การแยกและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแอคติโนแบคทีเรียทนความร้อนจากไลเคน
ISOLATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THERMO-TOLERANT ACTINOBACTERIA FROM LICHENS

กุสุมา บ่วงราบ[1], เกศแก้ว พูลรักษา[1], วงศกร พงศ์โสภิตานันท์[1], ธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์[1]
มนตรี แสงลาภเจริญกิจ[2], ภัครพล พูลสุขโข[1] และเอก แสงวิเชียร[1]
Kusuma Buangrab[1], Ketkaeo Poonraksa[1], Vongsakorn Pongsophitanan[1],
Theerapat Luangsuphabool[1], Montri sanglarpcharoenkt[2], Pakarapon Poonsukkho[1]
and Ek Sangvichion[1]

[1]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ 10240*
[2]*ภาควิชาสัตวบาลและพื้นฐานวิชาชีพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร เขตหนองจอก กรุงเทพฯ 10530*

บทคัดย่อ

แอคติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria) เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก พบได้ทั่วไปในธรรมชาติมีบทบาทในการย่อย สลาย และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มาก งานวิจัยนี้ทำการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียทนความร้อนจากตัวอย่าง ไลเคน ในโครงการ อพ.สธ. โดยชั่งตัวอย่างไลเคนแห้งน้ำหนัก 0.5-1 กรัม อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น เจือจางตัวอย่างด้วยวิธี serial dilution และแยกเชื้อด้วยวิธี spread plate technique บนอาหารชนิด starch casein agar และ ISP2 agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จำแนกเชื้อโดยดูลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีพบว่าแอคติโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีลักษณะคล้ายคลึงกับสกุล *Streptomyces* และนำส่วนน้ำเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้มาสกัดสารด้วย ethyl acetate จากนั้นนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar diffusion โดยใช้แบคทีเรียทดสอบได้แก่ *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus subtilis* ATCC11778, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และยีสต์ *Candida albicans* TISTR 5554 พบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะสารสกัดของแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างไลเคน *Dirinaria applanata* 951 มีผลยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีกว่ายา tetracycline ที่ใช้ทดสอบ

Abstract

Actinobacteria is a group of Gram positive bacteria which are widely found in nature and play major roles as decomposers and as a bioactive compounds producer. Thermo-tolerant actinobacteria were isolated from lichen samples of the Plant Genetic Conservation Project under The Royal Initiative of HRH Princess Maha Chakri Sirindhorn. Dried lichen samples were ground at 80 °C for elimination of other microorganisms. Samples were diluted and following the serial plate technique on Starch casein agar and ISP2 agar were incubated at 37 °C for 7-14 days. Morphological characteristics of cultured colonies combined with biochemical characters were investigated and results showed that all isolates belonged to the genus *Streptomyces*. Crude extracts from culture broths made with ethyl acetate were tested for anti-microbial activity against bacteria, *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus subtilis* ATCC11778, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and yeast *Candida albicans* TISTR 5554 by the disc diffusion method. Crude extracts of

Actinobacteria isolated from lichen sample code *Dirinaria applanata* 951 exhibited greater inhibition against *E. coli* than the standard tetracycline disc.

คำสำคัญ: แอคติโนแบคทีเรีย, ไลเคน, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
Keywords: Actinobacteria, lichens, bio-active compounds

บทนำ

แอคติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่างคล้ายราและสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศ ที่เรียกว่าโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) หรือ โคนิเดีย (conidia) ส่วนขนาดของเส้นใยมีขนาดเล็กกว่ารามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ลักษณะของโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าโคโลนีเกาะแน่นและมีลักษณะจมอยู่ในอาหาร โคโลนีมีลักษณะคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง หยาบขรุขระคล้ายหนังสัตว์ บางชนิดอาจมีการสร้างรงควัตถุสีต่างๆ เช่น สีส้ม สีครีม สีเทา ส่วนการเจริญของเส้นใยมีเจริญไปเป็นเส้นใยที่สัมผัสกับอากาศ (aerial mycelium) และมีส่วนที่เป็นเส้นใยเจริญลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (substrate mycelium) ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญหรือช่วงอายุจะยาวนานกว่าแบคทีเรีย (กิ่งจันทร์, 2555) สารปฏิชีวนะ (antibiotics) เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ใช้ฆ่าหรือชะลอการเติบโตของแบคทีเรีย ในปัจจุบันสารปฏิชีวนะ มากกว่า 6,000 ชนิดผลิตได้จากจุลินทรีย์ใน กลุ่ม Actinobacteria (71.1%), รา(18.2%) และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (10.7%) จุลินทรีย์กลุ่ม Actinobacteria ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* (สมบูรณ์, 2549)

ไลเคนเกิดจากการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาระหว่างรากับสาหร่ายและหรือ cyanobacteria เกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่าแทลลัสขึ้น ในแทลลัสนี้ยังมีจุลินทรีย์อื่นร่วมอาศัยอยู่ด้วยซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีบทบาทแตกต่างกันไป โดยอาจเรียกจุลินทรีย์นี้ในชื่อรวมว่า “endolichenic microorganisms” โดยที่จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีทั้งที่เป็นราและแบคทีเรีย Gonzalez (2005) ทำแยกแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างไลเคนในเขตอาร์คติคและเขตร้อนจำนวน 25 ตัวอย่าง สามารถแยกแอคติโนแบคทีเรียได้ 307 ไอไซเลท แสดงให้เห็นว่าในแทลลัสของไลเคนมีจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆซึ่งบทบาทของจุลินทรีย์เหล่านี้มียังไม่มีการศึกษาและเข้าใจมากนัก

จากงานวิจัยของ Marcelino (2016) พบว่าแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากไลเคน สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีและพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ เช่น uncialamycin, cladoniamides A-G และ1,1-dichlorocyclopropane-containing angucycline เป็นต้น แอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากไลเคนถือได้ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการนำใช้ประโยชน์ในการค้นหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่เนื่องจากในปัจจุบันจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดมีการพัฒนาตัวเองให้ทนหรือต้านยาปฏิชีวนะได้มากขึ้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยกและศึกษาแอคติโนแบคทีเรียทนร้อนที่พบในไลเคนมาทำการศึกษาเพื่อนำใช้งานทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพและเภสัชศาสตร์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

<u>1.การเตรียมตัวอย่างไลเคน</u> ชั่งตัวอย่างไลเคน 0.5-1 กรัมขึ้นกับขนาดและชนิดของไลเคนที่เก็บรวบรวมได้ นำไปอบที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาบด ให้ละเอียด เตรียมสู่ขั้นตอนเจือจางตัวอย่าง (ตัวอย่างไลเคนใน ตารางที่ 1)

2. การเจือจางตัวอย่างและคัดแยกเชื้อ นำไลเคนที่บดละเอียดแล้วใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เจือจางตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} 10^{-2} และ 10^{-3} ปิเปตส่วนน้ำปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในหลอดเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-3} ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ starch casein agar และ yeast extract-malt extract agar (ISP2 agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน

3. ตรวจดูลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเชื้อเจริญบนผิวหน้าอาหารแข็งนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกลักษณะรูปร่างและ การสร้างสปอร์ (ตารางที่ 2) และ (ตารางที่ 3)

4. การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง บันทึกสีของ เส้นใยอากาศ (aerial mycelium), สีโคโลนี (Upper colony) และใช้ลูปขูดผิวโคโลนีเล็กน้อยเพื่อเทียบสีของ เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และดูการผลิตสีรงควัตถุ (Pigment) ลงในอาหารเทียบกับแผ่นสีมาตรฐาน (ตารางที่ 4)

5. การจำแนกชนิดของแอคติโนแบคทีเรียโดยการทดสอบทางชีวเคมี

5.1 ตรวจสอบการสร้าง H_2S เลี้ยงเชื้อบนอาหารชนิด ISP6 agar เป็นเวลา 14 วัน การตรวจผล ถ้าอาหารเกิดตะกอนสีดำ (+) แสดงว่าเชื้อสร้าง H_2S อาหารไม่เกิดตะกอนสีดำ (-) แสดงว่าเชื้อไม่สร้าง H_2S (ตารางที่ 5)

5.2 ตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อบนอาหาร basal medium agar (ISP 9) ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน จำนวน 13 ชนิด เป็นเวลา 14 วัน **การตรวจผล** เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ (ตารางที่ 5)

