การระบุชนิดและฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนแบคทีเรียทนความร้อนที่แยกได้จากไลเคน
IDENTIFICATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES ISOLATED FROM THERMO-TOLERANT ACTINOBACTERIA FROM LICHENS

กุสุมา บ่วงราบ*, ภัครพล พูลสุขโข, วงศกร พงศ์โสภิตานันท์ และ เอก แสงวิเชียร
Kusuma Buangrab*, Pakarapon Poonsukkho, Vongsakorn Pongsophitanan and Ek Sangvichien

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ 10240
Department of Biology, Faculty of Science at Ramkhamhaeng University, Bang Kapi, Bangkok 10240

บทคัดย่อ

แอคติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียทนความร้อนจากตัวอย่างไลเคนในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) ได้จำนวน 5 ไอโซเลตคือ หมายเลข 90, 940, 951, CBR11 และ CBR16 จากการจัดจำแนกเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับสกุล *Streptomyces* และมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี จึงนำแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษาต่อเพื่อตรวจสอบชนิดโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยามาช่วยยืนยัน ทำการเพิ่มปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน 16s rRNA แล้วเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐาน GenBank พบว่า ไอโซเลตหมายเลข 90 และ 951 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces pseudogriseolus* NRRLB-3288T 98.5 % ไอโซเลตหมายเลข 940 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces hygroscopicus* NBRC 13472T 99.74 % ไอโซเลตหมายเลข CBR11 และ CBR16 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces chilikensis* RC 1830T 99.04 % เมื่อการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างปฏิชีวะสารด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration (MIC) พบว่า แอคติโนแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Candida albicans* TISTR5554 ได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ได้ ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส, เพคตินเนส และไซแลนเนส พบว่า แอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้สามารถสร้างเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดได้ดี เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ α- glucosidase พบว่า สารที่ได้จากแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α- glucosidase สำหรับการทนความร้อนของสปอร์แอคติโนแบคทีเรียนั้นพบว่า ที่สปอร์ของแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

Abstract

Actinobacteria is a group of Gram positive bacteria, which are involved in organic decomposition and in the production of bioactive compounds. In our previous report, 5 actinobacteria were isolated from lichen samples of the Plant Genetic Conservation Project Under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG). They are represented as code 90, 940, 951, CBR11 and CBR16 respectively, and preliminary identifications and characterizations were also preformed. The results revealed that each of the isolated were similar to the genus *Streptomyces* and also exhibited antimicrobial activities. Further experiments were continued in the current report. The 16s rRNA gene was amplified, sequenced and compared sequences in the GenBank database. The data showed that isolates 90 and 951 were similar to *Streptomyces pseudogriseolus* NRRLB-3288T 98.95 %, isolate 940 was similar to *Streptomyces hygroscopicus* NBRC 13472T 99.74 % and isolates CBR11 and CBR16 were similar to *Streptomyces chilikensis* RC 1830T 99.04 % respectively. Antimicrobial assay by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was also performed with inhibition results against *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and *Candida albicans* TISTR5554 but none of them represented activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. It was also found that these isolated actinobacteria were good-producers of degrading enzymes such as cellulose, pectinase and xylanase but none of them

exhibited inhibition activities against the **α**- glucosidase enzyme. Interestingly, spores of these actinobacteria were thermo-tolerant at 80 °C for 2 hours.

คำสำคัญ: การสร้างปฏิชีวนะสาร, ฤทธิ์ทางชีวภาพ, ไลเคน, แอคติโนแบคทีเรีย
Keywords: Antimicrobial, Biological activity Lichen, Actinobacteria

***ติดต่อนักวิจัย:** กุสุมา บ่วงราบ (อีเมล์ **sai_kusuma@hotmail.com**)
***Corresponding author:** Kusuma Buangrab (E-mail: **sai_kusuma@hotmail.com**)

