การจำแนกสายพันธุ์และศึกษาสมบัติบางประการของสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. B-1 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา

Bacillus sp. Strain B-1 Isolated from a Fish Culture Pond Produces Antimicrobial Substances

สุปราณี พึ่งแพง[1,2] , ชลอ ลิ้มสุวรรณ[3], วัชริยา ภูริวิโรจน์กุล[4]

Supranee pungpang[1,2], Chalor Limsuwan[3], Watchariya Purivirojkul[4]

Abstract

Bacillus sp. B-1, a bacteriocin-producing strain, was isolated from fish ponds in Kamphaeng Saen Fisheries Research Station, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Kampangsan District, Nakorn Pathom Province. The microbial inhibitory activity was determined by agar well diffusion technique and the inhibitory activity of *Bacillus* sp. B-1 was shown to be effective against *Streptococcus agalactiae* ABRCS-1. Identification of the strain was performed by molecular genetic (16S rDNA) basis. This strain was identified as *B. subtilis* strain B-1. Bacteriocin purification was carried out by amberlite adsorption, and reverse-phase high performance liquid chromatography. Molecular mass was determined by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF). The purification of bacteriocin by amberlite adsorption and reverse-phase chromatography resulted in only one single active peak at 30.221 min, which was designated B1-1 to inhibit *S. agalactiae* ABRCS-1. Molecular weight of this fraction by mass spectrometry was 3,398.05 Da.

Keywords : bacteriocin, *Bacillus subtilis*, MALDI-TOF, *Streptococcus agalactiae*, HPLC

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการ อุดมศึกษากรุงเทพฯ 10900

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, 10900

[3]ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900

Aquaculture Business Research Center, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok, 10900

[4]ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900

Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkhen Campus Bangkok, 10900

รับเรื่อง: ธันวาคม 2553

*Corresponding author: puy_0109@hotmail.co.th

บทคัดย่อ

Bacillus sp. สายพันธุ์ B-1 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาในสถานีวิจัยประมงกำแพงแสน คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ด้วยเทคนิค agar well diffusion ในการหาค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ABRCS-1 เป็นเชื้อทดสอบ จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B-1 โดยใช้เทคนิค 16S rDNA ในการหาลำดับเบส พบว่าเป็นแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 จากนั้นทำการแยกสารต้านจุลินทรีย์ออกจากน้ำเลี้ยงแบคทีเรียโดยใช้ amberlite เป็นตัวดูดซับและใช้เครื่อง HPLC เป็นตัวแยกสารต้านจุลินทรีย์ พบว่ามีเพียง fraction เดียว (B1-1) คือที่เวลา 30.221 นาที ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ABRCS-1 ซึ่ง fraction ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุล 3,398.05 ดาลตัน ได้ วิเคราะห์โดยใช้เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี ด้วยเครื่อง MALDI-TOF

คำนำ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นอุตสาหกรรมหลักที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทย และเกษตรกร โดยเฉพาะการเลี้ยงปลาที่ส่วนใหญ่นิยมเลี้ยงในแบบหนาแน่นเชิงพาณิชย์ โดยเน้นการให้อาหารเพื่อเพิ่มผลผลิต แต่ขาดการดูแลและจัดการในส่วนของสุขภาพสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อมที่ดี จึงส่งผลให้เกิดปัญหาเรื่องโรคตามมาทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ สารปฏิชีวนะ (antibiotic) จึงถูกนำเข้ามาเพื่อใช้ในการป้องกันโรค และฆ่าเชื้อก่อโรค แต่พบว่าสารเหล่านี้มีผลทำให้เชื้อก่อโรคต่าง ๆ เกิดการดื้อต่อยา อีกทั้งยังอาจตกค้างในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค รวมทั้งอาจเกิดการกีดกั้นทางการค้าจากต่างประเทศต่อไปในอนาคต ในปัจจุบันเกษตรกรจึงพยายามหาสิ่งทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เพื่อป้องกันปัญหาจากยาตกค้าง เช่น แนวทางการใช้สมุนไพร รวมทั้งการนำเชื้อแบคทีเรียเข้ามาใช้ในการเพาะเลี้ยงในรูปแบบของโปรไบโอติก ซึ่งคุณสมบัติที่น่าสนใจของโปรไบโอติก คือ สามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์ ขึ้นมาเพื่อควบคุมหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ นอกจากนี้มีงานวิจัยหลายสาขาระบุว่าโปรไบโอติกสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ (Gatesoupe, 1999) และปลอดภัยต่อสัตว์น้ำรวมทั้งสิ่งแวดล้อม โปรไบโอติกจึงถูกใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างแพร่หลาย โดยการผสมในอาหารสัตว์น้ำ หรือโดยการผสมในน้ำ เพื่อช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำและควบคุมเชื้อก่อโรคในระบบอีกด้วย (Verschuere *et al*., 2000) นอกจากนี้มีหลายงานวิจัยที่มุ่งศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยโปรไบโอติก มีการศึกษาในส่วนของคุณสมบัติทางกายภาพ ชีวภาพ และเคมี ของสารดังกล่าว เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสม และเกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบเกี่ยวกับคุณสมบัติในส่วนของน้ำหนักโมเลกุลของสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B-1 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา ซึ่งมีการทดลองใช้เป็นโปรไบโอติกผสมในน้ำเลี้ยงปลา เพื่อควบคุมเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในการเลี้ยงปลานิล (Pungpang *et al*., 2007) และผ่านการทดสอบคุณสมบัติของการเป็นสารต้านจุลินทรีย์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 โดยการศึกษาลำดับเบสในบางส่วนของ 16S rDNA

นำแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ที่ได้จากงานวิจัย เรื่องการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาในการยับยั้งเชื้อ *S .agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (ภายใต้โครงการวิจัยของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ) มาเลี้ยงในอาหาร TSB (Tryptic Soy Broth, Merck) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการแยก DNA ออกจากเซลล์ โดยใช้ชุดสกัด DNA (Qiagen, USA) และทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย โดยใช้ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งใช้เครื่องควบคุมแบบอัตโนมัติ (Thermal Cycler, Takara) และทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยใช้ agarose gel electrophoresis จากนั้นหาและวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยใช้ฐานข้อมูลของ Genbank ใน NCBI โดยใช้โปรมแกรม BLAST เพื่อจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ที่นำมาศึกษา

2. การทำสารต้านจุลินทรีย์ให้เป็นสารบริสุทธิ์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Pinchuk *et al.* (2001) และ Pilasombut *et al.* (2006)

เลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ในอาหาร TSB ปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์โดยใช้ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการแยกสารต้านจุลินทรีย์ ออกจากสารละลายที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงโดยใช้ amberlite XAD-16 (Sigma) น้ำหนัก 20 กรัม ใส่ลงไปที่ได้ และเขย่าให้เกิดการกระจายตัวสม่ำเสมอด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแยก amberlite XAD-16 ออกจากสารละลายโดยเท amberlite XAD-16 ใส่ในคอลัมน์ขนาดความยาว 30 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 เซนติเมตร ใส่น้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผ่านลงไปล้างในคอลัมน์ จากนั้นล้างต่อด้วยเอทานอลความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ลงไปและล้างสุดท้ายด้วย 2-propanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายสุดท้ายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ แล้วนำไประเหย เพื่อเอาแอลกอฮอล์ออกด้วยเครื่องระเหยสารละลายแบบหมุนเหวี่ยง จนเหลือปริมาตรรวมประมาณ 5 มิลลิลิตร และทำให้เป็นสารบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC, water 616) โดยนำสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากขั้นต้น ผ่านเข้าไปใน BDS hypersil C_{18} reverse-phase column (thermo scientific) ที่ผ่านการทำให้เกิดสภาวะสมดุลด้วยสารละลายผสมระหว่าง acetronitrile และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ของ trifluoroacetic acid (TFA) กับ น้ำผสมกับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ TFA ด้วยอัตราเร็วประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากนั้นแยกสารต้านจุลินทรีย์ออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายผสมระหว่าง acetronitrile และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ TFA ที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นจาก 25 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ อย่างต่อเนื่องภายในระยะเวลา 30 นาที ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจวัดโปรตีนที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์ด้วย photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร และเก็บโปรตีนที่ถูกแยกออกมาด้วยหลอดทดลอง และนำมาตรวจวัดค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์กับเชื้อ *S. agalactiae* ABRCS-1 และเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมที่บันทึกได้จากเครื่อง HPLC จากนั้นนำสารละลายในหลอดทดลองที่พบค่ากิจกรรมในแต่ละช่วงเวลามาผ่านคอลัมน์ตามวิธีการที่กล่าวในข้างต้นอีกครั้ง

