

การศึกษา *Streptomyces* sp. WPN31 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นเตยหอม (*Pandanus amaryllifolius*): การสร้างเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไซลานเนส และการตรวจสอบคุณสมบัติการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

**The study of *Streptomyces* sp. WPN31 isolated from the rhizosphere of pandanus palm: Amylase, cellulase, and xylanase production, and investigation of antibiofilm properties**

วรรณิกา ปะนา<sup>1</sup>, พงศกร กันทะ<sup>1</sup>, นภัตสร สันตะพันธ์<sup>1</sup>, วิศรุต ศรีศักดิ์วารังกูร<sup>1</sup> และ นวรัตน์ นันทพงษ์<sup>1\*</sup>  
Wannika Pana<sup>1</sup>, Phongsakorn Ganta<sup>1</sup>, Napatsorn Santapan<sup>1</sup>, Wissarut Srisakvarangkool<sup>1</sup>  
and Nawarat Nantapong<sup>1\*</sup>

Received: 1 September 2023 ; Revised: 2 January 2024 ; Accepted: 15 January 2024

### บทคัดย่อ

ไบโอฟิล์มเป็นสารที่ซับซ้อน ซึ่งหลั่งออกมาจากเชื้อจุลินทรีย์และสามารถเกาะติดกับพื้นผิวได้ ก่อให้เกิดการปนเปื้อนในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต สิ่งแวดล้อม โรงงานอุตสาหกรรม และอุปกรณ์ทางการแพทย์ และยังเป็นปัจจัยที่สำคัญในการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* sp. WPN31 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นเตยหอม ในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไซลานเนส และการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก่อโรค โดยผลของยีน *16S rRNA* พบว่า WPN31 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces griseicoloratus* (ร้อยละ 98.90) มากที่สุด ซึ่งเป็น streptomycetes สปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากดินในไร่ฝ้าย สาธารณรัฐประชาชนจีน อย่างไรก็ตาม พบว่า *Streptomyces* sp. WPN31 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นอกเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไซลานเนส ได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส และจากการประเมินการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้สารส่วนเหนือตะกอนของ WPN31 พบว่า ส่วนเหนือตะกอนมีประสิทธิภาพในการป้องกันการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ดังนั้น การศึกษานี้จึงเป็นการรายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้งไบโอฟิล์มของ *Streptomyces* sp. WPN31 ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่หลากหลายได้

คำสำคัญ: ดินบริเวณรากพืช, *Streptomyces*, การยับยั้งไบโอฟิล์ม, เอนไซม์นอกเซลล์

### Abstract

Biofilms are complex substances secreted by microorganisms, capable of adhering to various surfaces, leading to contamination of living tissues, environments, industrial settings, and medical equipment. They play a significant role in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. This study aimed to evaluate the production of the enzymes amylase, cellulase, and xylanase, as well as the antibiofilm activity against pathogenic bacteria of *Streptomyces* sp. WPN31, isolated from the rhizosphere of pandanus palm (*Pandanus amaryllifolius*). Based on the *16S rRNA* results, WPN31 exhibited the highest similarity to *Streptomyces griseicoloratus* (98.80%), a novel streptomycete isolated from soil in cotton fields of China. However, *Streptomyces* sp. WPN31 was able to produce extracellular enzymes, including amylase, cellulase, and xylanase, at both 37 °C and 40 °C. The evaluation of biofilm inhibition using WPN31 supernatant revealed its ability to prevent biofilm formation in both *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, this study represents the initial report on the antibiofilm activity of *Streptomyces* sp. WPN31, suggesting its potential application in various industries.

