ศวท: ศิลปศาสตร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
LAS: Liberal Arts, Science and Technology

ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 (มกราคม-เมษายน): 2567
Article Number: 20241657

บทความวิจัย (Research Article)

การยับยั้งแบคทีเรียและการต้านไบโอฟิล์มของแอคติโนแบคทีเรียจากดินตะกอนป่าชายเลน

Antibacterial and Antibiofilm of Actinobacteria Isolated from Mangrove Sediments

ปวีณา สุขสอาด[1] รัชนี มิ่งมา[2,*]

[1]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์พระนครศรีอยุธยา-หันตรา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13000

[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Paweena Suksaard[1] Ratchanee Mingma[2,*]

[1]Department of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Phra Nakhon Si Ayutthaya-Huntra Campus, Phra Nakhon Si Ayutthaya, 13000

[2]Department of Science and Bioinnovation, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

***Corresponding author:** faasrnm@ku.ac.th, 086-959-9594

Received: 31/01/2024; Revised: 23/02/2024; Accepted: 23/02/2024

บทคัดย่อ

แอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถต้านเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ได้และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อีกด้วย ซึ่งไบโอฟิล์มของแบคทีเรียเป็นปัญหาสำคัญเนื่องจากสามารถเพิ่มความต้านทานต่อสารต้านจุลินทรีย์และทำให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ได้ง่ายขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมการต้านแบคทีเรียและการยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มของแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากตะกอนดินป่าชายเลน ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกแอคติโนแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 17 ไอโซเลต บนอาหาร starch casein (SC) agar ในจำนวนนี้มี 7 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างน้อย 1 ชนิด ไอโซเลต KK11 และ KK27 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ดีที่สุด ตามลำดับ คัดเลือกไอโซเลต KK27 มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่าไอโซเลต KK27 ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* และ *B. cereus* คิดเป็น 30.0 และ 67.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลต KK27 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces daghestanicus* NRRL B-5418^T 100 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: การต้านไบโอฟิล์ม; การยับยั้งแบคทีเรีย; ดินตะกอนป่าชายเลน; แอคติโนแบคทีเรีย

Abstract

Actinobacteria are Gram-positive bacteria that have an important role in producing bioactive compounds against various microorganisms and have the ability to inhibit the formation of biofilms. Bacterial biofilms increase the resistance of microorganisms to antimicrobial agents and develop the human infection. The propose of this research was to investigate antibacterial activity and antibiofilm

formation of the actinobacteria isolated from mangrove sediments. The results showed that 17 isolates were obtained from starch casein (SC) agar. Out of these, 7 isolates showed inhibition activities against at least one tested pathogen. Isolates KK11 and KK27 showed the highest activity against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, respectively. Isolate KK27 was further selected for the antibiofilm activity. The result showed that isolate KK27 reduced 30.0 and 67.4% biofilm formation of *S. aureus* and *B. cereus*, respectively. Based on 16S rRNA sequence analysis, isolate KK27 was the most closely related to *Streptomyces daghestanicus* NRRL B-5418^T with 100% similarity.

Keywords: Antibiofilm; antibacteria; mangrove sediments; actinobacteria

บทนำ

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารเป็นปัญหาที่สำคัญต่อผู้ประกอบการด้านอาหารและมีผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคที่ได้รับเชื้อทั้งจากอาหารและเครื่องดื่ม เชื้อก่อโรคที่พบได้มาก เช่น *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* สามารถก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษจากการสร้างสารพิษออกมาปนเปื้อนในอาหาร หรือก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะทำให้ยากต่อการรักษาอันเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข (Mengistu et al., 2022) เชื้อก่อโรคเหล่านี้กระจายอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ หรือแม้แต่ทางเดินอาหารของสัตว์เลือดอุ่น จึงทำให้สามารถปนเปื้อนลงสู่อาหารที่ยังไม่ผ่านความร้อนและอาหารปรุงสุกได้ นอกจากนี้เชื้อก่อโรคบางชนิดสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงที่ใช้ในการปรุงอาหารได้ (Regenthal et al., 2017) เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มีการสร้างสารโพลีแซคคาไรด์ออกมาภายนอกเซลล์ที่เรียกว่าไบโอฟิล์ม ทำให้เซลล์สามารถเกาะยึดติดกับพื้นผิวต่าง ๆ ได้ดี มีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มขึ้น และอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เมื่อเทียบกับแบคทีเรียทั่วไปแบคทีเรียที่สร้างไบโอฟิล์มจะทนต่อสภาวะกดดัน ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ หลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ดี และยากต่อการกำจัด (Sharma et al., 2023) หากไม่กำจัดเซลล์แบคทีเรียออกตั้งแต่เริ่มต้น แบคทีเรียจะสร้างไบโอฟิล์มติดที่พื้นผิวได้มั่นคงยิ่งขึ้น และก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรังในสัตว์อาศัยได้ ดังนั้นการหาสารหรือวิธีการลดและกำจัดการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียจึงเป็นเรื่องที่สำคัญในการแก้ปัญหาเหล่านี้