ผลและวิจารณ์

1. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 โดยการศึกษาลำดับเบสในบางส่วนของ 16S rDNA

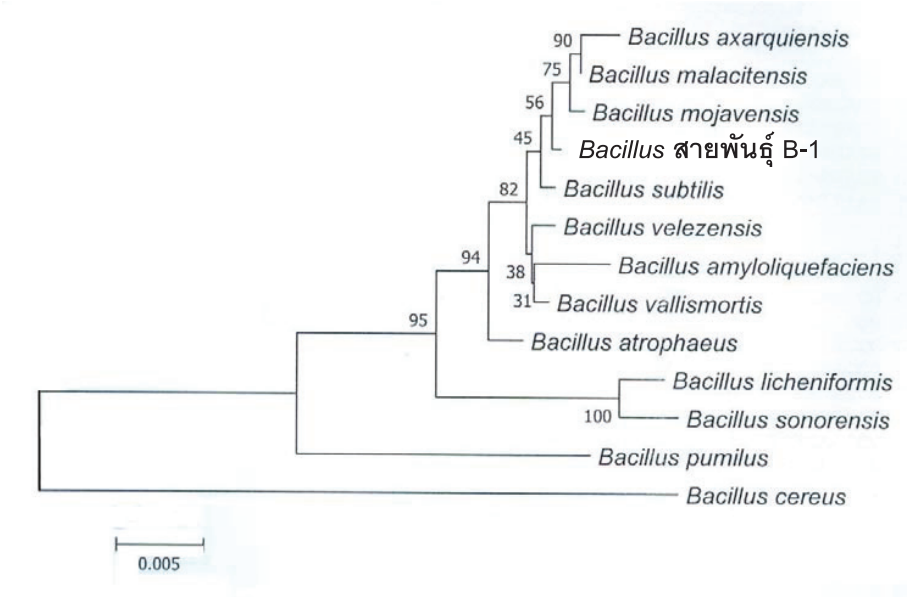
จากการศึกษาลำดับเบสในส่วน 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 และนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่มีการศึกษาไว้แล้ว ในฐานข้อมูลของ Genbank พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 มีลำดับเบสบนส่วนของ 16S rDNA เหมือน (homology) กับแบคทีเรียสกุล *B. subtilis* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ จากความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ระหว่างแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 และ *B. subtilis* สามารถนำมาใช้ประเมินความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

