

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

จากการศึกษาวิจัยเรื่องการศึกษาจุลินทรีย์จากเปลือกผลไม้ทุเรียนและเปลือกมังคุดที่มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คณะผู้วิจัยได้ทำการวิจัยเป็นขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.1. การคัดเลือกหาจุลินทรีย์จากเปลือกทุเรียน และเปลือกมังคุด

จากการทดลองเมื่อทำการแช่เปลือกทุเรียนและเปลือกมังคุดในน้ำเปล่า ทำการเขย่าเป็นเวลานาน 20 นาที พบว่าเชื้อมีลักษณะที่แตกต่างกันไป ดังแสดงในภาพรูปที่ 4.1 และเมื่อทำการ spread เชื้อที่พบบนเปลือกทุเรียนและเปลือกมังคุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง สามารถเห็น colony เดี่ยว ที่สามารถทำการ restreak อีก 2 ครั้ง ก่อนการคัดเลือกมา 300 colonies ที่แตกต่างกันไปมา เพื่อการทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ



ภาพที่ 4.1 แสดงตัวอย่าง ภาพจาก Compound Microscopy ที่ 100x ของเชื้อแบคทีเรียที่พบได้จากผิวเปลือกทุเรียน (ภาพบน) และจากผิวเปลือกมังคุด (ภาพล่าง) เมื่อทำการเขย่าเปลือกในน้ำกลั่นสะอาดนาน 20 นาที

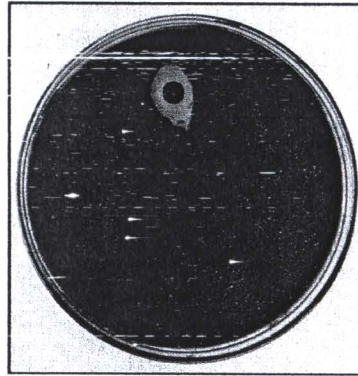
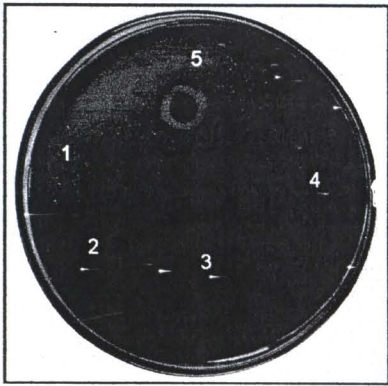
และเมื่อนำเชื้อทั้งหมดที่ได้ แต่ละ isolate มาตรวจดูลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope สามารถจำแนกได้อย่างหยวก่อนการนำไปทดสอบคุณสมบัติการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่แสดงในตารางที่ 4.1

ชนิดจุลินทรีย์	แกรม บวก (ติดสีน้ำเงิน)	แกรม ลบ (ติดสีแดง)	ลักษณะของเชื้อที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์			
			rod	bacilli	cocci	spiral
เชื้อแบคทีเรีย จากเปลือกทุเรียน	(30)	(137)	-เดี่ยว (32) -กระจุก (16) -ต่อเป็นสาย (1)	-เดี่ยว (25) -กระจุก (37) -ต่อเป็นสาย (80)	-เดี่ยว (69) -กระจุก (33) -ต่อเป็นสาย (3)	กระจายตัว (2)
เชื้อแบคทีเรีย จากเปลือกมังคุด	(24)	(120)	-เดี่ยว (60) -กระจุก (13)	-เดี่ยว (39) -กระจุก (45) -ต่อเป็นสาย (19)	-เดี่ยว (4) -กระจุก (47) -ต่อเป็นสาย (3)	กระจายตัว (5)

ตารางที่ 4.1 แสดงคุณลักษณะทางกายภาพของเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากเปลือกทุเรียน และจากเปลือกมังคุด ที่ย้อมด้วย gram staining dye และที่ตรวจสอบคุณลักษณะการเรียงตัว ขนาด รูปร่างจากกล้องจุลทรรศน์

4.2. ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะต่างๆของเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์สร้างสารชีวภาพนั้นได้ใช้หลักการ disc diffusion ซึ่งจะเกิด clear zone ของเชื้อที่ก่อโรคที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่มาจาก เปลือกทุเรียน หรือเปลือกมังคุด โดยเปรียบเทียบกับ control ของการเกิด disc diffusion ของสารปฏิชีวนะ ของ Ampicillin (ดังตัวอย่าง ภาพ 4.2 ขวา) Chloramphenical, Erythromycin และ Penicillin โดยที่เชื้อที่สร้างสารได้แตกต่างที่อายุการเก็บในภาพที่ 4.2 ซ้าย



