แบบฟอร์มแจ้งความประสงค์การใช้งบประมาณสำหรับการพัฒนาบุคลากรคณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2560

****

ข้าพเจ้า นางสาวศรีกาญจน์ กล้าบเมือง ตำแหน่ง อาจารย์ สังกัด ราชภัฏเลย

ได้ขออนุญาตเข้าร่วม ประชุม และนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 55 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตามหนังสือขออนุญาต ศธ.0523.4. ส.3 /๓๐๕ ลงวันที่ ๒๕ มกราคม ๒๕๕๙ โดยข้าพเจ้ามีความประสงค์จะขอใช้งบประมาณพัฒนาบุคลากรของคณะวิทยาศาสตร์ ใน

☐ กรณีที่ 1 ไม่มีเอกสารใด ๆ เสนอคณะฯ (คนละไม่เกิน 6,000 บาท)

☐ กรณีที่ 2 มีเอกสารรายงานสรุปเนื้อหาฯ (คนละไม่เกิน 8,000 บาท) โดยจัดส่งเอกสารรายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์ อย่างน้อย 1 หน้ากระดาษ A4

☑ กรณีที่ 3 เข้าร่วมนำเสนอผลงานวิชาการฯ

- คนละไม่เกิน 15,000 บาท (สำหรับสายวิชาการ)
- คนละไม่เกิน 10,000 บาท (สำหรับสายสนับสนุนวิชาการ)

โดย**จะจัดส่งหนังสือตอบรับการเข้าร่วมนำเสนอผลงานฯ และเอกสารดังต่อไปนี้**

1. บทคัดย่อ หรือสำเนาโปสเตอร์(ย่อขนาด A4) หรือบทความฯ ฉบับเต็ม
2. รายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์ อย่างน้อย 1 หน้ากระดาษ A4
3. เอกสารอื่น ๆ (โปรดระบุ).....

☐ กรณีที่ 4 เข้าอบรมเชิงปฏิบัติการฯ

- คนละไม่เกิน 15,000 บาท (สำหรับสายวิชาการ)
- คนละไม่เกิน 10,000 บาท (สำหรับสายสนับสนุนวิชาการ)

โดย**จะจัดส่งหนังสือตอบรับการเข้าร่วมอบรมเชิงปฏิบัติการฯ และเอกสารดังต่อไปนี้**

1. สำเนาใบรับรอง หรือหนังสือรับรอง หรือใบประกาศนียบัตร หรือวุฒิบัตร จากการเข้าอบรมฯ
2. รายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์ อย่างน้อย 1 หน้ากระดาษ A4
3. เอกสารอื่น ๆ (โปรดระบุ).....

ในปีงบประมาณ พ.ศ.2560 (1 ต.ค.59 –30 ก.ย.60) ข้าพเจ้าได้ใช้งบพัฒนาบุคลากรฯ ไปแล้ว จำนวนทั้งสิ้น 1 ครั้ง ดังต่อไปนี้

-ครั้งที่ - เลือกใช้กรณีที่ - ใช้งบประมาณไปแล้วเป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น - บาท

-ครั้งที่ ..... เลือกใช้กรณีที่..... ใช้งบประมาณไปแล้วเป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น.....บาท

-ครั้งที่ ..... เลือกใช้กรณีที่..... ใช้งบประมาณไปแล้วเป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น.....บาท

(หากมีจำนวนครั้งเกินกว่านี้ ให้ทำรายละเอียดแนบท้ายเพิ่มเติม)

.....ศรีกาญจน์..... ผู้ขออนุญาต

(นางสาวศรีกาญจน์ กล้าบเมือง)

...../...../.....

..... ประธานหลักสูตร/เลขานุการคณะ/หัวหน้างาน

(.....ผศ.สุรพงษ์ ลงรัมย์.....)

...../...../.....