สายพันธุ์อื่น ในรูปแบบ phylogenetic tree ได้ ดังแสดงในภาพที่ 2

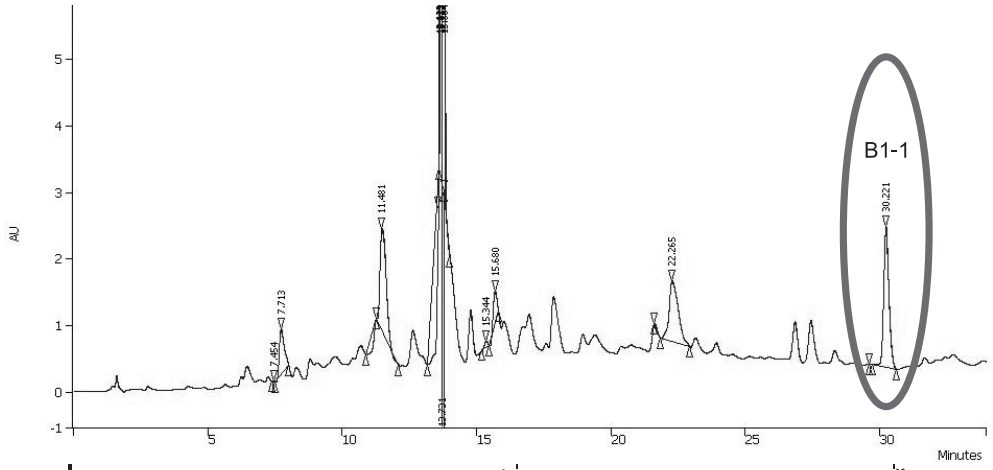
การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยการศึกษาลำดับเบสในบางส่วนของ 16S rDNA สามารถนำมาใช้ประเมินความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้ เนื่องจากยีนในส่วนนี้เป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์ และในแบคทีเรียยีนในส่วนนี้มีการเปลี่ยนแปลงน้อย แม้แต่ในแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก วิธีการดังกล่าวจึงนิยมใช้จำแนกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* หลายชนิด เช่น *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ B38 (Tabbene *et al.*, 2009), *Bacillus subtilis* BKK-1 ซึ่งแยกจากอาหารหมัก (Roongsawang *et al.*, 2002), *Bacillus subtilis* JM14 ที่แยกได้จากดิน (Wu *et al.*, 2005), *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งแยกจากป่า Brazilian Atlantic (Lisboa *et al.*, 2006), *Bacillus indicus* ซึ่งแยกได้จากอุจจาระของมนุษย์ (Le *et al.*, 2006), *Bacillus aquaemaris, Bacillus badius, Bacillus cereus* group, *Bacillus firmus, Bacillus halmapalus, Bacillus hwajinpoensis*, *Bacillus litoralis, Bacillus sporothermodurans* และ *Bacillus vietnamensis* ซึ่งแยกได้จาก สิ่งแวดล้อมทางทะเล (Ki-Seu *et al.*, 2009), *Bacillus subtilis* BP6 ซึ่งแยกได้จากระบบทางเดินอาหารไก่ (Teo and Tan, 2005) จากแผนภาพ Phylogenetic tree แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ซึ่งเป็นสกุลที่มีการศึกษาวิจัยในหลายสาขา ฐานข้อมูลที่ได้จึงมีความน่าเชื่อถือสูง

2. การทำสารต้านจุลินทรีย์ให้เป็นสารบริสุทธิ์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Pinchuk *et al.* (2001) และ Pilasombut *et al.* (2006)

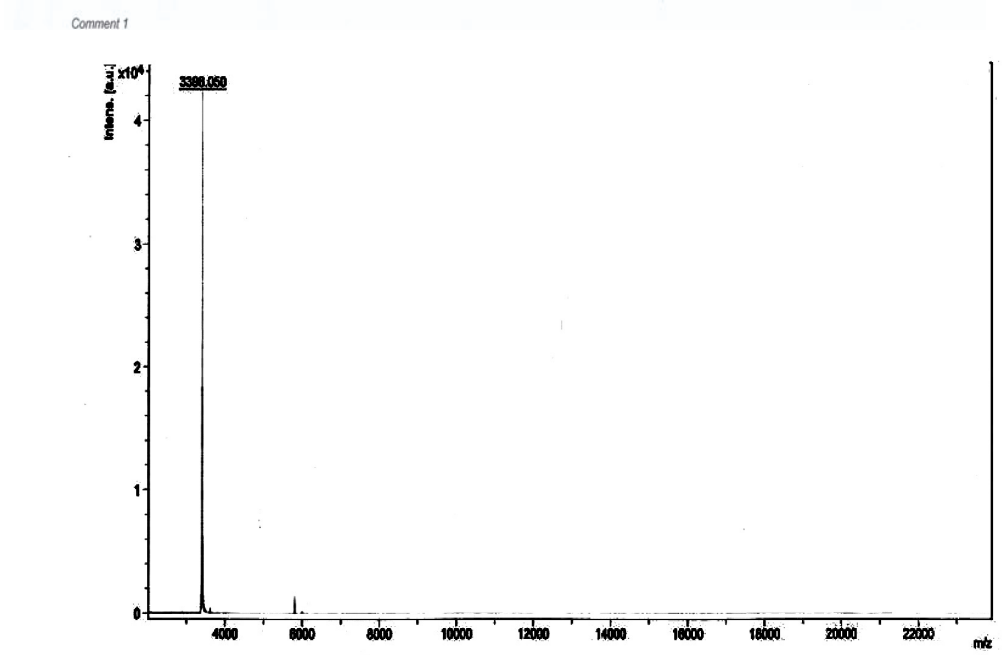
จากการทดลองเมื่อฉีดสารที่สกัดได้ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ที่ต่อกับเครื่อง HPLC พบว่ามี fraction ที่สนใจประมาณ 6 fraction ออกมาที่เวลา ประมาณ 7.713, 11.481, 13, 15, 22 และ 30.221 นาที (ภาพที่ 3)จากนั้นนำ fraction ที่น่าสนใจมาทำการทดสอบกับ *S. agalactiae* ABRCS-1 พบว่า fraction ที่ 6 คือ ที่เวลาประมาณ 30.221 นาที มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *S. agalactiae* ABRCS-1 ได้