ในปัจจุบันการศึกษาหาจุลินทรีย์สร้างสารเมแทบอไลต์ที่สามารถยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มเป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ในการแก้ปัญหาการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรค ซึ่งแอคติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเส้นใย พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ (Whitman et al., 2012) แอคติโนแบคทีเรียเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด รวมทั้งสารทุติยภูมิที่มีความซับซ้อนทางชีวภาพ เช่น สารยับยั้งการสื่อสารระหว่างเซลล์ (anti-quorum sensing) และสารยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (Wijaya et al., 2023) ซึ่งแหล่งธรรมชาติที่พบความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียที่สำคัญแหล่งหนึ่ง คือ ป่าชายเลนซึ่งเป็นระบบนิเวศที่มีความชื้นสูง มีความเค็ม และมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณออกซิเจนจากน้ำขึ้นลงตลอดเวลา จึงเป็นแหล่งที่มีรายงานการค้นพบจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ และเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายมากอีกด้วย (Azman et al., 2015; Jagannathan et al., 2021; Ye et al., 2023) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างดินป่าชายเลนที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารที่สำคัญ

ระเบียบวิธีวิจัย

การแยกและเพาะเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรีย

แยกแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลนคลองโคน จังหวัดสมุทรสงคราม ด้วยวิธีการเจือจางลำดับส่วน ด้วยอาหาร starch casein (SC) agar (Kuster and Williams, 1964) ที่เติมยา ketoconazole (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ nalidixic acid (25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เพื่อยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรีย ตามลำดับ หลังจากบ่มจานอาหารเป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจการเจริญของโคโลนีแอคติโนแบคทีเรีย โคโลนีมีขนาดเล็ก ไม่แผ่ลาม สร้างสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งบนผิวหน้าโคโลนี ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยโคโลนีมาเลี้ยงแบบขีดลาก (cross streak) บนอาหาร International *Streptomyces* Project 2 (ISP2) (Shirling and Gottlieb, 1966) จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ เลี้ยงเชื้อบนอาหารผิวเอียง (slant agar) ISP2 เก็บสปอร์และเส้นใยในสารละลายกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บรักษาระยะยาว

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* ด้วยวิธี agar overlay method โดยเตรียมสารแขวนลอยสปอร์และเส้นใยของแอคติโนแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ดูดสารแขวนลอยปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวอาหาร ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เตรียมสารแขวนลอยของแบคทีเรียก่อโรคทดสอบโดยเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) บ่มแบบเขย่าข้ามคืน นำมาปรับความขุ่นเซลล์ให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^8 CFU/ml ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}= 0.25) แล้วดูดสารแขวนลอยปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมใน nutrient soft agar (0.6% agar, w/v) ให้เข้ากันและราดทับบนผิวหน้าอาหารที่เลี้ยงของแอคติโนแบคทีเรียไว้ก่อนหน้า บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (A) และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (B) คำนวณค่าความสามารถในการยับยั้ง (inhibition capacity) จากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (A/B)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร starch casein (SC) broth บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใสด้านบน กรองผ่านฟิลเตอร์เมมเบรน (ขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน) นำของเหลวที่กรองมาทดสอบการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มตามวิธีที่อธิบายโดย Leetanasaksakul and Thamchaipenet (2018) ที่มีการดัดแปลงเล็กน้อย เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดสอบในอาหารเหลว NB บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน นำเชื้อทดสอบมาปรับความขุ่นเซลล์ให้ได้ OD_{600} เท่ากับ 0.25 ก่อนถ่ายเชื้อปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในหลุมจานเพาะเลี้ยง 96-well plate ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 60 ไมโครลิตร จากนั้นเติมส่วนใสปราศจากเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มจานเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