บทนำ

แอคติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Barka *et. al*., 2016) สกุลสำคัญของแอคติโนแบคทีเรียที่พบทั่วไป ได้แก่ *Micromonospora*, *Nocardia*, *Streptomyces* และ *Themomonospora* สำหรับสกุล *Streptomyces* ซึ่งพบได้มากที่สุดนั้นถูกตั้งโดย Waksman และ Henrici ในปี ค.ศ. 1943 เป็นสกุลที่อยู่ในวงศ์*Streptomycetaceae* ปัจจุบันมีชื่อชนิดของ*Streptomyces* มากกว่า 700 ชนิด (Euzèby, 2010 สืบค้นได้จาก http://www.bacterio.cict.fr/s/*streptomycesa*.html) การตั้งชื่อว่า *Streptomyces* นั้นเนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่างคล้ายเส้นใยรา และสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า โคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) หรือ โคนิเดีย (conidia) ทำให้เห็นโคโลนีมีลักษณะคล้ายผงหรือฝุ่นแป้งบางชนิดอาจมีการสร้างรงควัตถุสีต่างๆ เช่น สีส้ม สีครีม สีเทา (กิ่งจันทร์, 2555) เดิมเรียกจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ว่า Actinomycetes แต่ปัจจุบันใช้ Actinobacteria แทนเพื่อความถูกต้องในระบบอนุกรมวิธาน *Streptomyces* จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในด้านความหลากหลายทางชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ทั้งสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ย่อยสลาย สารออกฤทธิ์ทางเภสัชเวท และอื่นๆ

ไลเคนเกิดจากการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาระหว่างรากับสาหร่ายและหรือ cyanobacteria เกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่าแทลลัสขึ้น ในแทลลัสนี้ยังมีจุลินทรีย์อื่นร่วมอาศัยอยู่ด้วย ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีบทบาทแตกต่างกันไป โดยอาจเรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ในชื่อรวมว่า “endolichenic microorganisms” โดยที่จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีทั้งที่เป็นราเส้นใย ยีสต์และแบคทีเรีย Spribille *et. al.* (2016) และ Saeng-in และคณะ (2558) ได้รายงานการแยกและกิจกรรมการสร้างสารปฏิชีวนะจาก *Streptomyces* และ *Actinoplanes* ที่แยกจากตัวอย่างไลเคนในจังหวัดมหาสารคาม ได้ *Streptomyces* 9 ไอโซเลตและ *Antinoplanes* 3 ไอโซเลต และพบว่า *Streptomyces* ที่แยกได้ 4 ไอโซเลต แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ได้

กุสุมาและคณะ (2560) ได้รายงานในงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการแยกแอคติโนแบคทีเรียทนร้อนที่พบในไลเคนในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) สามารถแยก Actinobacteria ได้ 5 สายพันธุ์ ได้นำมาศึกษาลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและจัดจำแนกชนิดเบื้องต้น และทดสอบฤทธิ์ของสารที่แบคทีเรียดังกล่าวสร้างขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติเพิ่มเติมของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ “งานวิจัยนี้ เป็นงานสนองพระราชดำริใน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ”

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

งานวิจัยของกุสุมาและคณะ (2560) ได้ทำการคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียทนความร้อนจากตัวอย่างไลเคนในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) แยกแอคติโนแบคทีเรียได้ 5 ไอโซเลต คือ 90, 940, 95, CBR11 และ CBR16 โดยทำการจำแนกชนิดเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบทางชีวเคมี พบว่าแอคติโนแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต มีลักษณะใกล้เคียงกับสกุล *Streptomyces* และให้ฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี ทั้งนี้ เพื่อยืนยันถึงชนิดของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ จึงดำเนินงานวิจัยต่อโดยมีวิธีการศึกษาดังนี้

<u>1. การตรวจสอบชนิดของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ 5 ไอโซเลต ด้วยวิธีทางอณูวิทยา</u>

<u>1.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ</u>

แยกดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์ โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย ใน Yeast extract – Malt extract agar (ISP2) 7-14 วัน เก็บเชื้อปริมาณ 20-50 ไมโครกรัม ใส่หลอด ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ใส่เม็ด stainless beads ลงในหลอดแล้วเติม Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) 50 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด จากนั้นเติม CTAB 300 ไมโครลิตร

และ 5 % Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) 100 ไมโครลิตร นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 70 °C 30 นาทีจากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้Chloroform: isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปั่นด้วยความเร็ว 10000 G เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนน้ำใส่ลงหลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol 0.6 เท่า นำตัวอย่างไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10000 G เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำออกและล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ตากตะกอนให้แห้งเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เติม Tris-EDTA buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร และเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และการตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis

นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง DNA Thermal cycler ในส่วน 16S rRNA โดยใช้ Universal Primer 2 สายได้แก่ Primer 20F (5′-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3′) และ Primer 1530 R (5'-AAGGAGATCCAGCCGCA-3') โดยใช้เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase และ deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ทำปฏิกิริยาอุณหภูมิต่างๆ ในแต่ละรอบ ดังนี้ pre-denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที เริ่มระยะที่1 Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที ระยะที่ 2 Annealing ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 นาที ระยะที่ 3 Extension ใช้อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที จากขั้นตอนที่1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (One cycle) โดยทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบและรอบสุดท้ายเป็นระยะ final extension ใช้อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 3 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresisจากนั้นนำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rRNA ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Genaid, Taiwan) ส่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1st BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย

1.3 การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) บนสาย 16S rRNA และ การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetc Tree)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 1.2 ด้วยโปรแกรม BLAST ใน (www.ncbi.nlm.nih.gov) ทำการ Alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจากข้อมูล Genbank โดยใช้ alignment software และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0

2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างปฏิชีวะสารด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

ชั่งสารสกัดหยาบของแอคติโนแบคทีเรียและยามาตรฐาน Chloramphenicol ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ละลายด้วย 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 มล. ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อลง 96-well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และใส่ยามาตรฐาน Chloramphenicol ลงใน 2 แถวแรก เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม และใส่สารสกัดหยาบของแอคติโนแบคทีเรีย ลงในแถวถัดมาจากนั้น ทำการเจือจางแบบ two-fold serial dilution และเติมเชื้อทดสอบ *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Candida albicans* TISTR5554 ปริมาณ 100ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม 95% Iodonitrotetrazolium chloride ปริมาณ 40 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นที่ให้ผลยับยั้งจะให้ผลเป็นสีเหลือง ระดับความเข้มข้นที่สารสกัดแอคติโนแบคทีเรียไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบ 95% Iodonitrotetrazolium chloride จะจับกับเชื้อทดสอบจะเห็นเป็นสีชมพู

3. ทดสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส เพคตินเนส และไซแลนเนส

ถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีส่วนประกอบของเซลลูโลส เพคตินและไซแลน ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร เติมสารทดสอบดังนี้

3.1 ทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เติม 1% Congo red แล้วพักไว้ 15 นาที แล้วเทออก เติม 1 N NaCl พักไว้ 15 นาที แล้วเทออก เติม 1% HCl พักไว้ 15 นาที แล้วเทออก สังเกตวงใสรอบโคโลนี

3.2 ทดสอบการสร้างเอนไซม์เพคตินเนส เท1% hexadecyltrimethyl ammonium bromide แล้วพักไว้ 1 ชั่วโมง สังเกตวงใสรอบโคโลนี

3.3. ทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนส สังเกตวงใสรอบโคโลนีได้เลย

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α- glucosidase

ใส่เอนไซม์ α- glucosidase ความเข้มข้น 0.05 u/40µl เติม สารสกัดหยาบของแอคติโนแบคทีเรีย ปริมาณ 40 µl ลงในหลอดทดลอง เขย่าที่ความเร็ว 190 rpm เป็นเวลา 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เติม 0.5 mM 4-nitrophenyl-α- glucopyranoside ปริมาณ 40 µl เขย่า 190 rpm เป็นเวลา 2 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 30 นาที เติม 1M Sodium carbonate solution ปริมาณ 40 µl

นำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 405 nm

5. ทดสอบการทนความร้อนของสปอร์แอคติโนแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 80° C

กระจายสปอร์ของแอคติโนแบคทีเรียในน้ำ 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่มี Silica gel beads ปริมาณ 3 ก. ให้สปอร์เกาะบนผิวของเม็ด Silica gel บ่มที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเม็ด Silica gel วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7-14 วัน ตรวจดูการเจริญและโคโลนีของจุลินทรีย์

ผลการศึกษา

1. ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ในช่วง 16s rRNA และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