หมายเหตุ : 1. งบประมาณที่ใช้สำหรับการพัฒนาบุคลากร หมายรวมถึงค่าใช้จ่ายทุกประเภทที่ใช้ในการเข้าร่วมการอบรม/สัมมนา/ประชุม เช่น ค่าลงทะเบียน ค่าใช้จ่ายในการเดินทาง และอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

2. การใช้งบประมาณพัฒนาบุคลากรในที่คณะวิทยาศาสตร์จัดสรร ให้ถือปฏิบัติตามเงื่อนไขที่ได้กำหนดไว้ในแต่ละกรณี

(ฉบับปรับปรุงใหม่ตามมติที่ประชุมคณะกรรมการประจำคณะฯ ครั้งที่ 5/2556 เมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2556)

รายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์จากการเข้าอบรม สัมมนา หรือประชุมวิชาการ

ข้าพเจ้า นางสาวศรีกาญจนา คล้ายเรือง ตำแหน่ง อาจารย์ สังกัด คณะวิทยาศาสตร์ ขอนำเสนอรายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์จากการเข้าประชุม และนำเสนอผลงานวิจัย ในงานประชุมวิชาการวิชาการระดับชาติ การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๕๕ "ศาสตร์แห่งแผ่นดินสู่ประเทศไทย ๔.๐" เมื่อวันที่ ๓๑ มกราคม– ๓ กุมภาพันธ์ พ.ศ. ๒๕๖๐ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร ตามหนังสือขออนุญาตเดินทางไปราชการ เลขที่ ศธ ๐๕๒๓.๔.๔.๓/๒๐๘ ลงวันที่ ๒๗เดือน ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๕๙ จึงขอนำเสนอสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์ของ การอบรมดังต่อไปนี้

สรุปเนื้อหา

จากการเข้าร่วมประชุม และนำเสนอผลงานวิจัย ในงานประชุมวิชาการวิชาการระดับชาติ การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๕๕ "ศาสตร์แห่งแผ่นดินสู่ประเทศไทย ๔.๐" ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนองค์ความรู้ในศาสตร์สาขาต่างๆ ทั้งสาขาวิทยาศาสตร์และพันธุวิศวกรรม อุตสาหกรรมเกษตร และทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ระหว่างผู้เข้าร่วมนำเสนอผลงานวิจัย กับผู้ทรงคุณวุฒิ ทั้งภาคบรรยายและภาคโปสเตอร์นั้น สามารถสรุปได้ดังนี้

๑. การอภิปรายพิเศษ เรื่อง "ศาสตร์แห่งแผ่นดินสู่ประเทศไทย ๔.๐" โดย ดร.สุเมธ ตันติเวชกุล เลขาธิการมูลนิธิชัยพัฒนา ดร.วิวัฒน์ ศัลยกำธร ประธานมูลนิธิกสิกรรมธรรมชาติ รศ.ดร.ปัทมาวดี โพชนุกูล รักษาการ ผอ.ฝ่ายชุมชน สกว. และ รศ.ดร.สิรี ชัยเสรี รก.รองอธิการบดีฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทำให้ทราบถึงการใช้ศาสตร์และหลักการที่ได้จากแนวทางการทรงงานของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวรัชกาลที่ ๙ มาปรับให้เข้ากับแผนพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย จากมุมมองของผู้รับใช้ใกล้เบื้องพระยุคลบาท และนักวิชาการ

๒. การฟื้นฟูทางชีวภาพดินปนเปื้อนน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วโดยใช้จุลชีพเฉพาะ ในงานนี้ผู้วิจัยได้ใช้แบคทีเรีย *Pseudomonase putida* TISTR๑๕๒๒ บำบัดดินปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นที่ใช้แล้วจากอู่ซ่อมรถ สรุปว่าว่าในการย่อยสลายดินปนเปื้อนน้ำมันที่เหมาะสม ควรใช้ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติม *P. putida* ที่อัตราการเติมอากาศ ๐.๔ L/min ปรับอัตราส่วน C/N ให้เท่ากับ ๓๒

๓. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต Indole–acetic acid (IAA) ของ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากดินด่าง โดยศึกษาผลของ yeast extract, mannitol, K_2HPO_4, $MgSO_4$, NaCl, L–tryptophan และ pH โดยใช้ การทดลองแบบ Plackett–Burman

การนำไปใช้ประโยชน์

๑. สามารถนำไปสอนในวิชาอื่นๆที่เกี่ยวข้อง เช่น ชว ๔๖๒ จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม

๒. สามารถนำไปใช้ในวิชา วท ๔๙๘ การเรียนรู้อิสระ ในการทำวิจัยของนักศึกษาสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(นางสาวศรีกาญจนา คล้ายเรือง)

...../...../.....

ความคิดเห็นของผู้บังคับบัญชาชั้นต้น (ประธานหลักสูตร/เลขานุการคณะ/หัวหน้างาน)

.....

.....

.....

(อ.ดร.มุจลินทร์ ผลจันทร์)

ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม

(อ.ดร.มุจลินทร์ ผลจันทร์)

...../...../.....