(phosphate buffer saline; PBS) 3 ครั้ง ตรึงไบโอฟิล์มด้วยสารละลายเมทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ดูดของเหลวทิ้ง แล้วปล่อยให้แห้ง ย้อมไบโอฟิล์มด้วยสีย้อมคริสตัลไวโอเลต 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อหลุม เป็นเวลา 7 นาที เทสีทิ้งและล้างสีส่วนเกินด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง ปล่อยให้แห้ง ละลายไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Biofilm inhibition} = \left(\frac{A_{570} \text{ of biofilm without supernatant} - A_{570} \text{ of biofilm with supernatant}}{A_{570} \text{ of biofilm without supernatant}} \right) \times 100$$

การระบุชนิดแอคติโนแบคทีเรียโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียบนอาหาร ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกสีสปอร์ สีเส้นใย และการสร้างรงควัตถุ ศึกษาลักษณะเส้นใยและการเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สกัดดีเอ็นเอของแอคติโนแบคทีเรียโดยวิธีของ Take et al. (2015) เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 1F (5’-TCACGGAGAGTTTGATCCTG-3’) และไพรเมอร์ 1530R (5’-AAGGAGATCCAGCCGCA-3’) (Kataoka et al., 1997) ทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยบริษัท Bionics ประเทศเกาหลีใต้ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EzbioCloud (https://www.ezbiocloud.net/) (Yoon et al., 2017) โดยใช้โปรแกรม BLAST เพื่อระบุชนิดของแอคติโนแบคทีเรียในระดับสกุล และสร้างแผนภูมิต้นไม้โดยใช้โปรแกรม MEGA 11.0 (Tamura et al., 2021) เพื่อดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การแยกแอคติโนแบคทีเรียและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

การเจริญของโคโลนีแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณป่าชายเลนคลองโคน จ.สมุทรสงคราม มีความแตกต่างกับโคโลนีแบคทีเรียทั่วไป โดยโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียมีลักษณะแข็ง เกาะแน่นกับผิวหน้าวุ้น สร้างสปอร์คล้ายผงแป้งสีขาว-เทา โคโลนีมีสีขาว เหลือง ส้ม และดำ (Figure 1) และสามารถแยกแอคติโนแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้ทั้งหมด 17 ไอโซเลต เมื่อนำทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด ด้วยวิธี agar overlay method พบว่ามีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลต คิดเป็น 41.2 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด ทุกไอโซเลตสามารถยับยั้ง *B. cereus* และมีจำนวน 5 ไอโซเลต ยับยั้ง *S. aureus* (Table 1) งานวิจัยนี้ไม่พบแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้เลย ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่รายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Boudjella et al., 2006; Mingma et al., 2014) สาเหตุประการหนึ่งเนื่องจากความแตกต่างของโครงสร้างผนังเซลล์ระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ 2 ชั้น ชั้นในสุดเป็นชั้นของเปบทิโดไกลแคน (peptidoglycan)

ส่วนชั้นนอกสุด (outer membrane) เป็นชั้นของลิโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งช่วยป้องกันเซลล์จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารต้านจุลินทรีย์ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกซึ่งมีผนังเซลล์ที่เป็นเปบทิโดไกลแคนเพียงชั้นเดียว ทำให้ง่ายต่อการถูกทำลายได้มากกว่า (Nikaido, 1989)