**Keywords:** Rhizosphere, *Streptomyces*, Antibiofilm, Extracellular enzymes

<sup>1</sup> สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา, 30000, ประเทศไทย

<sup>1</sup> School of Preclinical Sciences, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

\* Corresponding author; Nawarat Nantapong: nawarat@sut.ac.th

## บทนำ

จุลินทรีย์บริเวณรากพืช (rhizosphere microorganisms) คือจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืชหรือส่วนของดินที่สัมผัสกับรากพืช ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดและอยู่ร่วมกับพืช (Li *et al.*, 2022) จึงเป็นบริเวณของดินที่มีความหลากหลายของจุลินทรีย์สูงกว่าบริเวณอื่นๆ กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญและเป็นกลุ่มใหญ่ที่สุด คือจีส Streptomyces ซึ่งจุลินทรีย์บริเวณรากพืชมีบทบาทในการเจริญเติบโตของพืชโดยมีส่วนช่วยในการพัฒนาพืช กระตุ้นให้มีความต้านทานโรคพืชและทนต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมได้ (Mendes *et al.*, 2018; Newitt *et al.*, 2019)

จีส Streptomyces เป็นแอคติโนแบคทีเรียที่ใหญ่ที่สุดในออคเตอร์ Actinomycetales และแฟมมีลี Streptomycetaceae ซึ่ง Streptomyces เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ต้องการออกซิเจน มีปริมาณเบส GC ใน DNA ประมาณร้อยละ 69-78 และสามารถสร้างเส้นใยได้โดยทั่วไป Streptomyces มีแหล่งที่อยู่อาศัยที่หลากหลาย เช่น ทะเลทราย ทะเล พืช แมลง น้ำแข็ง และดิน (Donald *et al.*, 2022) Streptomyces มีบทบาทในการหมุนเวียนของสารอินทรีย์ในธรรมชาติ เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์นอกเซลล์ และสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างหลากหลาย (Chater, 2016; Olanrewaju & Babalola, 2019) ในปัจจุบันการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างเกินความจำเป็นและไม่ถูกต้องก่อให้เกิดปัญหา การเกิดขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต่อต้านยาปฏิชีวนะแบบเก่า ทำให้เกิดความล้มเหลวในการรักษาโรคติดเชื้อ (Chanvatik *et al.*, 2019; Pumtong *et al.*, 2020) รวมถึงความสามารถที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถสร้างไบโอฟิล์มก็จัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เชื้อมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (Sharma *et al.*, 2019)

แบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดมีความสามารถในการอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มกับเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นได้ และมีความสามารถในการสร้าง Extracellular Polymeric Matrix (EPS) เรียกว่าไบโอฟิล์ม (Leetanasaksakul & Thamchaipenet, 2018) ซึ่งมีองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และกรดนิวคลีอิก โดยองค์ประกอบและปริมาณของไบโอฟิล์มแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ สภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย อุณหภูมิ ความเป็นกรดเบส (pH) ระดับออกซิเจน ระดับไนโตรเจน อายุของไบโอฟิล์ม และปริมาณของสารอาหาร (Alotaibi, 2021; Srinivasan *et al.*, 2021)

การก่อตัวของไบโอฟิล์ม สามารถเกิดขึ้นได้บนพื้นผิวของสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต เช่น บนพื้นผิวอุปกรณ์ครัวเรือนในห้องน้ำ อ่างล้างหน้า และท่อส่งน้ำ รวมถึงในด้านการแพทย์ไบโอฟิล์มสามารถก่อตัวได้ในอุปกรณ์ทางการแพทย์สำหรับ