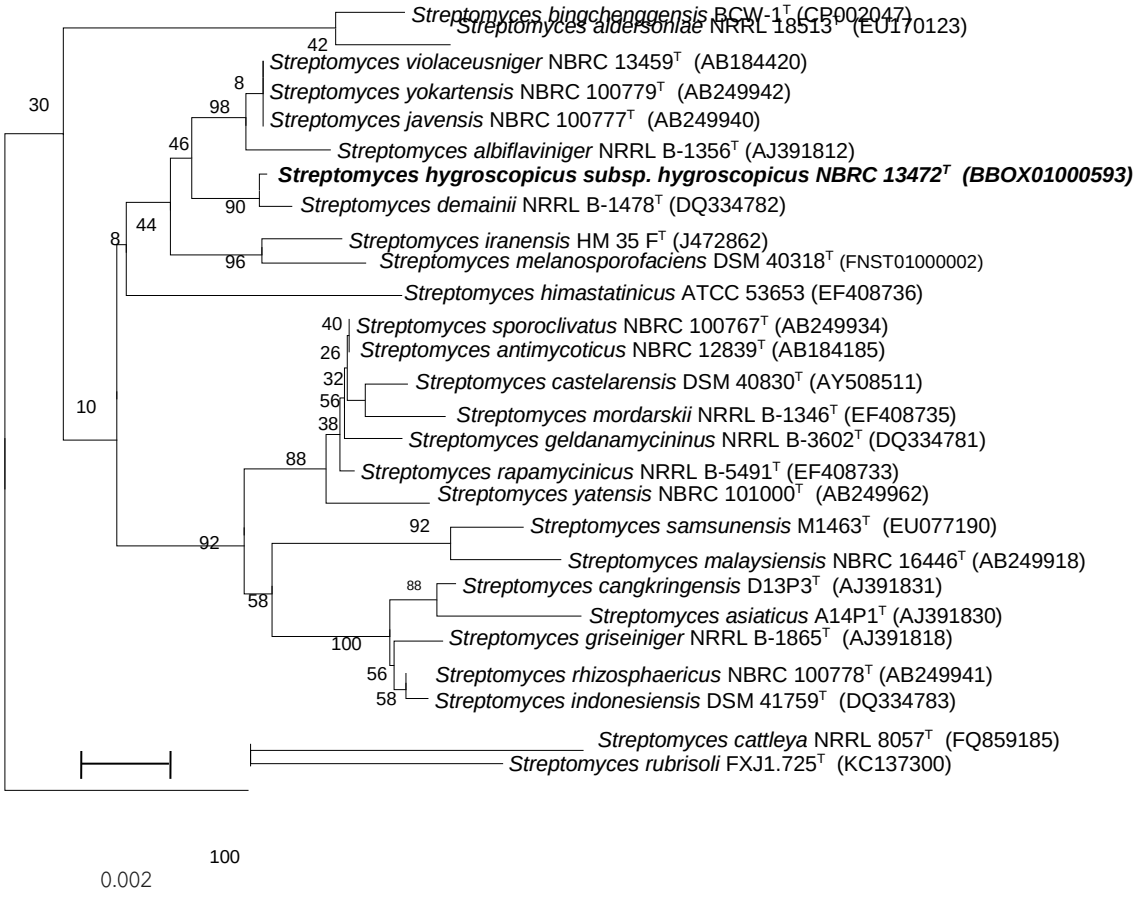
พบว่าแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ 5 ไอโซเลต หมายเลข 90, 940, 951, CBR11 และ CBR16 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces pseudogriseolus*, *Streptomyces hygroscopicus* และ *Streptomyces chilikensis* ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

2. ผลการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ด้วยวิธี Microdilution 96-well plate แอคติโนแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Candida albicans* TISTR5554 แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa ATCC27853* ได้ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบของแอคติโนแบคทีเรียหมายเลข 90, 940, 951, CBR11 CBR16 สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* TISTR5554 ได้ดี

3. ผลการทดสอบ การสร้างเอนไซม์เซลลูเลส, เพคตินเนส และ ไซแลนเนส พบว่า แอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 5 โซเลต สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีมาก รองลงมา คือ เอนไซม์เพคตินเนส ในส่วนของเอนไซม์ไซแลนเนสนั้นพบว่าแอคติโนแบคทีเรียสามารถสร้างได้น้อย (ในภาพอาจสังเกตยาก เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อค่อนข้างทึบแสงมาก)

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) บนสาย 16s rRNA

สายพันธุ์ที่แยกได้	ความเหมือน (%)	สายพันธุ์ที่ใกล้เคียง
90	98.95	*Streptomyces pseudogriseolus* NRRL B-3288^{T}
951	98.95	*Streptomyces pseudogriseolus* NRRL B-3288^{T}
940	99.74	*Streptomyces hygroscopicus* NBRC 13472^{T}
CBR11	99.04	*Streptomyces chilikensis* RC 1830^{T}
CBR16	99.04	*Streptomyces chilikensis* RC 1830^{T}



ภาพที่ 1 วงศ์วานวิวัฒนาการ ของ ตัวอย่างหมายเลข 940 โดยใช้ ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน ช่วง 16s rRNA