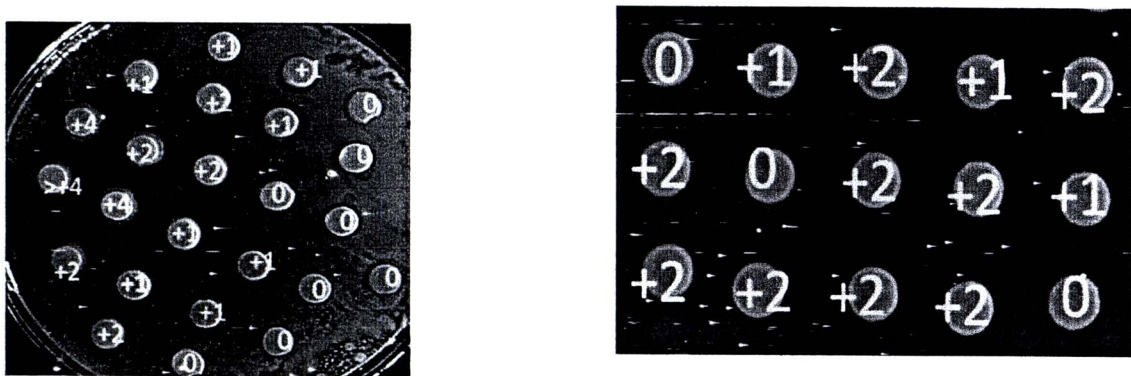
ภาพที่ 4.2 แสดงตัวอย่างการเกิด clear zone ของการยับยั้งที่เชื้อที่ได้จากเชื้อที่ได้จากเปลือกทุเรียน ภาพซ้าย แสดงเชื้อที่เลี้ยงไว้นาน 8 (1), 10 (2), 14 (3), 18 (4), 24 (5) ชั่วโมง ภาพขวาแสดงตัวอย่างของการทดสอบเชื้อว่าเชื้อนี้ (DU4) มีความ sensitive ต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้นจากน้อยไปมากตามลำดับ คือ 10, 20, 50, 100, 200 mg/ml เมื่อทำการทดสอบไว้นาน 24 ชั่วโมง

จากการทดสอบพบว่าเชื้อมีศักยภาพที่แตกต่างกันไปในลักษณะของพื้นที่ของ clear zone หากมีวงกว้าง แสดงถึงมีศักยภาพในการยับยั้งสูง หรือมีการสร้างสารที่มีประสิทธิภาพสูง สูงกว่าเชื้อที่สร้างวง clear zone ขนาดเล็ก ดังตัวอย่าง clear zone ที่แสดงในภาพที่ 4.3 ที่ตำแหน่ง 1, 2, 3, 4, 5 โดยเชื้อในตำแหน่งที่ 3 และ 4 มีวงค่อนข้างกว้างกว่าตัวอื่น



ภาพที่ 4.3 แสดงตัวอย่างการเกิด clear zone of inhibition จากเชื้อทุเรียนที่สร้างวงใส clear zone เมื่อวางแผ่น filter paper disc ที่แช่เชื้อที่เจริญมานาน 24 ชั่วโมง

ในการตั้งมาตรฐานการ score ระดับความสามารถในการสร้างสารเพื่อช่วยในการคัดแยกเชื้อเอชเอดที่สร้างสารได้ปริมาณสูง เทียบกับการเกิด clear zone มาตรฐาน ได้ใช้โปรแกรม image J พร้อมกับ การใช้ CCD camera ช่วยเก็บภาพ โดยตัวอย่างเชื้อที่สามารถเก็บภาพได้ แบ่งออกได้ เป็น +1 +2 +3 +4 ตามขนาดของ clear zone (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 แสดงตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์จากเปลือกทุเรียนที่ให้ผลบวก โดยก่อให้เกิด clear zone ที่สามารถจัดให้เป็น + 4 +3 +2 +1 และ 0 ตามการคิดในตารางที่ 4.2 และ ตารางที่ 4.3



ตัวที่	Total Growth		Colony Extent		Clear Zone		positive
	Area	Area SD	Area	Area SD	Area	Area SD	
1	0.14255372	0.00693			0.42603408	0.09393377	4
2	0.02332309	0.00125495			0.17232492	0.03997318	2
3	0.04687445	0.00158214			0.24429983	0.04488249	2
4	0.02963176	0.0038427			0.19423782	0.06994765	2
5	0.02571778	0.00106905			0.18095551	0.0368939	2
6	0.0151886	0.00051897			0.13906374	0.02570557	1
7	0.04007252	0.00154259			0.22588031	0.04431802	2
8	0.11366103	0.00104864			0.38041782	0.03653997	4
9	0.05465107	0.00334231			0.26378761	0.06523463	3
10	0.06427006	0.00362282			0.2860615	0.06791703	3
11	0.07577882	0.00490434			0.31061969	0.07902149	3
12	0.12503166	0.01406747			0.39899281	0.13383296	4
13	0.14241031	0.01334418			0.42581973	0.13034701	4
14	0.13674086	0.00442677			0.41725756	0.07507556	4
15	0.16681287	0.00483833			0.46086087	0.07848794	5
16	0.08510883	0.00098283			0.32918677	0.03537476	3
17	0.14449973	0.00259553			0.42893212	0.05748675	4
18	0.1739014	0.01325965			0.47055089	0.1299335	5
19	0.00184345	0.00184345			0.04844746	0.04844746	0
20	0.33375605	0.00391252	0.03728425	0.0006768	0.59174537	0.01859065	6
21	0.2778204	0.00705503	0.03394975	0.00074566	0.47013545	0.02269373	5
22	0.55038511	0.06224425	0.03028937	0.00092489	1.28977368	0.24949627	>4
23	0.30903297	0.0169908	0.05657218	0.00185593	0.40464425	0.0837026	4
24	0.16990967	0.00130736	0.03255229	0.00175843	0.21488507	0.01248076	2