5.3 ตรวจสอบการรีดิวส์ไนเตรท เลี้ยงเชื้อบนอาหารชนิด nitrate agar slant เป็นเวลา 14 วัน **การตรวจผล** หยด sulfanilic acid และ *N, N*-dimethyl-1-alpha-naphthylamine ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง (+) แสดงว่ามีการรีดิวส์ไนเตรทเกิดขึ้น ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสีให้เติมผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย ถ้ายังเป็นสีแดงแสดงว่ายังมีไนเตรทอยู่ (-) **(**ตารางที่ 5)

5.4 ตรวจสอบการย่อยเจลาติน เลี้ยงเชื้อในอาหาร boullion gelatin broth เป็นเวลา 14 วัน **การตรวจผล** แช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ้าเชื้อย่อยเจลาติน ได้หลังแช่เย็นจะไม่แข็งตัว (+) ถ้าย่อยเจลาตินไม่ได้ หลังแช่เย็นจะแข็ง (-) (ตารางที่ 5)

5.5 ตรวจสอบการสร้างตะกอน (coagulation) เลี้ยงเชื้อในอาหาร skim milk broth แล้วบ่มเชื้อเป็นเวลา 14 วัน **การตรวจผล** ถ้ามีตะกอนแสดงผล (+) ถ้าไม่มีการสร้างตะกอน แสดงผล (-) (ตารางที่ 5)

5.6 ตรวจสอบการย่อยโปรตีน (peptonization) เลี้ยงเชื้อในอาหาร skim milk agar บ่มเชื้อเป็นเวลา 14 วัน **การตรวจผล** ถ้าย่อยโปรตีนได้จะมี รอบโคโลนี (+) ถ้าย่อยไม่ได้ได้จะไม่มีวงใสรอบโคโลนี (-) (ตารางที่ 5)

5.7 ตรวจสอบการย่อยแป้ง เลี้ยงเชื้อในอาหาร inorganic salt starch agar (ISP4) บ่มไว้ 14 วัน **การตรวจผล** หยดสารละลายไอโอดีน (1% w/v) บนผิวหน้าอาหาร ถ้าย่อยแป้งได้จะเห็นโซนรอบโคโลนีที่ไม่ติดสีน้ำเงิน (+) ถ้าย่อยไม่ได้จะเห็นไม่เห็นโซนรอบๆ โคโลนีจะเป็นสีน้ำเงินทั้งหมด (-) (ตารางที่ 5)

6. การสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรีย ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร yeast extract - malt extract broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เตรียมหัวเชื้อในปริมาตร 2 % จำนวน 1 ขวด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารใหม่ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร จำนวน12 ขวด บ่มต่อเป็นเวลา 10 วันในสภาวะเดียวกัน เมื่อครบกำหนดนำมาปั่นแยกเซลล์และส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกัน นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วย ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำชั้น ethyl acetate ไประเหยภายในเครื่อง rotary evaporator

7. ตรวจสอบสารทุติยภูมิเบื้องต้นโดยวิธี Thin layer Chromatography (TLC) นำสารสกัดที่ได้ จากตัวอย่างเชื้อทั้งหมด5 ไอโซเลท มาตรวจสอบด้วยวิธี Thin layer Chromatography ละลายสารสกัดหยาบด้วย CH_3OH จากนั้น Spot ลงบนแผ่น TLC แยกองค์ประกอบด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง $CHCl_2$: CH_3OH (9:1) นำแผ่น TLC ที่ได้ไปส่องภายใต้

รังสีอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสารเพื่อคำนวณหาค่า retention factor (R_f)

8. ทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารที่แอคติโนแบคทีเรียผลิตขึ้น เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar และ nutrient broth, malt broth โดยใช้เชื้อทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus subtilis* ATCC11778, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Candida albicans* TISTR 5554 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland standard No. 0.5 แล้วใช้ไม้พันสำลีชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ ป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar จากนั้น นำแผ่นดิสก์ (disc) ขนาด 6 มม. หยดสารสกัดหยาบที่ได้ ปริมาณ 40 ไมโครลิตรต่อดิสก์ (disc) แล้วทิ้งให้แห้ง นำมาวางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อทดสอบ โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัดเป็นตัวควบคุม (negative control) เปรียบเทียบกับแผ่นดิสก์ (disc) มาตรฐานที่มียาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่จุลินทรีย์ทดสอบไม่เจริญ