การปลูกถ่ายอวัยวะ เช่น ลิ้นหัวใจเทียม สายสวน เครื่องกระตุ้นหัวใจ และข้อต่อเทียม (Balasubramanian *et al.*, 2017) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ กระดูกอักเสบ โรคหูน้ำหนวกอักเสบเรื้อรัง แผลในทางเดินอาหาร การติดเชื้อในปอดเรื้อรัง และการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (Oberoi *et al.*, 2020) เชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำคัญที่สร้างไบโอฟิล์มได้ เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถก่อโรคในมนุษย์ได้ (Vestby *et al.*, 2020) และแม้จะมีการใช้วิธีที่หลากหลายในการควบคุมและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม แต่ก็ยังคงเป็นเรื่องยากที่จะสามารถกำจัดไบโอฟิล์มให้หมดได้ เมื่อแบคทีเรียก่อโรคอยู่ในสภาวะที่มีการสร้างไบโอฟิล์ม แบคทีเรียก่อโรคจะมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมภายนอกที่ไม่เหมาะสม เช่น ยาปฏิชีวนะ สารเคมี และยาฆ่าเชื้อ (Srinivasan *et al.*, 2021)

มีการศึกษาเชื้อในกลุ่ม actinomycetes ที่มีความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Actinomycete* TRM 46200, TRM 41337 และ TRM 46814 สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* โดยไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อที่อยู่ในสภาวะลอยไปมาอย่างอิสระ (planktonic cells) (Xie *et al.*, 2019) สารสกัดที่ได้จากเชื้อ *Streptomyces viridochromogene* NBRC 3113 และ *Streptomyces levis* NRRL B-16370 สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* และ *Enterobacter* (Oberoi *et al.*, 2020) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ มาช่วยในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยมีรายงานการศึกษาการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาลเนส ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* (Kamali *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2018) และโครงสร้างของไบโอฟิล์มสามารถถูกทำลายได้จากเอนไซม์อะไมเลสและโปรตีเอส (Solihin *et al.*, 2021) และเนื่องจากเอนไซม์สามารถย่อยสลายตามธรรมชาติได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้เอนไซม์ จึงเป็นวิธีการที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ในการควบคุมหรือทำลายไบโอฟิล์ม (Y. Li *et al.*, 2022; Solihin *et al.*, 2021) ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเอนไซม์นอกเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาลเนส จากเชื้อจุลินทรีย์และนำไปตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ของ *Streptomyces* sp. WPN31 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นเตยหอม และตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาลเนส และการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* และ *P. aeruginosa*

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

### 1. แบคทีเรียก่อโรค

เชื้อที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถของ *Streptomyces* sp. WPN31 ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม คือ *S. aureus* ATCC29213 ที่ได้รับจาก American Type Culture Collection (ATCC) และ *P. aeruginosa* TISTR1287 ที่ได้รับจาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

### 2. การแยกเชื้อ *Streptomyces* sp. WPN31 จากดิน

*Streptomyces* sp. WPN31 ถูกแยกมาจากการสุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากต้นเตยหอมจากสวนพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บตัวอย่างที่อยู่ลึกลงไปจากผิวดินประมาณ 10 เซนติเมตร นำแต่ละตัวอย่างดิน จำนวน 1 กรัม ละลายลงในน้ำเกลือปลอดเชื้อที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร และทำการเจือจางสารละลายครั้งละ 10 เท่าของสารละลายเดิม (10-fold serial dilution) นำระดับความเจือจาง ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) ที่ต้องการมาทำให้เชื้อกระจายตัว (spread plate) โดยนำสารละลายเชื้อ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปล่อยลงบนอาหารแข็ง International *Streptomyces* Project 2 (ISP2) ที่ประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) และน้ำตาลเดกซ์โทรส (dextrose) ทำการบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 7-10 วัน จากนั้นจึงแยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Streptomyces* sp. WPN31 ให้บริสุทธิ์ โดยย้ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 agar อีกครั้ง (Tan *et al.*, 2018) เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วจึงทำการเก็บรักษาใน glycerol ร้อยละ 40 ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาในอนาคต

### 3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Streptomyces* sp. WPN31

ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการเลี้ยง *Streptomyces* sp. WPN31 บนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นสังเกตและบันทึกข้อมูลของลักษณะเส้นใยสีของโคโลนี การสร้างเม็ดสี และพื้นผิวของโคโลนี

### 4. การระบุสายพันธุ์ด้วยการหาลำดับเบสของยีน *16S rRNA*

#### 4.1 การเตรียมแม่แบบ DNA

เพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. WPN31 ในอาหารเหลว ISP2 เป็นเวลา 3 วัน จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนของเหลวด้านบนออก ทำการเก็บกลุ่มเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่ที่ด้านล่างของหลอด นำกลุ่มเซลล์ไปบดให้แตกโดยใช้ lysis buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นย้ายส่วนของสารแขวนลอยไปยังหลอดใหม่

และเติม 5M NaCl ปริมาตร 165 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ส่วนของเหลวเหนือตะกอนจะถูกย้ายไปยังหลอดใหม่ และเติม chloroform:isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 1:1 ผสมสารแขวนลอยจนกระทั่งสารละลายกลายเป็นสีนํ้านม นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ย้ายสารแขวนลอยชั้นบนไปยังหลอดใหม่และเติม chloroform ในอัตราส่วนที่เท่ากับสารแขวนลอย ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ส่วนของสารแขวนลอยที่มีจีโนมดีเอ็นเอจะถูกย้ายไปยังหลอดใหม่และถูกตกตะกอนด้วย ethanol ร้อยละ 95 โดยบ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ล้างจีโนมดีเอ็นเอด้วย alcohol ร้อยละ 75 และละลายจีโนมดีเอ็นเอในน้ำที่ปราศจากนิวคลีเอส และใช้เป็นแม่แบบดีเอ็นเอสำหรับการเพิ่มจำนวนยีน *16S rRNA*

#### 4.2 การเพิ่มจำนวนยีน *16S rRNA* ด้วยวิธี PCR

จีโนมดีเอ็นเอจะถูกใช้เป็นแม่แบบสำหรับการทำ Polymerase chain reaction (PCR) ของยีน *16S rRNA* โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3') โดยมีเงื่อนไขการทำปฏิกิริยาภายในเครื่อง thermal cycler ดังนี้: initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 25 รอบ ของ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของ PCR โดยวิธี gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด FavoritePrep™ GEL/PCR (Favorgen Biotech, Taiwan) (Chanhasena *et al.*, 2022)

#### 4.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *16S rRNA* และการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

ยีน *16S rRNA* บริสุทธิ์จะถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท ACTG จำกัด (ประเทศไทย) และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลผ่านเว็บไซต์ EzBiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) โดยใช้ BLAST program จากนั้นนำข้อมูลที่ไปจัดลำดับตามตำแหน่งที่คล้ายคลึงกันของลำดับเบสของสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันจาก EzBiocloud โดยการใช้เมนู CLUSTAL W และสร้างต้นไม้สายวิวัฒนาการโดยใช้ซอฟต์แวร์ MEGA เวอร์ชัน 11 โดยประเมินระดับความเชื่อมั่นโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติและสร้างค่าสนับสนุน (bootstap value) ที่ 1000 ซ้ำ

## 5. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนส

เพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. WPN31 แบบการลงเชื้อตำแหน่งเดียว (point inoculation) บนอาหารแข็งที่เติมแหล่งคาร์บอนหลักชนิดต่างๆ ได้แก่ แป้ง เซลลูโลส หรือไซแลน เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อในการใช้แหล่งคาร์บอนเหล่านี้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์และย่อยสลายแหล่งคาร์บอนในอาหารแข็ง จะสังเกตได้จากการสร้างบริเวณใส (clear zone) หลังจากการหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารที่มีส่วนประกอบของแป้ง และหยดสี congo red ลงบนอาหารที่มีส่วนประกอบของไซแลนและเซลลูโลส (de Veras *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2019; Viswanathan & Rebecca, 2019) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ *Streptomyces* sp. WPN31 สร้างขึ้นและขนาดของโคโลนีและบันทึกผลการทดลอง

## 6. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

### 6.1 การเตรียมส่วนเหนือตะกอน (supernatant)

เพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. WPN31 ในอาหารเหลว ISP2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 (WhatmanTM, GE Healthcare, UK) เพื่อกำจัดส่วนของตะกอนเซลล์ (cell pellet) และนำส่วนเหนือตะกอนไปใช้ในการศึกษาต่อไป

### 6.2 การทดสอบการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

การศึกษานี้ใช้ส่วนเหนือตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. WPN31 ในการทดสอบการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* และ *P. aeruginosa* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller Hinton (MH) ที่ประกอบด้วย สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) เคซีนไฮโดรไลสเสต (casein hydrolysate) และแป้ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียไปเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland ก่อนจะนำไปใช้ในการทดสอบ โดยผสมสารละลายเชื้อแบคทีเรียกับส่วนเหนือตะกอน ในอัตราส่วน 1:1 ในเพลท 96 หลุม (96 well plate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการบ่ม สารละลายในเพลท 96 หลุมจะถูกเทออกและล้างด้วยน้ำกลั่น ทั้งไว้ให้แห้งก่อนที่จะย้อมด้วยสี crystal violet ร้อยละ 0.4 โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น ทั้งไว้ให้แห้ง จะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595) โดยการหยด ethanol ร้อยละ 95 เพื่อชะสีที่ติดอยู่กับเซลล์แบคทีเรียออกมา บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำไปคำนวณค่าร้อยละของการสร้างไบโอฟิล์ม (Leetanasaksakul & Thamchaipenet, 2018) ตามสมการต่อไปนี้

ร้อยละการสร้างไบโอฟิล์ม =

$$\frac{A595 \text{ หลุมควบคุม} - A595 \text{ หลุมทดสอบ}}{A595 \text{ หลุมควบคุม}} \times 100$$

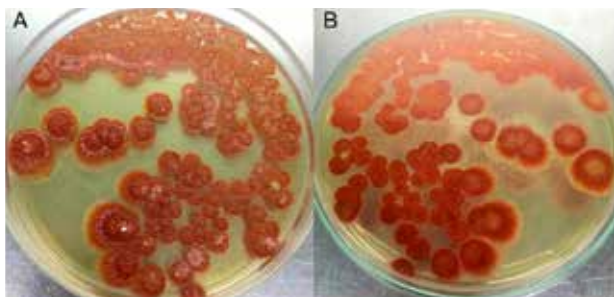
## ผลการวิจัยและอภิปรายผล

### การแยกเชื้อ *Streptomyces* sp. WPN31 จากดินบริเวณรากต้นเตยหอม

เชื้อ *Streptomyces* sp. WPN31 ที่ใช้ในการศึกษานี้ถูกแยกได้จากดินบริเวณรากต้นเตยหอม (*Pandanus amaryllifolius*) จากสวนพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยต้นเตยหอมเป็นพืชเมืองร้อน ส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้เป็นสีจากธรรมชาติ แต่งกลิ่น และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา (Lomthong *et al.*, 2022) เชื้อจุลินทรีย์บริเวณรากพืชมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญของพืช การควบคุมโรคพืช และช่วยรักษาสมดุลของระบบนิเวศ ทางเภสัช (Y. Li *et al.*, 2022) มีรายงานเกี่ยวกับการแยกเชื้อในจีนัส *Streptomyces* บริเวณรากพืชที่สามารถสร้างสารต้านจุลชีพหรือสร้างฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญของพืช เช่น การแยกเชื้อจากต้น *Artemisia herba-alba* ซึ่งสามารถผลิตสารต้านเชื้อรา (antifungal) สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Djemouai *et al.*, 2022) หรือสารช่วยส่งเสริมการเจริญของถั่วเขียว และสารต้านเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Nonthakaew *et al.*, 2022) และยังมีรายงานการค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินบริเวณที่ปลูกต้นเตยหอมที่สามารถสร้างสารต้านเชื้อราได้ (Khamna *et al.*, 2009) เป็นต้น