ตัวที่	Total Growth		Colony Extent		Clear Zone		positive
	Area	Area SD	Area	Area SD	Area	Area SD	
25	0.029763205	0.00129096			0.194668153	0.040542587	2
26	0.025241579	0.000671289			0.179272354	0.029235462	2
27	0.035076032	0.00061987			0.211329578	0.028093476	2
28	0.01993269	0.000729665			0.159308156	0.030480134	2
29	0.026010016	0.001729562			0.181980717	0.046927036	2
30	0.05367051	0.007908723			0.261410436	0.100347887	3
31	0.028669145	0.000955351			0.19105677	0.034876797	2
32	0.019186583	0.000346542			0.156298166	0.021005504	2
33	0.040138937	0.001361121			0.226067429	0.041629714	2
34	0.023193992	2676711.541			0.171847339	1846.102647	2
35	0.063446434	0.0035884			0.28422264	0.067593586	3
36	0.013734852	0.00165878			0.132241284	0.045956764	1
37	0.047949068	0.002089523			0.247084297	0.051579676	2
38	0.015954247	0.000325222			0.142525708	0.020349079	1
39	0.02779225	0.000768396			0.188112179	0.031278612	2
40	0.067196014	0.004399437			0.292500637	0.074843414	3
41	0.032421649	0.00087518			0.203176095	0.033381334	2
42	0.026086581	0.001032353			0.182248365	0.036255109	2
43	0.018039298	24.39739367			0.151553119	5.573484226	2
44	0.018554144	0.000639352			0.153700586	0.028531542	2
45	0.046356365	0.002950586			0.242945997	0.061292758	2

ตารางที่ 4.2 แสดงตัวอย่างผลการวัดขนาด clear zone เพื่อกำหนดค่า positive ในการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 45 ตัว ที่ได้จากตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่พบบนเปลือกมังคุดจำนวน 300 ตัว โดยที่มีค่าตั้งแต่ 0-4 ในรูปตาราง ก และ ข โดยการใช้โปรแกรม image J

ตัวที่	Total Growth		Colony Extent		Clear Zone		positive
	Area		Area		Area		
1	0.017024071	0.000428191			0.147226767	0.023349287	1
2	0.018643256	0.000985028			0.154069241	0.035414355	2
3	0.019798381	0.001115654			0.158770533	0.037689445	2
4	0.020101359	0.000185493			0.159980767	0.015368059	2
5	0.016745339	0.00019187			0.146016534	0.015629989	1
6	0.009457205	0.000193599			0.109732803	0.015700254	1
7	0.046021599	0.001733831			0.242067181	0.046984917	2
8	0.047583301	0.001173157			0.246140082	0.038648535	2
9	0.034374208	0.000624595			0.209204687	0.028200343	2
10	0.033304275	0.000420323			0.205923092	0.023133793	2
11	0.028007781	0.000395446			0.188840181	0.022438762	2
12	0.043697718	0.000709624	0.0053008	0.000463091	0.074238155	0.005747848	1
13	0.050896491	0.002586097			0.25456517	0.05738223	3
14	0.121316639	0.000909966	0.004207554	0.000441411	0.321352302	0.006330367	3
15	0.067121502	0.001161847			0.292338419	0.038461793	3
16	0.730817915	0.000694495	0.005031015	0.000132134	0.245830567	0.003228676	2
17	0.089554892	0.00182103	0.00417284	0.000206823	0.220260714	0.00714341	2

ตัวที่	Total Growth		Colony Extent		Clear Zone		positive
	Area		Area		Area		
19	0.001739	0.000232			0.047057	0.017172	0
20	0.017485	0.000615			0.149205	0.027993	1
21	0.005078	0.000268			0.050408	0.018457	1
22	0.007358	0.000231			0.096793	0.017164	1
23	0.007009	0.0002			0.094465	0.015958	1
24	0.008695	0.000266			0.105218	0.013412	1
25	0.036274	0.001445			0.214907	0.042889	2
26	0.004947	0.000149			0.079361	0.013796	1
27	0.012423	0.000387			0.125765	0.022186	1
28	0.003224	0.000327			0.06407	0.020389	1
29	0.003553	21.94659			0.067258	5.286139	1
30	0.014178	0.000581			0.134356	0.02721	1
31	0.016895	0.000174			0.146668	0.014905	1
32	0.022894	0.000929			0.170733	0.034383	2
33	0.030404	0.000174			0.196753	0.014894	2
34	0.014763	9.32E-05			0.137103	0.010893	1
35	0.012883	4.14E-05			0.128072	0.007257	1
36	0.005434	0.000147			0.083177	0.013666	1
37	0.011419	0.000263			0.120578	0.018284	1
38	0.023955	0.000124			0.174543	0.01256	2
39	0.038864	0.000158			0.222447	0.014205	2
40	0.027636	0.000282			0.187583	0.018944	2
41	0.026382	0.00049			0.183278	0.024976	2
42	0.017153	0.000152			0.147785	0.013899	1
43	0.019503	0.000852			0.157584	0.03294	2
44	0.021505	0.004053			0.165473	0.071838	2
45	0.014227	0.000337			0.134589	0.020715	1
46	0.009365	6.16E-05			0.109198	0.008858	1
47	0.007092	0.000735			0.095024	0.030585	1
48	0.009389	0.000171			0.109337	0.014768	1
49	0.013773	0.000151			0.132425	0.01385	1
50	0.013909	0.00086			0.133075	0.033093	1
51	0.023878	0.001148			0.174364	0.038229	2

52	0.015829	0.001275			0.146383	0.040307	1
53	0.044547	0.000802			0.238157	0.031965	2
54	0.027966	0.001659			0.188701	0.045955	2
55	0.019573	0.001243			0.157863	0.039787	2
56	0.020958	0.011459			0.163355	0.120787	2
57	0.020066	0.000592			0.159841	0.027447	2

ตารางที่ 4.3 แสดงตัวอย่างผลการวัดขนาด clear zone เพื่อกำหนดค่า positive ในการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 57 ตัว ที่ได้จากตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่พบบนเปลือกทุเรียนจำนวน 300 ตัว โดยที่มีค่าตั้งแต่ 0-4 ในรูปตาราง ก และ ข โดยการใช้โปรแกรม image J