ผลการศึกษา

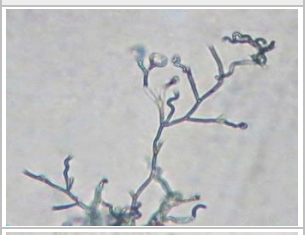
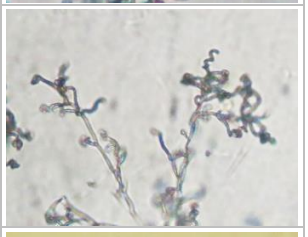
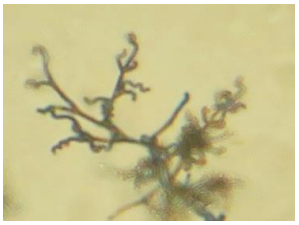
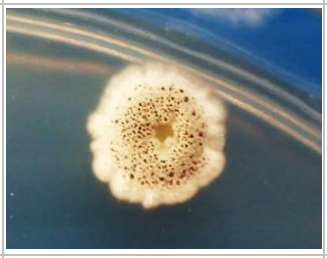
จากตัวอย่างไลเคนในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) จำนวน 90 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างในพื้นที่ มหาวิทยาลัยรามคำแหงสาขาวิทยบริการเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสุโขทัย นำมาแยกแอคติโนแบคทีเรียโดยเน้นไปที่แอคติโนแบคทีเรียที่ทนความร้อน สามารถแยกแอคติโนแบคทีเรียได้จำนวน 5 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 1นำแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทมาจัดจำแนกชนิดเบื้องต้นโดยตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง และนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในภาพที่ 2 และตรวจสอบการลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งชนิด ISP2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 14 วัน ดังแสดงในตารางในตารางที่ 3 และตรวจสอบผลทางชีวเคมีของแอคติโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทดังแสดงในตารางที่ 4 จากตัวอย่างไลเคนหมายเลข CBR11 CBR16 90 940 และ 951 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียที่ปรากฏบนอาหารส่วนใหญ่มี สีขาว เทา น้ำตาล และครีม เหลือง โคโลนีขอบเรียบ หยักตรงกลางโคโลนียุบตัวลงเล็กน้อย ผิวหน้าโคโลนีคล้ายผ้ากำมะหยี่ และผง สร้างสปอร์เป็นสายโซ่ยาวเป็นเกลียว จึงสามารถจำแนกทั้ง 5 ไอโซเลทได้ในสกุล *Streptomyces* จากผลการวิเคราะห์ทางชีวเคมีพบว่าทุกไอโซเลทไม่มีการสร้าง H_2S, ให้ผลบวกในการทดสอบรีดิวส์ไนเตรท การย่อยแป้ง การย่อยโปรตีน และการย่อยเจลาติน อย่างไรก็ตามแต่ละไอโซเลทมีการใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน และการเกิด ตะกอนนม ให้ผลบวก เฉพาะแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จาก *Laurera* sp. 90

ตารางที่ 1. จำนวนไอโซเลทของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างไลเคนโครงการ อพ.สธ.