ในการแยกเชื้อ *Streptomyces* sp. WPN31 จากดินบริเวณรากพืช จะใช้อาหาร ISP2 สำหรับการเลี้ยงเชื้อและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยทำการเลือกโคโลนีของ streptomycetes ตามลักษณะสัณฐานวิทยาที่บรรยายในหนังสือ Bergey's Manual of determinative bacteriology (Holt *et al.*, 1994) ได้แก่ โคโลนีมีลักษณะแข็ง ผังตัวลงไปในชั้นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ผิวหน้าแห้งแตก มีรอยย่นหรือมีขุยฟูที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า นอกจากนี้เชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* ยังมีลักษณะการพัฒนาของโคโลนีที่ช้า มีความต้องการออกซิเจน สร้างสปอร์ สร้างเส้นใยที่สัมผัสอากาศ (aerial mycelium) และเส้นใยที่เจริญเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (substrate mycelium) มีสีแตกต่างกัน รวมถึงความสามารถในการผลิตเมดิซินีต่างๆ

ทั้งยังสามารถผลิตสารที่ชื่อว่า Geosmin ซึ่งเป็นกลิ่นไอดินที่เป็นลักษณะที่สำคัญของเชื้อในจีนัส *Streptomyces* (Alam *et al.*, 2022) หลังจากทำการเลือกโคโลนีและเลี้ยงให้บริสุทธิ์แล้วทำการตั้งชื่อสายพันธุ์ streptomycetes ที่ค้นพบว่า WPN31 ซึ่งจากการเพาะเลี้ยง WPN31 บนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ WPN31 (Figure 1) มีลักษณะพื้นผิวของโคโลนีแข็งเป็นรอยย่น มีเส้นใยอาหารเป็นสีชมพูเข้ม ไม่มีการผลิตเม็ดสีที่สามารถกระจายเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีเส้นใยอากาศเป็นสีขาว



**Figure 1** Colony morphology of *Streptomyces* sp. WPN31 in ISP2 agar with A: front and B: back mycelial images.

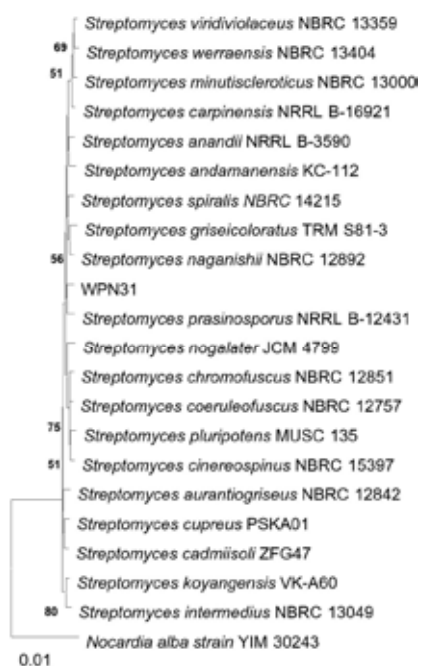
**การตรวจสอบระดับโมเลกุลของ WPN31 โดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA**

นำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ WPN31 (1424 bp) ไปเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่อยู่ในฐานข้อมูล Ezbiocloud โดยใช้ BLAST program (Table 1) ซึ่งผลการวิเคราะห์ยืนยันได้ว่า WPN31 เป็นเชื้อในจีนัส *Streptomyces* โดยมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces griseicoloratus* (ร้อยละ 98.80) มากที่สุด รองลงมาคือ *Streptomyces prasinosporus* (ร้อยละ 98.73) และ *Streptomyces anandii* (ร้อยละ 98.66) จากข้อมูลการศึกษาของ Hagstrom และคณะ (2000) รายงานว่าถ้ามีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน 16S rRNA มากกว่าร้อยละ 97 จะจัดให้อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน แต่ถ้าค่าความคล้ายคลึงอยู่ในระดับร้อยละ 93-97 จะจัดให้อยู่ในจีนัสเดียวกันแต่จะแตกต่างกันที่ระดับสปีชีส์ แต่ถ้ามีค่าน้อยกว่าร้อยละ 93 จะจัดให้เป็นจีนัสใหม่