เมื่อทดสอบกับตัวอย่างเชื้อ isolate ที่บริสุทธิ์ที่ได้มาทำการทดสอบ disc diffusion test ทั้งหมด ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4 ก ข ค และ ง โดยพบว่าเชื้อจำนวน 300 colonies ที่มาจากเปลือกทุเรียนและจากเปลือกมังคุด พบว่าประมาณ 20-30% ที่สามารถสร้างสารต้านเชื้อก่อโรคได้ โดยเมื่อเทียบกับความสามารถยับยั้งของยา ampicilin และ erythromycin

จำนวน (isolates)	ระดับ Inhibition Zone (mm) ต่อเชื้อ <i>E. coli</i>				
	+1 (<10 mg/ml)	+2 (10 mg/ml)	+3 (50 mg/ml)	+4 (100 mg/ml)	+5 (200 mg/ml)
เชื้อแบคทีเรีย จากเปลือก ทุเรียน	30	64	15	8	1
เชื้อแบคทีเรีย จากเปลือก มังคุด	68	29	18	3	0

(ก)



จำนวน (isolates)	ระดับ Inhibition Zone (mm) ต่อเชื้อ <i>S. aureus</i>				
	+1 (<10 mg/ml)	+2 (10 mg/ml)	+3 (50 mg/ ml)	+4 (100 mg/ml)	+5 (200 mg/ml)
เชื้อแบคทีเรีย จากเปลือก ทุเรียน	59	15	8	3	0
เชื้อแบคทีเรีย จากเปลือก มังคุด	72	44	28	10	7

(ข)

จำนวน (isolates)	ระดับ Inhibition Zone (mm) ต่อเชื้อ <i>B. subtilis</i>				
	+1 (<10 mg/ml)	+2 (10 mg/ml)	+3 (50 mg/ ml)	+4 (100 mg/ml)	+5 (200 mg/ml)
เชื้อแบคทีเรีย จากเปลือก ทุเรียน	60	32	14	0	0
เชื้อแบคทีเรีย จากเปลือก มังคุด	48	37	15	3	0

(ค)

จำนวน (isolates)	ระดับ Inhibition Zone (mm) ต่อเชื้อ ยีสต์ (<i>Saccharomyces cerevesiae</i>)				
	+1 (<10 mg/ml)	+2 (10 mg/ml)	+3 (50 mg/ ml)	+4 (100 mg/ml)	+5 (200 mg/ml)
เชื้อแบคทีเรีย จากเปลือก ทุเรียน	5	2	1	0	0
เชื้อแบคทีเรีย จากเปลือก มังคุด	4	0	0	0	0

(ง)

ตารางที่ 4.4 แสดงคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ต่างๆของเชื้อ isolates ที่ได้จากเปลือกทุเรียนและเปลือกมังคุดใน
รูปแบบของ clear zone of inhibition ที่จัดเป็น +1 + 2 +3 +4 + 5

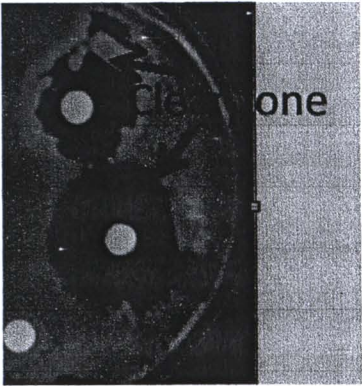
4.3. การคัดเลือก จำแนก ศึกษาคุณลักษณะทางสรีรวิทยา กายภาพ ชีววิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่มี
ศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์สูง

จากการทดสอบคณะผู้วิจัยจึงสามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแบคทีเรียจากเปลือกทุเรียน ได้
จำนวน 4 isolates คือ DU4 DU16 DU34 และ DU160 และ จากเปลือกมังคุด จำนวน 3 isolates คือ MS3
MS33 และ MS54 โดยที่เชื้อ DU4 DU16 และ DU34 ให้ผล +4 ต่อเชื้อ *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ
DU160 ให้ผล +4 ต่อเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ส่วน MS3 และ MS33 ให้ผล +4 ต่อ *E. coli* และ *B. subtilis*
และ MS54 ให้ผล +4 ต่อ *E. coli*, *B. subtilis*, และ *S. aureus* ซึ่งได้ทำการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพจาก
กล้องจุลทรรศน์และการติดสีย้อมได้ดังในตารางที่ 4.5

ชนิดจุลินทรีย์	ติดสีแกรม	ลักษณะของเชื้อที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ และจาก plate
A. แบคทีเรียจากเปลือกทุเรียน		
DU4	แดง	- bacilli เดี่ยว ขนาดเล็ก
DU16	แดง	- rod เดี่ยว ขนาดเล็ก
DU34	แดง	- bacilli กระจายตัว
DU160	แดง	- bacilli เดี่ยว ขนาดใหญ่
B. เชื้อแบคทีเรียจากเปลือกมังคุด		
MS3	แดง	-bacilli กระจุก ขนาดใหญ่
MS33	น้ำเงิน	-bacilli เดี่ยว ขนาดเล็ก
MS54	แดง	-rod เดี่ยว ขนาดเล็ก

ตารางที่ 4.5 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อจุลินทรีย์ isolate ต่างๆ ข้อมด้วยสีแกรม และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ได้