ภาพที่ 2 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 กับแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้มีการจัดจำแนกไว้แล้ว



ภาพที่ 3 mass spectrum ของสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการดูดซับสารด้วย amberlite ที่ได้จาก *B. subtilis* B-1 และนำมาใช้แยกโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี



ภาพที่ 4 mass spectrum จากเครื่อง MALDI-TOF ของสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1

จากการทดลองแยกสารต้านจุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี พบว่าสารในกลุ่มดังกล่าวเป็นสารประเภทมีขั้วน้อย เนื่องจากช่วงเวลาที่ออกมาอัตราส่วนของ acetronitrile ผสมกับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ TFA ต่อ น้ำผสม 0.1 เปอร์เซ็นต์ TFA เท่ากับ 63:37 แสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์สามารถละลายใน acetronitrile ได้ดีกว่าในน้ำ จากผลการทดลองเมื่อนำสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากเครื่อง HPLC มาผ่านเครื่อง MALDI-TOF สำหรับวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสาร พบไอออนมวลต่อประจุ (m/z) คือ 3,398.050 ดาลตัน

สารต้านจุลินทรีย์ จากการศึกษานี้มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับสารต้านจุลินทรีย์ที่พบโดย Stein *et al.* (2004) คือ subtilosin A จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,400.7 ดาลตัน และสาร subtilin ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6633 มีน้ำหนักโมเลกุล 3,3319.4 และ 3,419.4 ดาลตัน โดยใช้เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี แบบ MALDI-TOF ใน

การวิเคราะห์ และให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Shelburne *et al.* (2007) ได้ศึกษาสารต้านจุลินทรีย์ subtilosin A ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6633 พบว่าสารดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุล 3,400.7 ดาลตัน โดยใช้เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี วิธี MALDI-TOF ในการวิเคราะห์ และสารดังกล่าวออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จากการทดลองสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันกับสาร subtilosin A ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ATCC 6633 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 ซึ่งสาร subtilosin A จะออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก

เชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน เช่น สาร subpeptin JM4-A และ subpeptin JM4-B ทั้งสองสารออกฤทธิ์ต่อเยื้อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* JM4 แยกได้จากตัวอย่างดินของปักกิ่ง ประเทศจีน(Wu *et al.,* 2005) สารต้านจุลินทรีย์กลุ่ม lantibiotic ชื่อ lichenicidin ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* DSM13 ออกฤทธิ์โดยตรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก (Dischinger *et al.*, 2009) สาร bacitracin จาก *B. licheniformis* ออกฤทธิ์โดยตรงต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์มีผลยับยั้งสูงในแบคทีเรียแกรมบวก (Hussein and AL-Janabi, 2006) เป็นต้น

เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยอาศัยการแตกตัวของโมเลกุล เมื่อถูกอิเล็คตรอนจากแหล่งพลังงานพุ่งชนทำให้แตกเป็นไอออน แล้วแยกไอออนและส่วนแยกย่อย ออกตามค่ามวลต่อประจุ จึงมีความแม่นยำสูง อีกทั้งยังใช้ปริมาณสารตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย และรวดเร็ว (Zendo *et al.,* 2008) และเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรีแบบวิธี MALDI เหมาะสมกับสารในกลุ่มเปปไทด์ โปรตีน และนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดตั้งแต่หลักพันถึงหลักแสนดาลตัน นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์ เช่น ในการทดลองของ Teo and Tan (2005) ใช้วิธี Electrospray ionization ในการวิเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์จากแบคทีเรีย *B. subtilis* PB6 วิธี LC-MS/MS ในการทดลองของ Aunpad and Na-Bangchang (2007) ใช้วิเคราะห์สาร pumilicin 4 จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ WAPB4 เป็นต้น

สรุป

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 โดยใช้เทคนิค 16S rDNA พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ซึ่งเมื่อทำการสกัดสารต้านจุลินทรีย์โดยใช้ amberlite XAD 16 และ นำสารที่ได้มาผ่านเครื่อง HPLC เพื่อทำให้เป็นสารที่บริสุทธิ์ขึ้นและแยกสารที่ต้องการออกมาซึ่งอยู่ที่เวลา 30.221 นาที โดยมีอัตราส่วนของ acetronitrile ผสม 0.1% TFA ต่อ น้ำผสม 0.1% TFA ที่อัตราส่วนเท่ากับ 63:37 จากนั้นนำสารดังกล่าวไปผ่านเครื่อง MALDI-TOF เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล พบสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3398.050 ดาลตัน และข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อการประยุกต์ใช้สารต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ จนงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Aunpad, R. and K. Na-Bangchang. 2007. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. **Curr. Microbiol.** 55: 308-313.

Dischinger, J., M. Josten, C. Szekat , H.G. Sahl and G. Bierbaum. 2009. Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. **Plos one.** 4: e6788.

Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture** 180: 147-165.

Hussein, A. A. and S. AL-Janabi. 2006. Identification of Bacitracin Produced by Local Isolate of *Bacillus licheniformis*. **Afri. J. Biotechnol.** 5: 1600-1601.

Ki-Seu, J., W. Zhang and P.Y. Qian. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. **J. Microbiol. Meth.** 77: 48-57.

Le H.D., P.D. Fraser, N.K.M.Tam and S.M. Cutting. 2006. Carotenoidspresent in halotolerant *Bacillus sporeformers*. **FEMS Microbiol. Rev.** 255: 215-224.

Lisboa, M.P., D. Bonatto, D. Bizani, J.A.P. Henriques and A. Brandelli. 2006. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **Int. Microbiol.** 9:111–116.

Pilasombut, K., T. Sakpuaram, W. Wajjwalku, S. Nitisinprasert, A. Swetwiwathana, T. Zendo, K. Fujita, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2006. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine. **Songklanakarin J. Sci. and Technol**. 28: 121-132.

Pinchuk, I.V., P. Bressollier, B. Verneuil, B. Fenet, I.F. Sorokulova, F. Mégraud and M.C. Urdaci. 2001. In vitro anti-helicobacter pylori activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. **Antimicrob. Agents Ch.** 45: 3156-3161.

Pungpang, S., K. Boonprab, S. Tunkijjanukij, N. Areechon and P. Srisapoome. 2007. Efficiency of Bacteria Isolated from Fish Ponds on Controlling of Pathogenic Bacteria, *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Agricultural Sci. J.** 38: 571-580.

Roongsawang, N., J. Thaniyavarn, S. Thaniyavarn,T. Kameyama, M. Haruki, T. Imanaka, M. Morikawa and S. Kanaya. 2002. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastin, and sufactin. **Extremophiles**. 6: 499-506

Shelburne, C.E., F.Y. An, V. Dholpe, A. Ramamoorthy, D.E. Lopatin and M.S. Lantz. 2007. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A. **J. Antimicrob. Chemoth.** 59: 297-300.

Stein, T.,S. Dusterhus, A. Stroh and K.D. Entian. 2004. Subtilosin Production by Two *Bacillus subtilis* Subspecies and Variance of the *sbo-alb* Cluster. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 2349-2353.

Tabbene, O., I.B. Slimene, F. Bouabdallah, M.L. Mangoni, M.C. Urdaci and F. Limam. 2009. Production of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus* activity from *Bacillus subtilis* sp. strain B38 newly isolated from soil. **ABAB.** 157:407-419.

Teo Yeow-Lim, A. and H.M. Tan. 2005. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a Novel Strain of *Bacillus subtilis* Isolated from the Gastrointestinal Tracts of Healthy Chickens. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 4185–4190.

Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete. 2000. Probiotics bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64: 655-671.

Wu, S.,S. Jia, D. Sun, M. Chen, X. Chen, J. Zhong and L. Huan. 2005. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. **Curr. Microbiol.** 51: 292–296.

Zendo, T.,J. Nakayama, K. Fujita and K. Sonomoto. 2008. Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification. **J. Appl. Microbiol.** 104: 499-507.