ลำดับ	ตัวอย่าง	แอคติโนแบคทีเรีย	ลำดับ	ตัวอย่าง	แอคติโนแบคทีเรีย
1.	*Trypethelium eluteriae* 0005	-	46.	*Parmotrema praesorediosum* 111	-
2.	*Pyrenula* sp. 0040	-	47.	*Trypethelium tropicum* 8	-
3.	*Pyrenula* sp. 0052	-	48.	*Polymeridium propunens* 9	-
4.	*Graphis* sp. 0106	-	**49.**	***Sacographa* sp. 11**	**1**
5.	*Pyrenula* sp. 285	-	50.	*Trypethelium eluteriae* 12	-
6.	*Graphis* sp. 308	-	51.	*Astrothelium ochroleucum* 13	-
7.	*Graphis* sp. 641	-	**52.**	***Polymeridium* sp. 16**	**1**
8.	*Astrothelium* sp. 670	-	53.	*Graphis* sp. 31	-
9.	*Pyrenula* sp. 689	-	54.	*Graphis* sp. 48	-
10.	*Astrothelium* sp. 0870	-	55.	*Graphis* sp. 93	-
11.	*Trypethelium eluteriae* 0961	-	56.	*Graphis* sp. 199	-
12.	*Trypethelium platystomum* 1050	-	57.	*Graphis* sp. 235	-
13.	*Trypethelium tropicum* 1057	-	58.	*Graphis* sp. 269	-
14.	*Ocellularia microsorediata* 156	-	59.	*Graphis* sp. 454	-
15.	*Trypethelium eluteriae* 319	-	60.	*Parmotrema pocuso* 1004	-
16.	*Pyrenula quassiaecola* 461	-	**61.**	***Laurera* sp.90**	**1**
17.	*Chrysothrix xanthina* 97	-	62.	*Pyrenula amomala* 866	-
18.	*Pyrenula infraleucotrypa* 392	-	63.	*Enterographa* sp. 867	-
19.	*Leiorreuma sericeum* 439	-	64.	*Graphis lurcats* 830	-
20.	*Leiorreuma sericeum* 452	-	65.	*Laurera benguelensis* 952	-
21.	*Graphis capiiacea* 42	-	66.	*Physcia tribacioides* 826	-
22.	*Pyrenula anomala* 72	-	67.	*Graphis* cf. *upretii* 839	-
23.	*Parmotrema praesorediosum* 116	-	68.	*Dirinaria applanata* 902	-

24.	*Sterile* 400	-	69.	*Sterile* 906	-
25.	*Laurera benguelensis* 413	-	70.	*Bacidia pallidocarnea* 908	-
26.	*Bacidia medialis* 414	-	71.	*Graphis tenuirima* 909	-
27.	*Parmotrema praesorediosum* 472	-	72.	*Dirinria picta* 919	-
28.	*Laurera benguelensis* 469	-	73.	*Reticinopsis rahengensis* 921	
29.	*Sterile* 529	-	74.	*Graphis caesiella* 834	-
30.	*Laurera benguelensis* 577	-	75.	*Hemithecium* sp1. 338	-
31.	*Acanthothesis* sp1.584	-	76.	*Pyrenula immissa* 360	-
32.	*Pyrenula anomala* 633	-	77.	*Laurera subdiscreta* 924	-
33.	*Pyrenula immissa* 651	-	78.	*Laurera benguelensis* 905	-
34.	*Pyrenula immissa* 652	-	79.	*Trypethelium eluteriae* 100	-
35.	*Pyrenula anomala* 701	-	80.	*Lecanora leprosa* 820	-
36.	*Laurera berguelensis* 837	-	81.	*Laurera benguelensis* 922	-
37.	*Sterile* 838	-	82.	*Laurera benguelensis* 926	-
38.	*Laurera berguelensis* 843	-	83.	*Laurera benguelensis* 929	-
39.	*Laurera berguelensis* 878	-	84.	*Laurera benguelensis* 932	-
40.	*Bacidia pallidacarnes* 908	-	85.	*Dirinaria picta* 910	-
41.	***Pertusaria* sp. 940**	**1**	86.	*Sterile* 398	-
42.	***Dirinaria applanata* 951**	**1**	87.	*Sculptolumina japonica* 944	-
43.	*Bacidia schweinlgii* 998	-	88.	*Carnoparmelia owariensis* 934	-
44.	*Pyxine coccifera* 933	-	89.	*Pyrenula immissa* 927	-
45.	*Laurera benguelensis* 935	-	90.	*Parmotrema praesorediosum* 205	-

ตารางที่ 2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

ไอโซเลท	ตัวอย่างไลเคน	ลักษณะโคโลนี	การสร้างสปอร์
CBR11	*Sacographa* sp.		
CBR16	*Polymeridium* sp.		
90	*Laurera* sp.		
940	*Pertusaria* sp.		
951	*Dirinaria applanata*		

ตารางที่ 3. ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง ISP2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 14 วัน

รหัส	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
CBR11	ดี	Light Yellow	Dark Greenish Yellow	Brilliant Yellow	Grayish Greenish Yellow
CBR16	ดี	Pale Blue	Moderate Yellow Green	Greenish Yellow	Grayish Greenish Yellow
90	ดี	Bluish Gray	Deep Yellow	Dark Greenish Yellow	Dark orange Yellow
940	ดี	Pale Blue	Light Greenish Gray	Moderate Yellow Green	Strong Greenish Yellow
951	ดี	Light olive Gray	Brilliant Yellow	Light Greenish Yellow	Light Yellow

ตารางที่ 4. ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแอคติโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

รหัส	การใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยว													การสร้าง H_2S	การรีดิวซ์ไนเตรท	การผลิตเมลานิน	การเกิด Coagulation	การย่อยเจลาติน	การย่อยแป้ง	การย่อยโปรตีน
	กลูโคส	ซูโครส	เซลลูโลส	กาแล็กโทส	แรมโนส	แมนนิทอล	มีโซ-อิโนซิทอล	แมนโนส	ราฟฟิโนส	ฟรุกโทส	แลคโตส	ไซโลส	กลีเซอรอล							
CBR11	+				+	+	-	-	+	+	+			-	+	-	-	+	+	+
CBR16	+				+	+	-	-	-	+	+			-	+	-	-	+	+	-
90	+	±	-	+	+	±	-	‡	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
940	+	-	-	±	±	±	-	±	-	-	-	+	±	-	+	-	-	+	+	+
951	+	-	±	+	+	±	±	±	-	-	-	±	+	-	+	-	-	+	+	+

(‡) **หมายถึง** เจริญดีกว่า กลูโคส มาก

(±) **หมายถึง** เจริญดีมากกว่า Negative แต่น้อยกว่า

(+) **หมายถึง** เจริญดีกว่า กลูโคส

(-) **หมายถึง** เจริญดีกว่า Negative หรือแย่กว่า

ช่องว่าง **หมายถึง** ไม่ได้ทำการทดสอบ

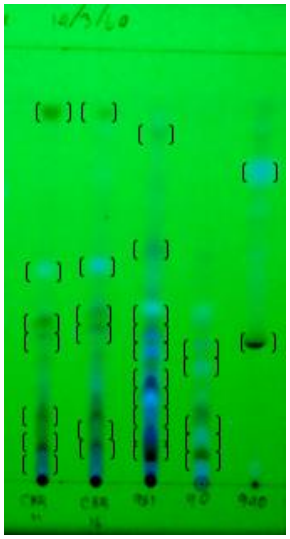
ตารางที่ 5. ขนาดการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ (ซม.)

รหัส	*B. subtilis* ATCC11778	*S. aureus* ATCC25923	*E.coli* ATCC25922	*P. aeruginosa* ATCC27853	*C. albicans* TISTR 5554
CBR 11	1.42	1.60	1.44	-	-
CBR 16	1.11	1.01	1	-	-
90	1.11	1.39	1.21	0.98	-
940	1.15	1.26	1.56	-	1.33
951	3.12	3.24	3.25	3.26	-

ยามาตรฐานที่ใช้ สำหรับจุลินทรีย์ทดสอบ แกรมบวก: Amikacin แกรมลบ: Tetracycline ยีสต์: Fluconazole

<u>ผลการตรวจสอบสารด้วยวิธี TLC</u>

เมื่อทำการเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เป็นเวลา 10 วัน กรองแยกเซลล์ออกนำส่วนน้ำไปทำการสกัดด้วย ethyl acetate แล้วระเหยสารให้เข้มข้นขึ้น นำสารสกัดหยาบที่ได้มาตรวจหาสารทุติยภูมิเบื้องต้นด้วยวิธี TLC แล้ววัดค่า R_f. ได้ดังแสดงที่รูปที่ 1

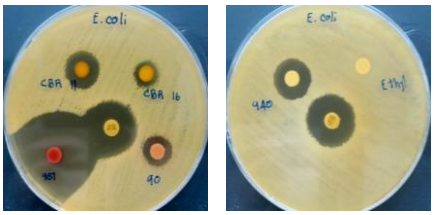


รูปที่ 1. ผลการตรวจสอบสารด้วยวิธี TLC

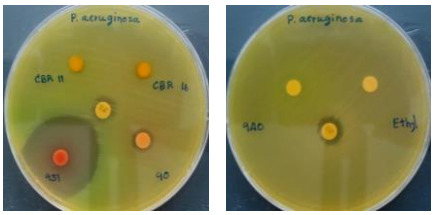
<u>ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบของสารที่แอคติโนแบคทีเรียผลิตขึ้น</u>

เมื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้งชนิดแกรม บวกและลบ รวมทั้งยีสต์ ด้วยวิธี disc diffusion ดังแสดงในที่ตารางที่ 5 โดยน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วย ethyl acetate แล้วทำให้เข้มข้น พบว่า สารสกัดที่ได้จากแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีต่อแบคทีเรียทดสอบแกรมลบ และยีสต์ โดยเฉพาะสารสกัดที่ได้จากตัวอย่างหมายเลข 951 มีฤทธิ์ยับยั้ง *Escherichia coli* ได้ดีกว่ายามาตรฐาน

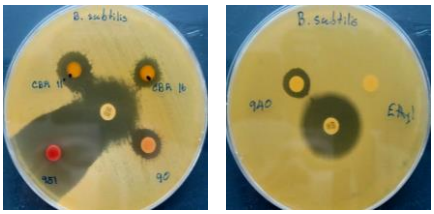
E. coli ATCC25922



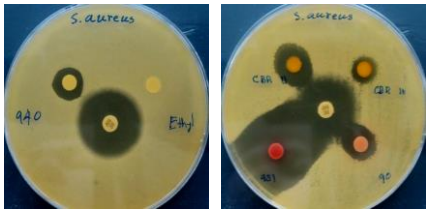
P. aeruginosa ATCC27853



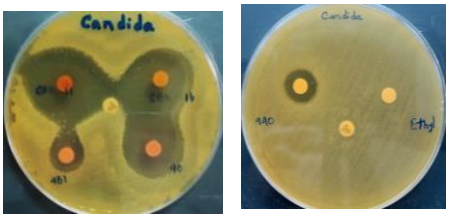
B. subtilis ATCC11778



S. aureus ATCC25923



C. albicans TISTR 5554



รูปที่ 2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

ผลการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างไลเคนในโครงการ อพ.สธ. ที่รวบรวมจำนวน 90 ตัวอย่าง สามารถแยกแอคติโนแบคทีเรียได้จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ตัวอย่างไลเคนหมายเลข CBR11 CBR16 90 940 และ 951 สามารถจำแนกทั้ง 5 ไอโซเลทได้ในสกุล *Streptomyces* และจากผลทดสอบทางชีวเคมีแสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคคทีเรียที่แยกได้แต่ละไอโซเลทน่าจะมีสายพันธุ์ที่แตกต่างกันซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อเพื่อยืนยันชนิดโดยการนำเทคนิคทางวงศ์วานวิวัฒนาการมาช่วยในการตรวจสอบ ถึงแม้ว่าจำนวนของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้มีเพียง 5 ไอโซเลทแต่ก็เป็นแอคติโนแบคทีเรียที่ทนความร้อนได้ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวแตกต่างไปจากกลุ่มแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ทั่วไปซึ่งถือว่าเป็นศักยภาพที่ดี สำหรับแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในครั้งนี้เมื่อเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียในอาหารเหลว YMB ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาทั้งหมด 14 วันแล้วนำส่วนน้ำเลี้ยงมาสกัดสารพบว่าแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ค่อนข้างดีโดยเฉพาะสารจากแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างไลเคน *Dirinaria applanata* หมายเลข 951 มีการผลิตสารปริมาณมากและยังสามารถยังยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ได้ดี เมื่อเทียบกับยามาตรฐาน tetracycline ซึ่งจะได้ทำการแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ ศึกษาหาโครงสร้างทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างอื่นต่อไป

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้เป็นงานสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ โดยได้รับการสนับสนุนเงินวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2559

เอกสารอ้างอิง

กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน. 2555. ความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในดิน. หน้า 11-23. มหาวิทยาลัยราชภัฏ อุดรธานี.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และคณะ. 2549. อนุกรมวิธานและสารทุติยภูมิของแอคติโนไมซีทที่คัดเลือกได้จากดินเกาะเสม็ด. หน้า 1-68. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Cernava, T. 2016. High Life Expectancy of Bacteria on Lichens. Microb Ecol. 72:510–513.

Kelly, K. L. 1964. Inter-Society Color Council – National Bureau of Standards Color Name Charts illustrated with Centroid Colors. Washington, DC: US Government Printing Office.

Gonzoalez, I. 2005. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. Microb Ecol. 54:401-415.

Suzuki, M.T., Parrot, D., Berg, G. and Grube, M. and S. Tomasi. 2016. Lichens as natural sources of biotechnologically relevant bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 100:583–585.