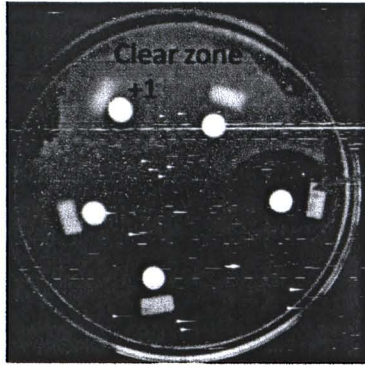
และมีตัวอย่างการเกิด clear zone ของเชื้อisolate ที่ได้จากเปลือกทุเรียนและเปลือกมังคุดที่ได้ถูกเลือกมาเพื่อศึกษาต่อ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 4.6 และ 4.7



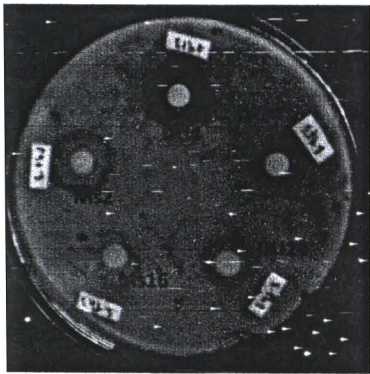
ภาพที่ 4.5 แสดงตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ clone DU22 จากเปลือกทุเรียน ที่ทำการเลี้ยงให้บริสุทธิ์

แล้วทำการทดสอบการเกิด clear zone ของการออกฤทธิ์การสร้างสารในปริมาณที่มากในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis*





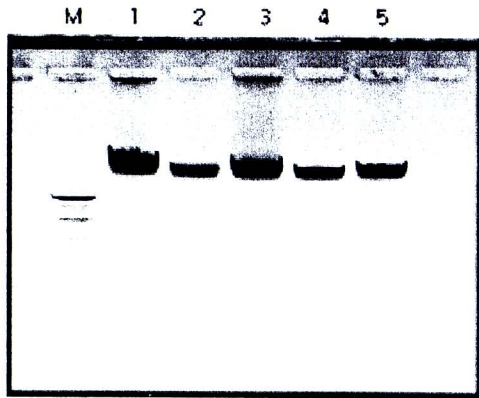
ภาพที่ 4.6 แสดงตัวอย่างการเกิด clear zone ของเชื้อจุลินทรีย์
บริสุทธิ์ clone MS 3 จากเปลือกมังคุด ที่ทำการทดสอบ ของ
การออกฤทธิ์การสร้างสารในปริมาณที่มากในการยับยั้งการ
เจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus*



ภาพที่ 4.7 แสดงตัวอย่างความคงทนของสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการ
เจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ clone DU4 ที่ได้ทำการบ่มไว้ 4 วัน ลักษณะ clear
zone ที่เห็นพบว่าความสามารถในการยับยั้ง yeast (*S. cerevesia*) ลดลง มีการ
จางหายไปของ clear zone

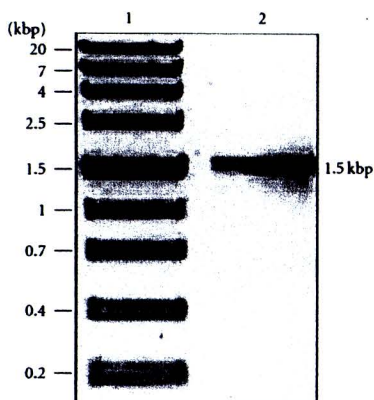
4.4. ศึกษาความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกไว้

ผู้วิจัยได้นำเชื้อจุลินทรีย์ isolate ที่คัดเลือกได้มาทำการเลี้ยงในอาหารเหลวนาน 24 ชั่วโมง แล้วทำการสกัด genomic DNA เพื่อทำการ ศึกษา 16S rDNA gene ใช้บ่งบอกถึง species ของเชื้อที่ศึกษา ตัวอย่างของ genomic DNA ที่ดี มีลักษณะไม่ขาด ไม่มีการปนเปื้อนของ RNA ด้วยการสกัดจากชุด Promega genomic extraction kit มีคุณภาพดี ขนาดใหญ่กว่า 23 Kb เมื่อเทียบกับ DNA marker (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 แสดง genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ 5 ตัวอย่าง เรียงจากซ้ายไปขวาจาก 1-4 คือ DU2 DU4 DU16 DU34 DU160 ที่สกัดได้จากชุด Genomic DNA Purification Kit จาก Promega

และเมื่อทำการ genomic DNA ของเชื้อทั้งหมด 7 isolates ไปทำการขยายจำนวนของ 16S rDNA ด้วย condition ที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 3 ขั้นตอนการทำ และจากการทำ PCR เพื่อขยายจำนวนของ 16S rDNA gene พบว่ามีขนาด 1.5-1.6 kb ตรงตามที่ต้องการ และได้ band เดียวที่ pure (ภาพที่ 4.9) จึงนำไปส่ง DNA sequencing เพื่อการวิเคราะห์ลำดับเบส เทียบกับ rDNA database ของ NCBI



ภาพที่ 4.9 แสดงตัวอย่างของ 16S rDNA ที่ได้จากการทำ PCR เพื่อใช้ในการตรวจหา species ของแบคทีเรียเหล่านี้