ความคิดเห็นของคณบดีคณะวิทยาศาสตร์หรือผู้แทน

.....

.....

.....

(.....)

...../...../.....

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคน *Parmotrema* sp.

Screening for antibacterial activities of lichen-associated bacteria isolated from *Parmotrema* sp.

วัชราภรณ์ พันชัย[1] สุรีย์พร เจริยงประเสริฐ[1] ปิยะนุช เนียมทรัพย์[1] และ **ศรีกาญจนา คล้ายเรือง**[1*]

Watcharaporn Panchai[1] , Sureeporn Jariangprasert[1] , Piyanuch Niamsup[1] and **Srikanjana Klayraung**[1*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนจีนัส *Parmotrema* sp. โดยแยกเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนได้ทั้งสิ้น 50 ไอโซเลต จากไลเคน 6 ตัวอย่าง นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเบื้องต้นต่อแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี spot on lawn พบว่ามีแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนจำนวน 10 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง ด้วยวิธี Agar well diffusion assay พบว่า มีแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* จากลำดับเบสของยีน 16S rRNA แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนจำนวน 9 ไอโซเลต จัดอยู่ในจีนัส *Bacillus* ประกอบด้วย *B. velezensis,B. pumilus, B. safensis, B. invictae* และ *B. megaterium* ส่วนอีก 1 ไอโซเลต จำแนกเป็น *Lysinibacillus fusiformis*

ABSTRACT

The objective of this study was to screen for the antibacterial activities against pathogenic bacteria of lichen-associated bacteria isolated from *Parmotrema* sp. Total of fifty bacterial isolates were obtained from six lichen samples. Their antibacterial activity against *Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* was preliminary performed by the spot on lawn method. It was found that ten isolates exhibited the antagonistic activity against *S. aureus*. Cell free supernatant of these bacteria were then investigated the antibacterial activity by agar well diffusion method. Only three isolates of genus *Bacillus* expressed the inhibitory effect on *S. aureus* growth. According to 16S rRNA base sequencing, nine isolates of lichen-associated bacteria were characterized into the genus *Bacillus* comprising of *B. velezensis, B. pumilus, B. safensis, B. invictae* and *B. megaterium* and another isolate was identified as *Lysinibacillus fusiformis*.

Key Words: lichen, lichen-associated bacteria, antibacterial activity

* Corresponding author; e-mail address: s.klayaraung@gmail.com

[1] สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[1] Division of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiangmai 50290

คำนำ

ไลเคน (Lichen) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่สามารถเจริญเติบโตอยู่บนพื้นที่เกาะอาศัย (substrate) ในธรรมชาติได้อย่างหลากหลาย เกิดจากการอยู่ร่วมกัน (symbiosis) ของรา (fungi) และสาหร่ายสีเขียว (green algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) (ขวัญุเรือน, 2558) นอกจากสิ่งมีชีวิต 2 กลุ่มนี้ในโครงสร้างของไลเคนยังมีรายงานการพบแบคทีเรียที่อยู่ร่วมด้วยในกลุ่มของ Acetobacteriaceae, Acidobacteriaceae และ Alphaproteobacteria ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Hodkinson and Lutzuni, 2009; Selbmann et al., 2010) สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกมีรายงานการตรวจพบแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนในกลุ่มของ *Bacillus*, *Paenibacillus* และ *Lysinibacillus* เป็นต้น (Selbmann et al., 2010; Ge et al., 2015) รวมทั้งมีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว เช่น ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ*Pseudomonas aeruginosa* (Kim et al., 2013; Kim et al., 2014) ซึ่งในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ โดยเฉพาะใน อำเภอเชียงดาว ซึ่งมีอากาศเย็น และมีการปลูกต้นยางพาราอย่างกว้างขวาง สามารถพบไลเคนบนต้นยางพาราในปริมาณมาก ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแหล่งที่มีปริมาณมากพอที่สามารถนำมาแยกแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนสกุล *Parmotrema* sp. จากสวนยางพาราใน อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ และทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียดังกล่าว โดยหวังว่าจะเป็นแหล่งจุลินทรีย์ใหม่เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคน

เก็บตัวอย่างไลเคนในสกุล *Parmotrema* sp. จากสวนยางพารา ในอำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งอาศัยข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีเบื้องต้น (สุรีย์พร, 2557) ในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนทำโดยนำไลเคนมาล้างด้วยน้ำประปาแบบไหลผ่าน แช่ไว้ 10 นาที จากนั้นฟอกด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจาก Selbmann และคณะ (2010) โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (0.85% NaCl) 3 ครั้ง นำ 0.85% NaCl ที่ล้างไลเคนครั้งสุดท้าย มา Spread บนอาหาร Nutrient Agar (NA) เพื่อยืนยันการฆ่าเชื้อพื้นผิว จากนั้นนำชิ้นส่วนของไลเคนที่ผ่านการล้างมาบดในโกร่งบดให้ละเอียด เจือจางไลเคนด้วย 0.85% NaCl ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม นำมา Spread บนอาหาร NA, King's medium B agar (KB), Tryptic Soy Agar (TSA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำให้บริสุทธิ์โดยการ Streak ลงบนอาหาร เก็บเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ใน TSA slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บใน glycerol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4212, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* DMST 8840 และ *Listeria monocytogenes* DMST 17303

2.1 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี Spot on lawn method

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากไลเคนมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth (NB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร Brain Heart Infusion broth (BHI) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมาปรับปริมาณของเชื้อด้วย 0.85% NaCl วัดความขุ่นความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าความขุ่น 0.10 จากนั้นนำมา Swab บนอาหาร Nutrient agar (NA) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที นำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนที่เตรียมไว้ข้างต้น ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร NA ที่มีเชื้อแบคทีเรียก่อโรค จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค จากการเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียจากไลเคนที่เจริญ

2.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยวิธี Agar well diffusion

นำเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเมื่อทดสอบด้วยวิธี spot on lawn มาเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนใสมากรองผ่านเมมเบรนปลอดเชื้อขนาด 0.22 ไมครอน เตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบนอาหาร NA ด้วยวิธีเดียวกับในข้อ 2.1 และเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นหลุมด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วนำส่วนใสที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมลงในหลุมที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการเกิดบริเวณใส และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้นโดยรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนโดยเทคนิคอณูชีววิทยา

นำเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนที่บริสุทธิ์เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BHI แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหาร BHI โดยการนำไปปั่นเหวี่ยง 10000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ใช้ตะกอนเซลล์แบคทีเรียมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Taiwan) จากนั้นนำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) ด้วยเครื่อง PCR Mastercycler Cycler-25 (Major Science, USA โดยใช้ primer คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCRCCGCA-3') (Integrated DNA Technologies, Singapore) จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis จากนั้นนำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rRNA ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ส่งไปหาลำดับเบส ที่ FirstBASE Laboratories ณ ประเทศมาเลเซีย และนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคน และการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

ผลของการแยกแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนจากสวนยางพาราในอำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากไลเคนได้จำนวน 50 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน 47 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน 3 ไอโซเลต

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคน

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนจากสวนยางพาราในอำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 50 ไอโซเลตในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 4 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี spot on lawn บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนจำนวน 10 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* โดยตรวจพบการเกิดบริเวณยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย มีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนความกว้างของบริเวณใสต่อโคโลนีอยู่ในช่วง 1.46-2.49 (**Table 1**) อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากไลเคนไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E.coli*, *L. monocytogenes* และ *P. aeruginosa* ซึ่งแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* อยู่ในจีนัส *Bacillus* จำนวน 9 ไอโซเลต และ *Lysinibacillus* จำนวน 1 ไอโซเลต (**Table 2**) โดยเป็นเชื้อ *Bacillus* ที่สามารถระบุว่าอยู่ในสปีชีส์ *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. invictae* และ *B. megaterium*

Table 1 Inhibitory effects on *S. aureus* of lichen-associated bacteria according to spot on lawn assay

Bacterial isolate	Ratio of diameter of inhibition zone to diameter of colony
LC43	1.7 ± 0.2
LC70	1.5 ± 0.5
LC83	1.6 ± 0.2
LC97	2.1 ± 0.4
LC98	2.2 ± 0.5
LC101	1.8 ± 0.3
LC102	2.5 ± 0.1
LC105	2.1 ± 0.0
LC107	1.5 ± 0.1
LC114	1.9 ± 0.6

*mean ± SD; - = no inhibition zone

จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากการทดสอบด้วยวิธี spot on lawn มาทดสอบต่อด้วยด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้น้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์ ที่เพาะเลี้ยงนาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่ามีน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus* sp. LC43, *Bacillus pumilus* LC97 และ *Bacillus safensis* LC98 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 8.10-11.65 มิลลิเมตร (**Table 3**) โดยเชื้อแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคมากที่สุด