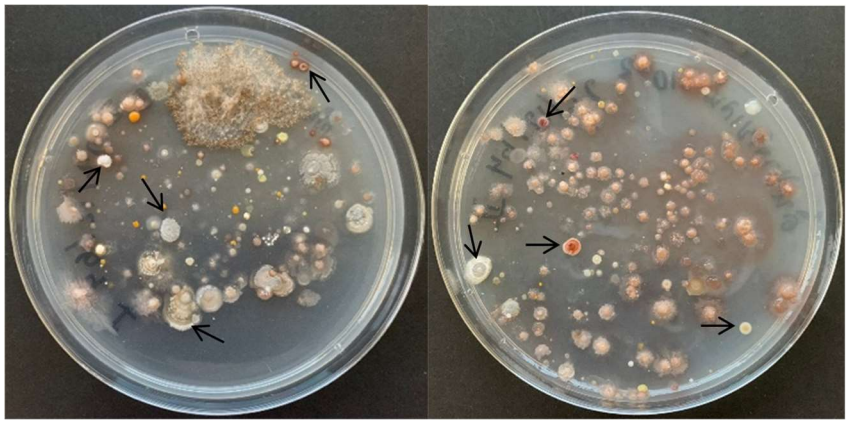

Figure 1: Actinobacterial colonies indicated by the arrow on starch casein agar plates incubated for 14 days at 28 °C.

Table 1: Antimicrobial activity of actinobacteria by agar overlay method

Isolate name	Inhibition capacity			
	Bacillus cereus	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*
KK06	2.75 ± 0.05	1.7 ± 0.1	-	-
KK11	4.21 ± 0.09	2.47 ± 0.24	-	-
KK20	3.38 ± 0.14	-	-	-
KK22	4.13 ± 0.07	2.28 ± 0.03	-	-
KK25	2.56 ± 0.26	2.58 ± 0.25	-	-
KK27	2.3 ± 0.42	3.31 ± 0.01	-	-
KK28	2.6 ± 0.28	-	-	-

แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *B. cereus* บนอาหารแข็งได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลต KK11 โดยมีค่าความสามารถในการยับยั้งเท่ากับ 4.13 รองลงมาคือไอโซเลต KK22, KK20, KK06, KK28, KK25 และ KK27 ตามลำดับ และไอโซเลต KK27 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* บนอาหารแข็งดีที่สุด โดยมีค่าความสามารถในการยับยั้งเท่ากับ 3.31 รองลงมาคือไอโซเลต KK25, KK11, KK22 และ KK06 (Table 1) จากผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจึงคัดเลือกไอโซเลต KK27 ที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ดีที่สุด มาทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเซลล์ใน

การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก่อโรค เนื่องจาก *S. aureus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข และเป็นเชื้อฉวยโอกาสดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะเมธิซิลลิน (methicillin) ที่เรียกว่า methicillin-resistant *S. aureus* หรือ MRSA (Stapleton and Taylor, 2002) นอกจากนี้ยังดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (penicillin) และออกซาซิลิน (oxacillin) ได้อีกด้วย (Foster, 2017)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

คัดเลือกไอโซเลต KK27 มาทดสอบการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยเลี้ยงในอาหาร starch casein broth บ่มแบบเขย่าเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเซลล์มีการเจริญเป็นเม็ดกลม สีน้ำตาลอมแดง สร้างรงควัตถุสีน้ำตาล เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* พบว่าสารละลายส่วนใสที่ปราศจากเชื้อของไอโซเลต KK27 ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* และ *B. cereus* ได้ คิดเป็น 30.0 และ 67.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ อาจเนื่องมาจากการสร้างชั้นไบโอฟิล์มประกอบด้วยเซลล์และสารโพลีแซคคาไรด์ที่เซลล์สร้างออกมา ความหนาของชั้นไบโอฟิล์มจึงแปรผันตรงกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ นอกจากนี้องค์ประกอบของไบโอฟิล์มจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ โดยในแบคทีเรียแกรมบวก เช่น กลุ่ม *Staphylococcus* ไบโอฟิล์มประกอบด้วย teichoic acid ผสมกับสารกลุ่มโปรตีนทำให้ไบโอฟิล์มเป็นประจุบวก ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบจะสร้างไบโอฟิล์มที่ประกอบด้วย uronic acids (เช่น D-glucuronic, D-galacturonic และ mannuronic acids) หรือเชื่อมต่อกับ pyruvic acid ทำให้เกิดประจุลบจับกับแคลเซียมและแมกนีเซียมได้ดี ส่งผลให้มีแรงยึดเกาะมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Flemming et al., 2000; Sutherland, 2001) จึงเป็นไปได้ว่าไอโซเลต KK27 สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* และ *B. cereus* ได้ เนื่องจากสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อทั้งสองได้ และสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในไบโอฟิล์มของแบคทีเรียแกรมบวกได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต KK27 (1,380 คู่เบส) พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (Figure 2) มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces daghestanicus* NRRL B-5418^{T} (DQ442497) คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหาร ISP 2 สร้างสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งสีเทา สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมเหลือง และไม่สร้างรงควัตถุ เซลล์มีการเจริญเป็นเส้นใยที่มีการแตกแขนง และสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว (Figure 3) มีรายงานว่าแอคติโนแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* spp. สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีส่วนในการย่อยโปรตีนได้หลายชนิด เช่น alpha-chymotrypsin, leucine arylamidase และ trypsin เป็นต้น (BacDive, 2023) นอกจากนี้ ไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและสร้างไบโอฟิล์มเป็นสกุล *Streptomyces* สอดคล้องกับรายงานวิจัยหลายฉบับก่อนหน้านี้ที่พบว่าแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากป่าชายเลน ส่วนใหญ่เป็นสมาชิกในสกุล *Streptomyces* (Kokare et al., 2004; Xiao et al., 2008; Hong et al., 2009; Satheeja and Jebakumar, 2011; Thatoi et al., 2013) เนื่องจาก *Streptomyces* เป็นแอคติโนแบคทีเรียที่เจริญได้รวดเร็วกว่าแอคติโนแบคทีเรียสกุลอื่น และมีความสามารถในการสร้างสปอร์ช่วยให้สามารถแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมได้ง่ายและดำรงชีวิตได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดี (Sathiyaseelan and Stella, 2011)