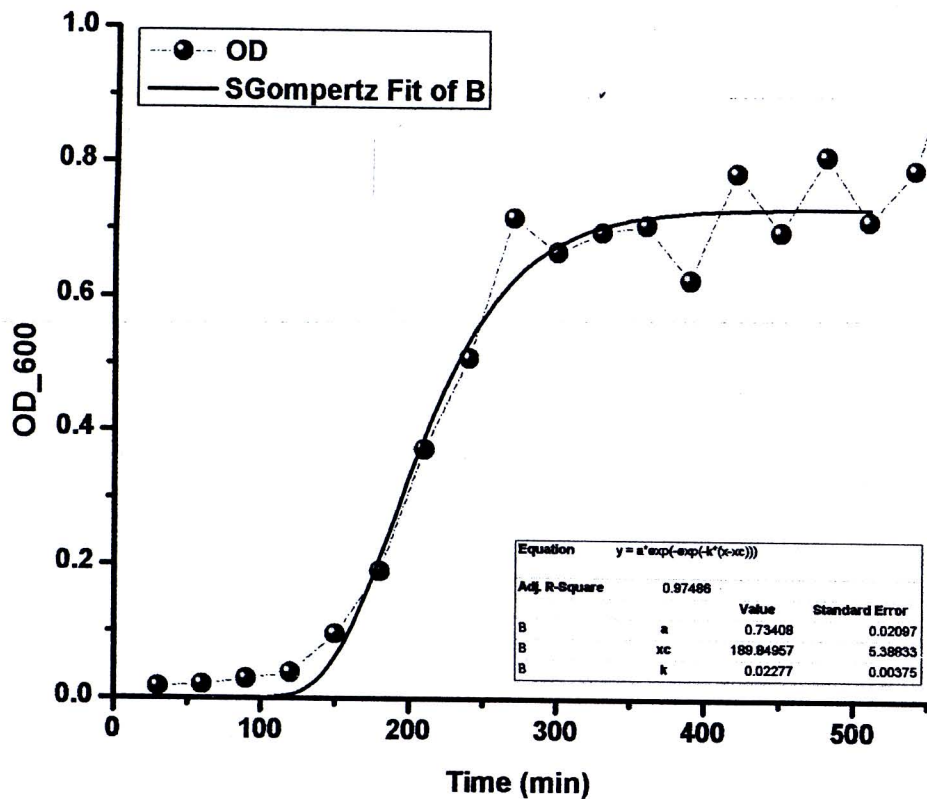
จากการส่งลำดับเบสเพื่อการตรวจสอบพบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มดังนี้

ชนิดเชื้อ isolate	ชนิดชื่อเชื้อ	Accession number
MS3	<i>Enterobacter amnigenus</i>	JCM1237
MS33	<i>Pseudomonas mosselii</i>	strain CIP 105259
MS54	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4962
DU4	<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334
DU16	<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC 9857
DU34	<i>Lactobacillus cremoris</i>	ATCC 19257
DU160	<i>Lactobacillus</i> sp.	ATCC 53103

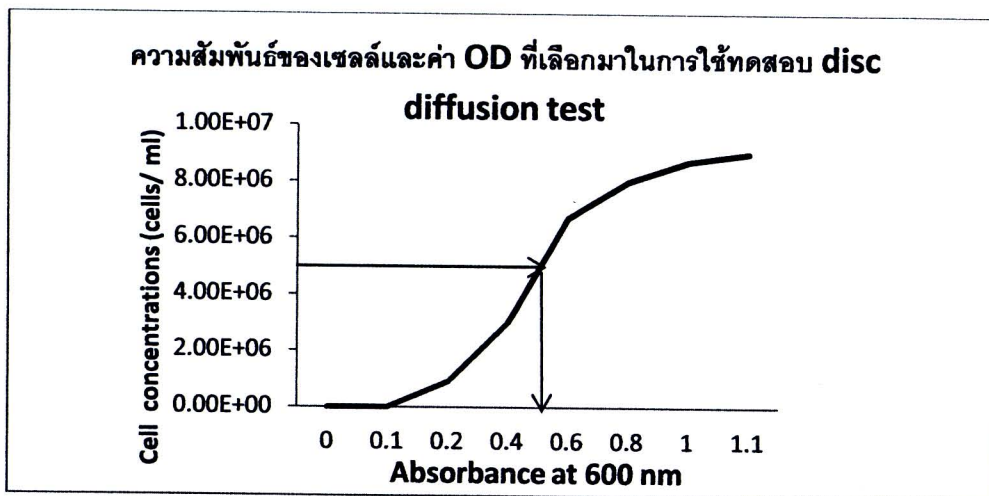
ตารางที่ 4.6 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบตรวจดู 16S rDNA gene sequence แล้วตรวจสอบสายพันธุ์กับ rDNA database จาก NCBI

4.5. การศึกษาพัฒนาขั้นตอนกระบวนการผลิตออกฤทธิ์สารชีวภาพ

จากการเลือกเชื้อ isolate มาเพื่อการพัฒนาให้ได้การผลิตสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพ เริ่มที่การเตรียมเชื้อเพื่อศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ว่าเป็นไปตามระยะการเจริญในช่วงใด โดยตั้งแต่ lag, log stationary และ decline phase ของการเจริญเติบโตทั้ง 7 isolates (ดังตัวอย่างในภาพที่ 4.10 และ 4.11) พบว่า

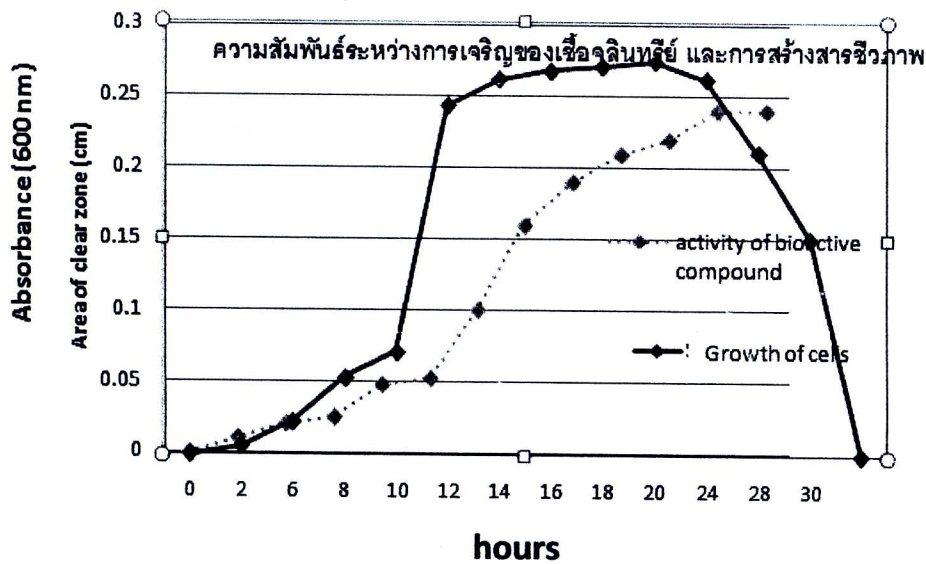


ภาพที่ 4.10 แสดงตัวอย่างของเชื้อ DU4 ที่มีการเลี้ยงเพื่อพัฒนาการเจริญเติบโต กระบวนการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ



ภาพที่ 4.11 แสดงตัวอย่างการศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย DU4 และค่า absorbance

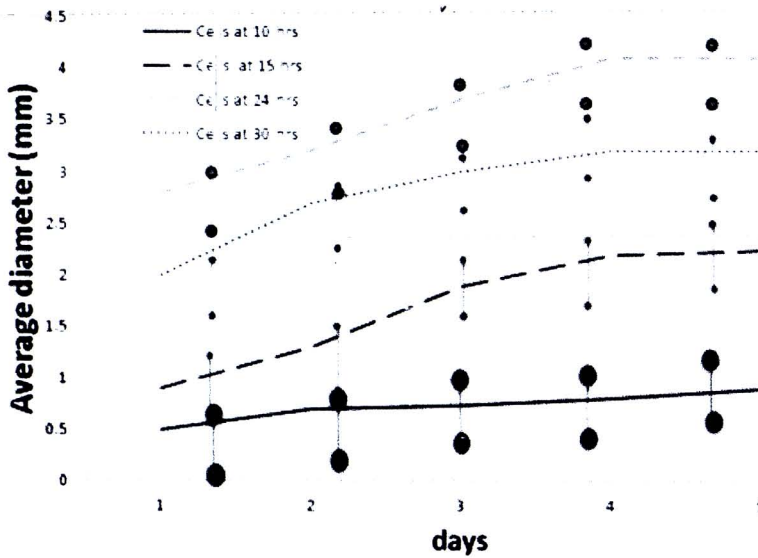
จากภาพที่ 4.11 จะเห็นได้ว่าเชื้อที่ความเข้มข้น 8×10^6 เซลล์ จะเป็นช่วงที่เราควรเลี้ยงให้ถึงระยะนี้ซึ่งเป็นปลายสุดของระยะ log phase และติดตามการเกิด clear zone ด้วยการวัดขนาดพื้นที่ที่ขยายขึ้นด้วยกล้อง CCD แล้วคำนวณด้วยโปรแกรม image J ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.12



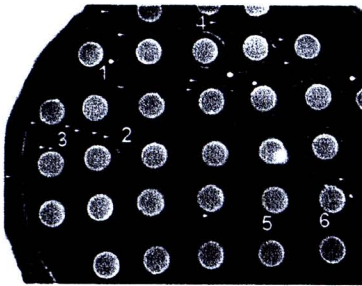
ภาพที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย DU4 กับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ซึ่งจากการทดลองที่ได้ พบว่าเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ได้ดีเมื่อมีการเลี้ยงเชื้อไว้นานอย่างน้อย 24-28 ชั่วโมง เพื่อให้มีการผลิตสารในปริมาณที่สูง สำหรับความ stability ของสารที่สร้างได้พบว่าเชื้อส่วนใหญ่สามารถสร้าง clear inhibition zone อยู่ได้ดีหากมีการ incubation นานในช่วง 3-5 วันที่เราสามารถดูผลได้ และเห็นผลได้ชัดเจน ตัวอย่างเช่นภาพที่ 4.13 ยังพบว่าหากมีการเลี้ยงไว้นานเกิน 5 วัน เชื้อก่อโรคที่ spread เป็นพื้นจะเริ่มสามารถเจริญขึ้นได้เป็นจุดๆ ดังเห็นตัวอย่างได้จากภาพที่ 4.5 ที่มีจุดเล็กๆเริ่มขึ้น และในบางครั้งจะเริ่มเห็นการเจริญของเชื้อที่เราใส่บนแผ่น disc ด้วย (ตัวอย่างเช่น ภาพที่ 4.14)