คือ *Bacillus* sp. LC43 ที่เวลา 72 ชั่วโมงซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งอยู่ระหว่าง 10.92-11.65 มิลลิเมตร

Table 2 Identification of lichen-associated bacteria by 16S rRNA genes

Bacterial isolate	Most related sequence	Size (bp)	Accession no.	%Homology
LC43	*Bacillus* sp.	1075	KP119610	99%
LC70	*Bacillus velezensis*	1175	KX673635	99%
LC83	*Bacillus pumilus*	1180	KR010180	99%
LC97	*Bacillus pumilus*	1180	CP012330	99%
LC98	*Bacillus safensis*	1180	JF411308	99%
LC101	*Bacillus pumilus*	1180	KX426046	100%
LC102	*Lysinibacillus fusiformis*	1180	KR055033	100%
LC105	*Bacillus safensis*	1180	KX694275	99%
LC107	*Bacillus invictae*	1180	KT719707	100%
LC114	*Bacillus megaterium*	1180	KX350034	99%

Table 3 Antibacterial activity against *S.aureus* of cell free supernatant of lichen-associated bacteria by agar well diffusion method

Bacteria	Diameter of inhibition zone (mm)*		
	24 h	48 h	72 h
Bacillus sp. LC43	-	8.4 ± 0.7	11.4 ± 0.4
Bacillus sp. LC97	-	-	8.7 ± 0.8
Bacillus pumilus LC98	-	8.3 ± 0.2	-

*mean ± SD; - = no inhibition zone

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคน *Parmotrema* sp. ที่เจริญบนต้นยางพารา พบเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งจากงานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนที่มีมาก่อนหน้านี้ มีรายงานการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Pseudomonas, Burkholderia, Sphingomonas* และแบคทีเรียในกลุ่ม Proteobacteria อื่นๆ ทั้งจากงานวิจัยที่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และงานวิจัยที่ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (Selbmann et al., 2010; Kim et al., 2014; Sigurbjörndóttir et al., 2016) สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรายงานการศึกษาอย่างละเอียด คือ จากงานวิจัยของ Ge et al.(2015) ซึ่งได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับ *Bacillus* พบเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus, Paenibacillus, Brevibacillus, Lysinibacillus* และ *Viridibacillus* อยู่ที่พื้นผิว และภายในไลเคนที่เก็บจากเทือกเขา Wuyi ในประเทศจีน

ส่วนฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนในงานวิจัยนี้พบว่าจากขั้นตอนการทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี spot on lawn พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ยับยั้งได้อยู่ในสกุล *Bacillus* และ *Lysinibacillus* โดยยับยั้งได้เฉพาะ *S. aureus* เท่านั้น ซึ่งจากรายงานการวิจัยที่พบก่อนหน้ามีเพียงงานวิจัยของ Kim et al. (2014) ที่รายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคน พบว่าสารสกัดจาก *Sphingomonas* และ *Burkholderia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียลบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* และ *Escherichia coli* ได้ด้วย สำหรับฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* นั้น จากรายงานของ Sanders และคณะ (2003) พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะในกลุ่มของเพปไทด์ได้หลากหลายชนิดซึ่งจัดว่าเป็นสารทุติยภูมิที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้น มีฤทธิ์กว้างในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ที่น้ำเลี้ยงเชื้ออายุ 48-72 ชั่วโมง ที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดี แต่ยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมคือ *S. aureus* เท่านั้น

จากผลการทดลองในส่วนของการทดสอบด้วยวิธี spot on lawn เมื่อเทียบกับ agar well diffusion จะเห็นได้ว่ามีแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคนเพียง 3 ไอโซเลตเท่านั้นที่น้ำเลี้ยงเชื้อที่ยังคงแสดงฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* อยู่ ในประเด็นนี้จากงานวิจัยของ Ramírez et al. (2015) ได้วิเคราะห์ไว้ว่า rhizobacteria จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture แต่เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อ rhizobacteria มาทดสอบฤทธิ์กลับลดลง หรือหายไปเช่นกัน เนื่องจากในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวในลักษณะของ axenic culture เชื้อแบคทีเรียไม่ได้อยู่ในสภาวะแข่งขันกับสิ่งมีชีวิตอื่นจึงทำให้ไม่มีความจำเป็นในการผลิตสารเมแทบอไลท์ นั้นออกมา