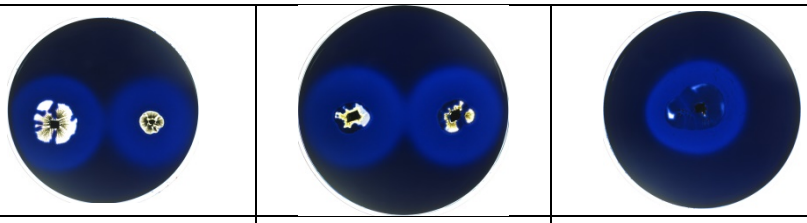
ตารางที่ 2 ค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ด้วยเทคนิค Microdilution 96-well plate

ไอโซเลต	ความเข้มข้นของสารแอคติโนแบคทีเรีย(mg/ml)	ค่า Minimal Inhibitory Concentration (µg/ml) แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ				
		E. coli ATCC25922	*P. aeruginosa ATCC27853*	*B.subtilis ATCC6633*	*S.aureus ATCC25923*	*C.albicans TISTR5554*
90	2.6	-	-	81.2	1300	81.2
940	3.3	103.1	-	51.5	206.2	51.5
951	2.8	1400	-	87.5	700	21.8
CBR11	4.5	1125	-	562.5	2250	140.6
CBR16	2.4	300	-	300	1200	37.5

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ การย่อยเอนไซม์ เซลลูเลส เพคติเนส ไซแลนเนส

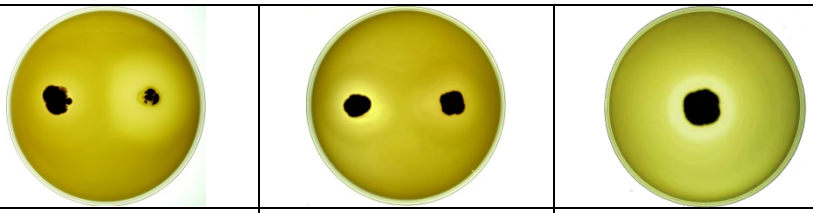
ชนิดของเอนไซม์	90	940	CBR11	CBR16	951
เซลลูเลส	++	++	++	++	++
เพคติเนส	+	++	++	++	++
ไซแลนเนส	+	+	+	+	+

ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยเอนไซม์เซลลูเลส



90 940 CBR11 CBR16 951

ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยเอนไซม์เพคติเนส



90 940 CBR11 CBR16 951

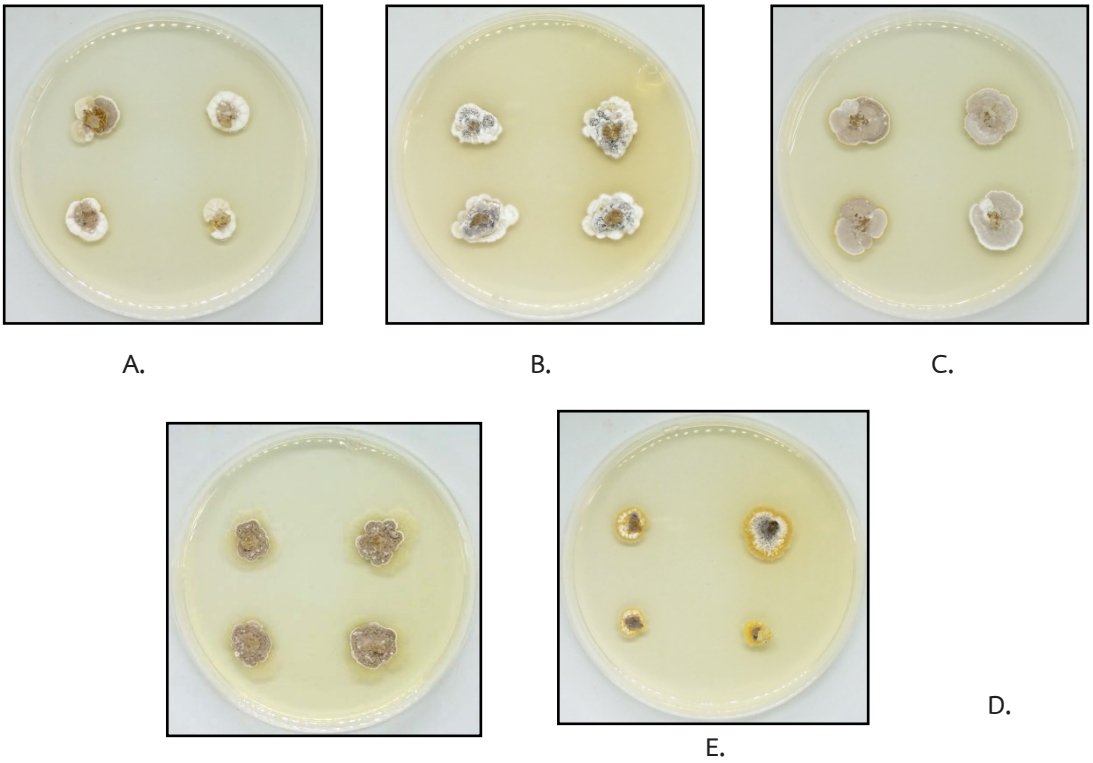
ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยเอนไซม์ไซแลนเนส

90 940 CBR11 CBR16 951

ภาพที่ 3 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส, เพคตินเนส และ ไซแลนเนส

4. ผลการทดสอบ α- glucosidase inhibitor พบว่า สารที่ได้แอคติโนแบคทีเรียทั้ง 5 ตัวอย่าง ให้ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในระดับที่ α- glucosidase ได้น้อย

5. ผลการทดสอบการทนความร้อนของสปอร์แอคติโนแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 80°C เมื่อนำเม็ด Silica gel ที่มีสปอร์ของแอคติโนแบคทีเรียเกาะอยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 2 ชั่วโมงแล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C พบว่า สปอร์ของแอคติโนแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต สามารถงอกและเจริญเป็นโคโลนีได้



A. B. C. D. E.

ภาพที่ 4 โคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ หลังจากอบที่อุณหภูมิ 80° C
A. 90 **B.** 940 **C.** 951 **D.** CBR11 **E.** CBR16

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

เมื่อนำดีเอ็นเอในช่วง 16s rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างไลเคนในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) (กุสุมา และคณะ, 2560) ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า แอคติโนแบคทีเรีย ไอโซเลตหมายเลข 90, 951 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces pseudogriseolus* NRRLB-3288^{T} 98.95% ไอโซเลตหมายเลข 940 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces hygroscopicus* NBRC 13472^{T} 99.74% ไอโซเลตหมายเลข CBR11, CBR16 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces chilikensis* RC 1830^{T} 99.04 % การวิเคราะห์ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) พบว่า แอคติโนแบคทีเรีย ทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Candida albicans* TISTR5554 แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 เมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส เพคตินเนส และไซแลนเนส พบว่าแอคติโนแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดได้ดีในส่วนการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-glucosidase พบว่าสารที่ได้จากแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 5 โซเลต ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α- glucosidase ได้ และการศึกษาการทนความร้อนของสปอร์ สามารถยืนยันได้ว่าสปอร์ของแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C ได้นานถึง 2 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียเหล่านี้มีศักยภาพที่จะนำไปใช้งานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเนื่องจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี โดยอาจศึกษาหาโครงสร้างทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทางด้านอื่นต่อ

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้เป็นงานสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ โดยได้รับ

การสนับสนุนเงินวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2562

เอกสารอ้างอิง

กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน. 2555. ความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในดิน.หน้า 11-23. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

กุสุมา บ่วงราบ และคณะ. 2560. การแยกและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแอคติโนแบคทีเรียทนความร้อนจากไลเคน. การประชุมวิชาการชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 8 “ทรัพยากรไทย : ศักยภาพมากล้นมีให้เห็น” (29 พฤศจิกายน-1 ธันวาคม พ.ศ. 2560), ณ ศูนย์เครือข่ายการเรียนรู้เพื่อภูมิภาค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, สระบุรี.

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

Barka, A, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, G., Jacquard, C., Klenk, H, P., Clément, C., Ouhdouch, Y. 2016. Physiology and Natural Product of Actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 80 (1) Euzèby. 2010. สืบค้นได้จาก (http://www.bacterio.cict.fr/s/*streptomyces*.html)

Saeng-in, P., Kuncharoen, N., Chamroensaksri, N., Tanasupawat, S. 2015. Identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* and Actinoplanes strains from lichens. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 5 (01), 023-029.

Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., M. Catherine Aime, Schneider, K., Stabentheiner, E., Toome-Heller, M., Thor, G., Mayrhofer, H., Johannesson, H., John P. McCutcheon. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. Science. 353(6298), 488-492.