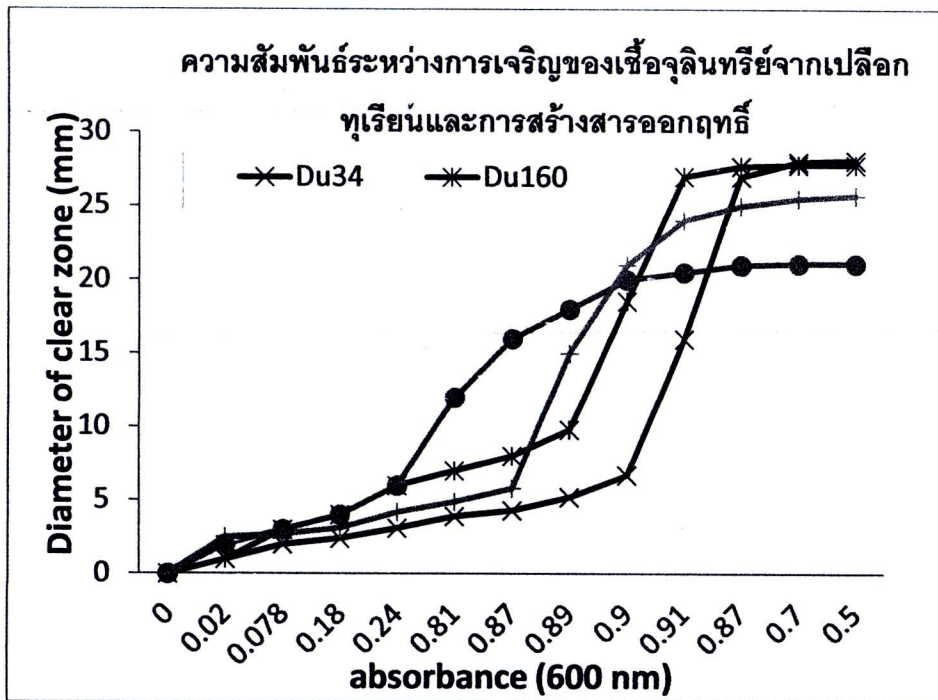
ค่าความสัมพันธ์การเกิด clear zone จากการทำ disc diffusion test กับเวลา



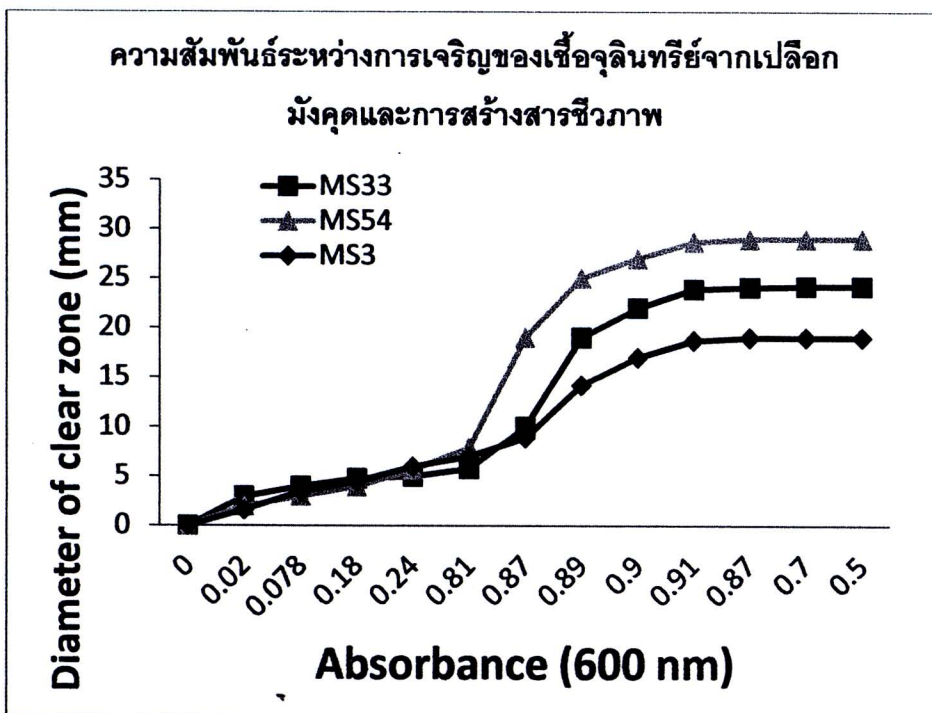
ภาพที่ 4.13 แสดงตัวอย่างความสามารถในการสร้าง clear zone จากวิธี disc diffusion ของเชื้อ DU4 สามารถสร้างสารได้คงที่ในช่วงเวลาที่เหมาะสมคือ 3-5 วัน



ภาพที่ 4.14 แสดงตัวอย่างของการทำ disc diffusion test ที่มีการบ่มไว้นาน 6 วัน ซึ่งพบว่าการเจริญของเชื้อบนแผ่น disc ทำให้การแปลผลไม่ชัดเจน ทำให้พื้นที่ที่วัดได้จะคลาดเคลื่อนไป ดังเห็นได้จากเชื้อในตำแหน่งที่ 1-4 ขณะที่เชื้อปรกติจะเป็นคั่งลักษณะของเชื้อตัวอย่างที่ 5 และ 6



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.15 แสดงการศึกษาการพัฒนาความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพของเชื้อทั้งหมด 7 isolates ที่ได้จากเปลือกทุเรียน (ก) และจากเปลือกมังคุด (ข) โดยการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำ disc diffusion test และจำนวนเซลล์ที่วัดได้การเลี้ยงในอาหารเหลว

จากการทำขั้นตอนสุดท้ายของการปรับให้เหมาะสมที่พบได้ว่า เชื้อ 7 isolates ที่ได้จากเปลือกทุเรียนและเปลือกมังคุด (ภาพที่ 4.15) ควรทำการเลี้ยงในช่วง late log จนเข้าใกล้ระยะ stationary phase ที่ O.D. 0.9-1.0