สรุป

แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคน *Parmotrema* sp. มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ โดยมี 3 ไอโซเลตในสกุลของ *Bacillus* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจากการทดสอบทั้ง 2 วิธี ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาในรายละเอียดของกลไก และปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องในการผลิตสารออกฤทธิ์ดังกล่าว จึงถือได้ว่าไลเคนเป็นแหล่งทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เภสัชกรรม และอุตสาหกรรมได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนทุนวิจัย (มจ.1-59-071)

เอกสารอ้างอิง

ขวัญเรือน นาคสุวรรณ์กุล. 2558. อนุกรมวิธานของไลเคน. บริษัท ศิริภัณฑ์ (2497) จำกัด, ขอนแก่น.

สุรีย์พร เจรียงประเสริฐ. 2557. ไลเคนเบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

Ge, C., B. Liu, J. Che, M. Chen, G. Liu, G. and J. Wei, J. 2015. Diversity of *Bacillus* species inhabiting on the surface and endophyte of lichens collected from Wuyi Mountain. **Wei Sheng Wu Xue Bao** 55: 551-563.

Hodkinson, B. P. and F. Lutzoni. 2009. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. **Symbiosis** 49: 163-180.

Kim, M.K., H. Park and T.J. Oh. 2013. Antimicrobial properties of the bacterial associates of the Arctic lichen *Stereocaulon* sp. **African Journal of Microbiology Research**, 7: 3651-3657.

Kim, M.K., H. Park and T.J. Oh. 2014. Antibacterial and antioxidant capacity of polar microorganisms isolated from Arctic lichen *Ochrolechia* sp. **Polish Journal of Microbiology** *63*: 317-322.

Ramírez, R., M. Arias, J. David, J.C. Bedoya, L. Rueda, E. Antoni and S. David. 2015. Metabolites produced by antagonistic microbes inhibit the principal avocado pathogens *in vitro*. **Agronoma Colombiana** 33: 58-63.

Sanders, M., L. Morelli and T. Tompkins. 2003. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** *2*: 101-110.

Selbmann, L., L. Zucconi, S. Ruisi, M. Grube, M. Cardinale and S.Onofri, S. 2010. Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance. **Polar Biology**, 33: 71-83.

Sigurbjörnsdóttir, M. A., Ó. S. Andrésson, M. Grube and O. Vilhelmsson. 2016. Nutrient scavenging activity and antagonistic factors of non-photobiont lichen-associated bacteria: a review. **World Journal of Microbiology Biotechnology** 32: doi: 10.1007/s11274-016-2019-2.

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ คณะวิทยาศาสตร์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม โทร.๓๘๗๐-๒
ที่ ศธ ๐๕๒๓.๔.๔.๓/๒๐๕ **วันที่** ๒๒ ธันวาคม ๒๕๕๙
เรื่อง ขออนุญาตเข้าร่วมการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๕๕ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พร้อมเสนอผลงานวิจัย

เรียน คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

ตามหนังสือที่ ศธ ๐๕๒๓.๑๐๘๐๑/ว ๒๙๓๕ ลงวันที่ ๔ ตุลาคม ๒๕๕๙ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จะจัดให้มีการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๕๕ (The ๕๕th Kasetsart University Annual Conference) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้นักวิชาการและคณาจารย์จากสาขาต่างๆ นำเสนอผลงานวิจัย และเพื่อแลกเปลี่ยนความคิดเห็น ประสบการณ์ และความชำนาญ ระหว่างนักวิชาการ อาจารย์ของภาครัฐและเอกชน ซึ่งจะนำไปสู่แนวทางการวิจัยเพื่อการพัฒนาประเทศ ในระหว่างวันที่ ๓๑ มกราคม – ๓ กุมภาพันธ์ ๒๕๖๐ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร และได้ตอบรับให้ข้าพเจ้าเข้าร่วมเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ หัวข้อเรื่อง "การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไลเคน *Parmotrema* sp." นั้น

ในการนี้ ข้าพเจ้า จึงขออนุญาตเข้าร่วมการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๕๕(The ๕๕th Kasetsart University Annual Conference) ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พร้อมเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ ตามวัน และสถานที่ดังกล่าว

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุญาต

(นางสาวศรีกาญจนา คล้ายเรือง)
ตำแหน่ง อาจารย์

(อาจารย์ ดร.มุจลินทร์ ผลจันทร์)
ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม