16*(8).

Sánchez-Díaz, R., Molina-Garza, Z. J., Cruz-Suárez, L. E., Selvin, J., Kiran, G. S., Gómez-Gil, B., Galaviz-Silva, L., & Ibarra-Gámez, J. C. (2022). Draft genome sequences of *Bacillus pumilus* 36R ATNSAL and B. safensis 13L LOBSAL, two potential candidate probiotic strains for shrimp aquaculture. *Journal of Global Antimicrobial Resistance, 31*, 304-308.

Shukla, V., Runthala, A., Rajput, V. S., Chandrasai, P. D., Tripathi, A., & Phulara, S. C. (2022). Computational and synthetic biology approaches for the biosynthesis of antiviral and anticancer Terpenoids from *Bacillus subtilis*. *Medicinal Chemistry, 18*(3), 307-322.

Sitthiyot, T. (2015). Macroeconomic and financial management in an uncertain world: What can we learn from complexity science? *Thailand and The World Economy 33*(3), 1-23.

Soto-Ramirez, N., Sanchez-Porro, C., Rosas-Padilla, S., Almodovar, K., Jimenez, G., Machado-Rodriguez, M., Zapata, M., Ventosa, A., & Montalvo-Rodriguez, R. (2008). *Halobacillus mangrovi* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from the black mangrove Avicennia germinans. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 58*(1), 125-130.

Sricharoen, W., Chotechuang, N., & Prakitchaiwattana, C. (2022). Pigments from halophilic bacteria isolated from salty fermented foods, bioactivity and safety for further development as bio/natural-food additives. *Food Agricultural Sciences and Technology, 8*(1), 1-14.

Srivastava, A., Macey, M. C., McGenity, T. J., & Olsson-Francis, K. (2024). Draft genome sequence of *Halobacillus campisalis* strain ASL-17. *Microbiology Resource Announcements, 13(*2), e00692-00623.

Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry, 48*(7), 1065-1079.

Wilantho, A., Praditsup, O., Charoenchim, W., Kulawonganunchai, S., Assawamakin, A., & Tongsima, S. (2012). Next generation sequencing (NGS) technologies and their applications in omics-research. *Genomics and Genetics, 5*(2), 104-129.

Woo, M., Park, S.-H., Park, K., Park, M.-K., Kim, J.-Y., Lee, H.-S., Sohn, J. H., Lee, D.-W., Nam, G., & Shin, K.-S. (2017). Draft genome sequence of the halophilic *Halobacillus mangrovi* KTB 131 isolated from Topan salt of the Jeon-nam in Korea. *Genomics data, 14*, 18-20.

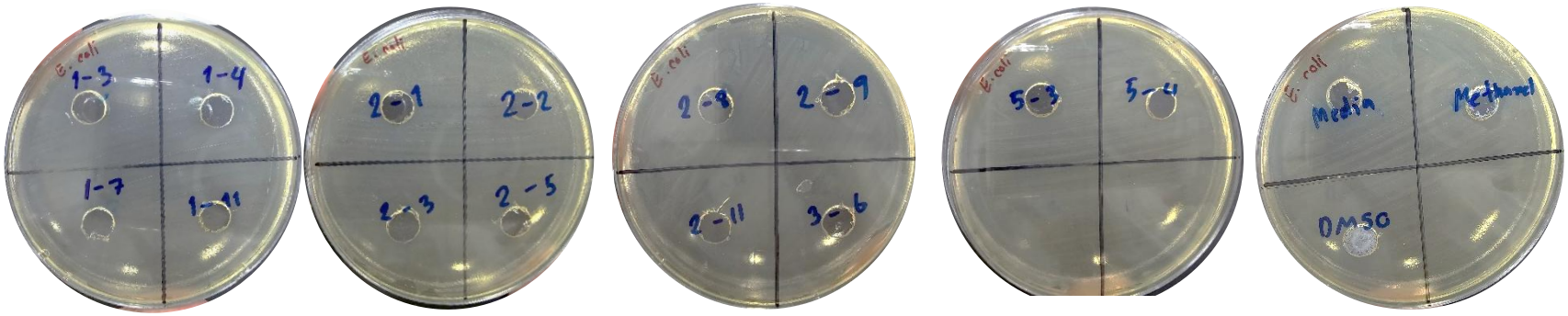
Yang, L., Tan, R.-x., Wang, Q., Huang, W.-y., & Yin, Y.-x. (2002). Antifungal cyclopeptides from *Halobacillus litoralis* YS3106 of marine origin. *Tetrahedron letters, 43*(37), 6545-6548.