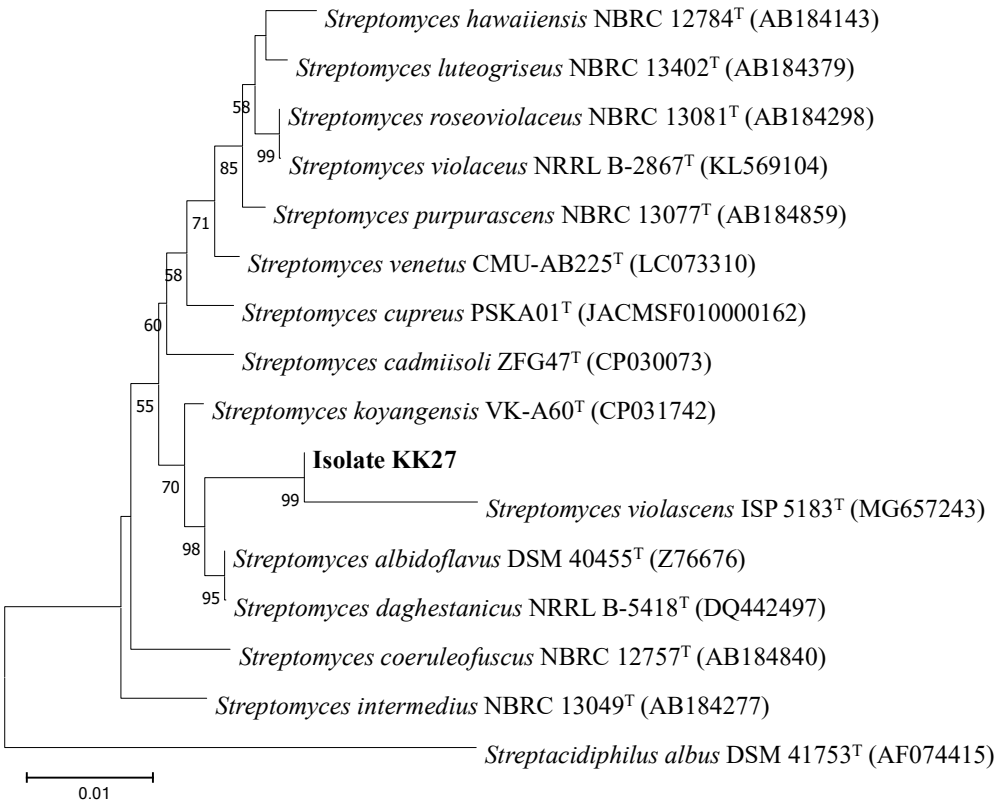

Figure 2: Phylogeny trees constructed using the Neighbor-joining tree method based on 16S rRNA sequencing showing the phylogenetic relationships of isolate KK27 and related taxa. Bootstrap percentages (based on 1000 replicates) are shown if greater than 50%

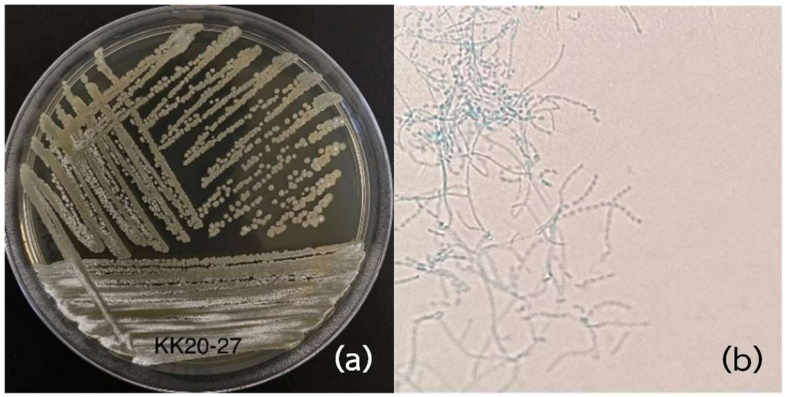

Figure 3: The colony morphology of isolate KK27 on ISP2 plate (a) and microscopic photograph showing spore chains on branched mycelia (b) grown for 7 days at 28 °C.

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

แอคติโนแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลต ที่แยกจากดินป่าชายเลนคลองโคน จังหวัดสมุทรสงคราม มีจำนวน 7 ไอโซเลตหรือคิดเป็น 41.2 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* ได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด ไอโซเลต KK27 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ดีที่สุด จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลต KK27 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* sp. (*Streptomyces daghestanicus* NRRL B-5418^{T}, 100% similarity) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของไอโซเลต KK27 สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* และ *B. cereus* ได้ดี แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มในการนำไอโซเลต KK27 มาใช้ควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ต่อการทำลายชั้นไบโอฟิล์ม และการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคที่สร้างชั้นไบโอฟิล์มต่อไป

แอคติโนแบคทีเรียจากดินป่าชายเลน จังหวัดสมุทรสงครามของประเทศไทย เป็นอีกหนึ่งแหล่งทางชีวภาพที่มีแนวโน้มที่ดีในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ และเป็นแหล่งที่ดีในการแยกแอคติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม หากมีการศึกษาพื้นที่ทางป่าชายเลนอื่น ๆ เพิ่มเติมจะสามารถเพิ่มโอกาสในการพบแอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กรรณิการ์ ดวงมาลย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษา (mentor) และให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ นางสาวธนัชญา ทุมอะริยะ นายณัฐชนน คงสุทธิ์ และนางสาวพลอยระวี เพชรงาม โครงการสนับสนุนการจัดตั้งห้องเรียนวิทยาศาสตร์ในโรงเรียน โดยการกำกับดูแลของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (โครงการ วมว.มก.) และรายวิชาโครงงานวิทยาศาสตร์ ประจำปีการศึกษา 2564

เอกสารอ้างอิง

Azman, A.-S., I. Othman, S.S. Velu, K.-G. Chan and L.-H. Lee. 2015. Mangrove rare actinobacteria: Taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. Frontiers in Microbiology 6: 856.

BacDive. 2023. *Streptomyces daghestanicus* DSM 40149 is a mesophilic bacterium that produces antibiotic compounds and was isolated from soil. Available Source: https://bacdive.dsmz.de/strain/15120_17, December, 2023.

Boudjella, H., K. Bouti, A. Zitouni, F. Mathieu, A. Lebrihi, et al. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. Microbiological Research 161(4): 288-298.

Flemming, H.-C., J.G. Wingender, T. Griebe and C. Mayer. 2000. Physico-chemical properties of biofilms. pp. 19-34. In: L.V. Evans (ed.). Biofilms: Recent Advances in their Study and Control. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

Foster, T.J. 2017. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. FEMS Microbiology Reviews 41(3): 430-449.

Hong, K., A.-H. Gao, Q.-Y. Xie, H. Gao, L. Zhuang, et al. 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. Marine Drugs 7(1): 24-44.

Jagannathan, S.V., E.M. Manemann, S.E. Rowe, M.C. Callender and W. Soto. 2021. Marine actinomycetes, new sources of biotechnological products. Marine drugs 19(7): 365.

Kataoka, M., K. Ueda, T. Kudo, T. Seki and T. Yoshida. 1997. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. FEMS Microbiology Letters 151(2): 249-255.

Kokare, C.R., K.R. Mahadik and S.S. Kadam. 2004. Isolation of bioactive marine actinomycetes from sediments isolated from Goa and Maharashtra coastline (west coast of India). Indian Journal of Marine Sciences 33(3): 248-256.

Kuster, E. and S.T. Williams. 1964. Selection of media for isolation of Streptomycetes. Nature 202: 928-929.

Leetanasaksakul K. and A. Thamchaipenet. 2018. Potential anti-biofilm producing marine actinomycetes isolated from sea sediments in Thailand. Agriculture and Natural Resources. 52(3): 228-233.

Mengistu, D.A., D.D. Belami, A.A. Tefera and Y.A. Asefa. 2022. Bacteriological quality and public health risk of ready-to-eat foods in developing countries: Systematic review and meta analysis. Microbiology Insights. 15. 11786361221113916.

Mingma, R., W. Pathom-aree, S. Trakulnaleamsai, A. Thamchaipenet and K. Duangmal. 2014. Isolation of rhizospheric and roots endophytic-actinomycetes from Leguminosae plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. glycine. World Journal of Microbiology and Biotechnology 30(1): 271-280.

Nikaido, H. 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance antimicrobial agents and chemotherapy. 33(11): 1831–1836.

Regenthal, P., J.S. Hansen, I. André and K. Lindkvist-Petersson. 2017. Thermal stability and structural changes in bacterial toxins responsible for food poisoning. PLoS One. 12(2): e0172445.

Satheeja, S.V. and S.R.D. Jebakumar. 2011. Phylogenetic analysis and antimicrobial activities of *Streptomyces* isolates from mangrove sediment. Journal of Basic Microbiology 51(1): 71-79.

Sathiyaseelan, K. and D. Stella. 2011. Isolation, identification and antimicrobial activity of marine actinomycetes isolated from Parangipettai. Recent Research in Science and Technology 3(9): 74-77.

Sharma, S., J. Mohler, S.D. Mahajan, S.A. Schwartz, L. Bruggemann, et al. 2023. Microbial Biofilm: A review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment. Microorganisms. 6: 1614.

Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology 16(3): 313-340.

Stapleton, P.D. and P.W. Taylor. 2002. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Mechanisms and modulation. Science Progress 85(1): 57-72.

Sutherland, I.W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. Microbiology 147(1): 3-9.

Take A., A. Matsumoto, S. Omura and Y. Takahashi. 2015. *Streptomyces lactacystinicus* sp. nov. and *Streptomyces cyslabdanicus* sp. nov., producing lactacystin and cyslabdan, respectively. The Journal of Antibiotics. 68: 322-327.

Tamura K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular Biology and Evolution. 38(7): 3022-3027.

Thatoi, H., B.C. Behera, R.R. Mishra and S.K. Dutta. 2013. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: A review. Annals of Microbiology 63(1): 1-19.

Whitman, W.B., M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.–J. Busse, M.E. Trujillo, et al. 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria. 2nd eds. Springer, New York.

Wijaya, M., D. Delicia and D.E. Waturangi. 2023. Control of pathogenic bacteria using marine actinobacterial extract with antiquorum sensing and antibiofilm activity. BMC Research Notes 16(1):305.

Xiao, Z., J. Boyd, S. Grosse, M. Beauchemin, E. Coupe, et al. 2008. Mining *Xanthomonas* and *Streptomyces* genomes for new pectinase-encoding sequences and their heterologous expression in *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology 78(6): 973-981.

Ye, J.-j., R.-j. Zou, D.-d. Zhou, X.-l. Deng, N.-l. Wu, et al. 2023. Insights into the phylogenetic diversity, biological activities, and biosynthetic potential of mangrove rhizosphere Actinobacteria from Hainan Island. Frontiers in Microbiology. 14:1157601.

Yoon, S.-H., S.-M. Ha, S. Kwon, J. Lim, Y. Kim, et al. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 67(5): 1613-1617.