Yaradoddi Jayachandra, S., & Mudgulkar Sulochana, B. (2020). Screening and characterization of bioactive compounds produced by the moderate halophile *Halobacillus* sp. JS6. Research *Journal of Biotechnology Vol, 15*, 12.

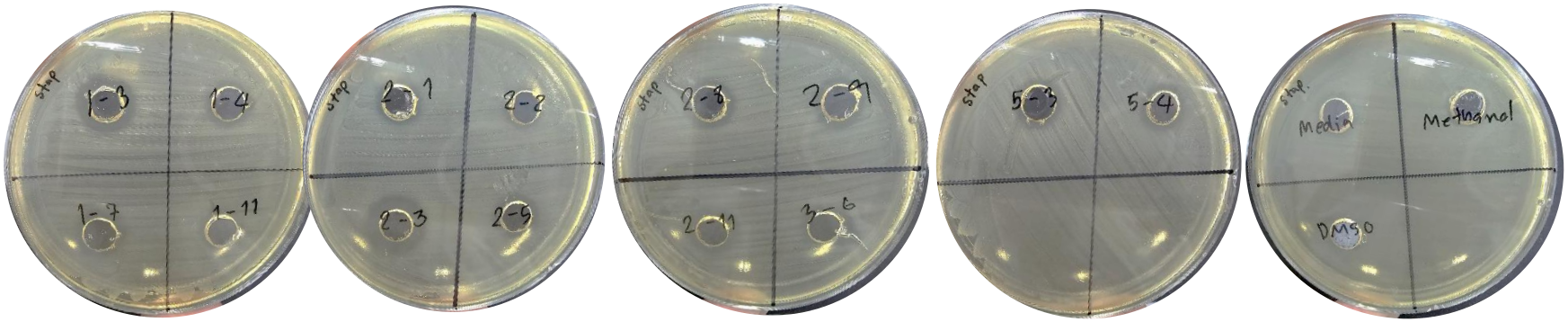
Zhu, L., Liu, N., Wang, H., Zhang, Z., Jiang, L., & Huang, H. (2019). Draft genome sequence of broad-spectrum antifungal-producing *Bacillus velezensis* C4341 isolated from a saline-alkali soil sample in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance, 16*, 291-293.

ภาคผนวก ก
ภาพการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเชื้อ *Bacillus* spp.ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

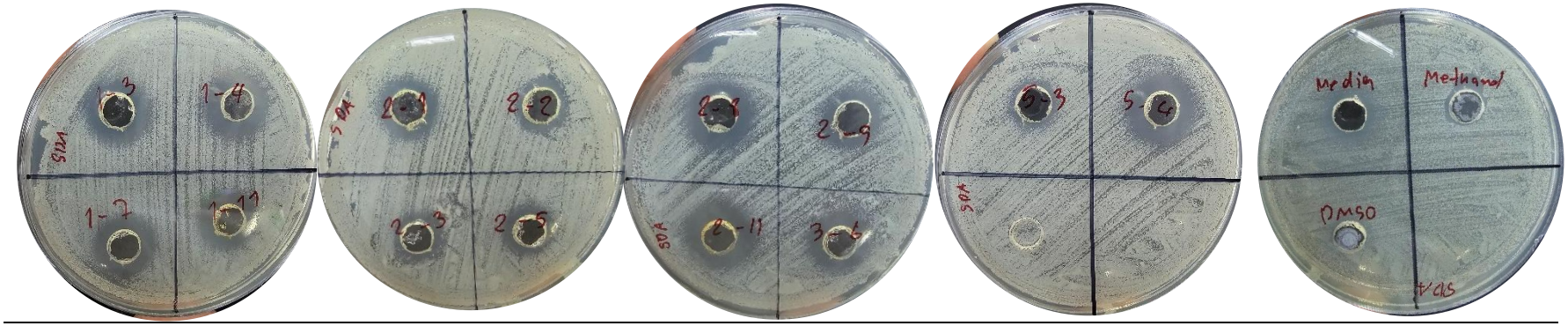
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อ *Bacillus* spp.ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion

E. coli


S. aureus



C. albicans



ภาคผนวก ข
วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (Difco) แบบแข็ง ประกอบด้วย

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15	กรัม

เติมน้ำทะเล 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

2.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (Difco) แบบเหลว ประกอบด้วย

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม

เติมน้ำทะเล 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

3.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (Difco) แบบแข็งประกอบด้วย

Beef Extract powder	2.0	กรัม
Acid Digest of Casein	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17.0	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

4.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (Himedia) แบบเหลว ประกอบด้วย

HM infusion B	2.0	กรัม
Acicase	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

5.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar (Himedia) แบบแข็ง ประกอบด้วย

Mycological peptone	10	กรัม
Dextrose (Glucose)	40	กรัม
Agar	15	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

6.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine Broth 2216 (HIMEDIA) แบบแข็งประกอบด้วย

Peptone	5.00	กรัม
Yeast extract	1.000	กรัม
Ferric citrate	0.100	กรัม
Sodium chloride	19.450	กรัม
Magnesium chloride	8.800	กรัม
Sodium sulphate	3.240	กรัม
Calcium chloride anhydrous	1.800	กรัม
Potassium chloride	0.550	กรัม
Sodium bicarbonate	0.160	กรัม
Potassium bromide	0.080	กรัม
Strontium chloride	0.034	กรัม
Boric acid	0.022	กรัม
Sodium silicate	0.004	กรัม
Sodium fluorate	0.0024	กรัม
Ammonium nitrate	0.0016	กรัม
Disodium hydrogen phosphate	0.008	กรัม
Agar (HIMEDIA)	17.0	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

7.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine Broth 2216 (Difco) แบบเหลว ประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัม
Yeast Extract	1.0	กรัม
Ferric Citrate	0.1	กรัม
Sodium Chloride	19.45	กรัม
Magnesium Chloride	5.9	กรัม
Magnesium Sulfate	3.24	กรัม
Calcium Chloride	1.8	กรัม

Potassium Chloride	0.55	กรัม
Sodium Bicarbonate	0.16	กรัม
Potassium Bromide	0.08	กรัม
Strontium Chloride	0.034	กรัม
Boric Acid	0.022	กรัม
Sodium Silicate	0.004	กรัม
Sodium Fluoride	0.0024	กรัม
Ammonium Nitrate	0.0016	กรัม
Disodium Phosphate	0.008	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

*กรณีที่ปรับสูตรความเค็มด้วยการเติม NaCl 1%, 3% และ 5% ให้คำนวนปริมาณ w/v เช่น NaCl 1 % w/v ชั่ง NaCl 10 g ในอาหาร 1,000 มิลลิลิตร

8.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine Broth 2216 (HIMEDIA) แบบแข็งประกอบด้วย

Peptone	5.000	กรัม
Yeast extract	1.000	กรัม
Ferric citrate	0.100	กรัม
Sodium chloride	19.450	กรัม
Magnesium chloride	8.800	กรัม
Sodium sulphate	3.240	กรัม
Calcium chloride anhydrous	1.800	กรัม
Potassium chloride	0.550	กรัม
Sodium bicarbonate	0.160	กรัม
Potassium bromide	0.080	กรัม
Strontium chloride	0.034	กรัม
Boric acid	0.022	กรัม
Sodium silicate	0.004	กรัม
Sodium fluorate	0.0024	กรัม
Ammonium nitrate	0.0016	กรัม
Disodium hydrogen phosphate	0.008	กรัม
Agar	17.0	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

9.Anisaldehyde 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Anisaldehyde	0.25	มิลลิลิตร
Acetic acid	5	มิลลิลิตร
Methanol	42.5	มิลลิลิตร
H_2SO_4	2.5	มิลลิลิตร