**Table 1** List of closet strains from EzBioCloud using 16S rRNA gene database of *Streptomyces* sp. WPN31.

Hit taxon name	Similarity (%)
<i>Streptomyces griseicoloratus</i>	98.80
<i>Streptomyces prasinosporus</i>	98.73
<i>Streptomyces anandii</i>	98.66

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการ BLAST ไปสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (Figure 2) พบว่า *Streptomyces* sp. WPN31 ไม่ได้ถูกจัดให้อยู่ในสายบรรพบุรุษเดียวกันกับ *S. griseicoloratus* ที่มีค่าความคล้ายคลึงกันสูงที่สุด แต่ถูกจัดให้อยู่กับ *S. prasinosporus* ที่มีความคล้ายคลึงกันเพียงร้อยละ 98.73 ซึ่งสายพันธุ์ WPN31 อาจมีความเป็นไปได้ที่จะไม่ได้เป็นสายพันธุ์เดียวกันกับ *S. griseicoloratus* หรือ *S. prasinosporus* หรืออาจจะเป็นสายพันธุ์ใหม่ (Kurnianto *et al.*, 2020) *S. griseicoloratus* ที่มีความคล้ายคลึงกับ WPN31 มากที่สุด มีการค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 2022 โดยการแยกเชื้อจากดินในไร่ฝ้าย ในเมืองชินเจียง สาธารณรัฐประชาชนจีน ซึ่งจากรายงานวิจัยพบว่า *S. griseicoloratus* ไม่สามารถสร้างเม็ดสีที่แพร่กระจายเข้าไปในอาหารแข็ง รวมทั้งพบว่าเส้นใยอากาศเป็นสีเทา และมีเส้นใยอาหารเป็นสีเหลืองเข้มเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 (Xing *et al.*, 2022) ส่วนเชื้อ *S. prasinosporus* ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 จากดินในประเทศอินเดีย มีลักษณะเด่นคือ มีการสร้างเส้นใยอากาศเป็นสีเขียว (Tresner *et al.*, 1966) จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้น ทั้งความแตกต่างทางลักษณะสัณฐานวิทยา ค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของยีน 16S rRNA และแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ อาจจะสรุปเบื้องต้นได้ว่า *S. griseicoloratus* และ *S. prasinosporus* มีความแตกต่างจาก WPN31 จึงมีความเป็นไปได้ว่า WPN31 อาจจะเป็นสายพันธุ์ใหม่ของจีนัส *Streptomyces*

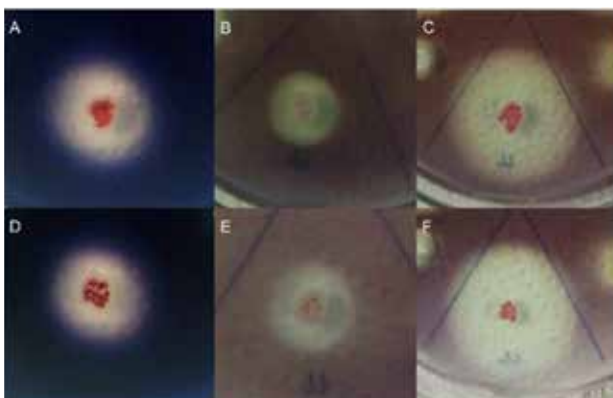


**Figure 2** Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship between related members of the genus *Streptomyces* sp. WPN31. *Nocardia alba* was used as an outgroup. Bootstrap percentages over 50% are shown at the nodes. The scale bar indicated 0.01 nucleotide substitution per nucleotide.

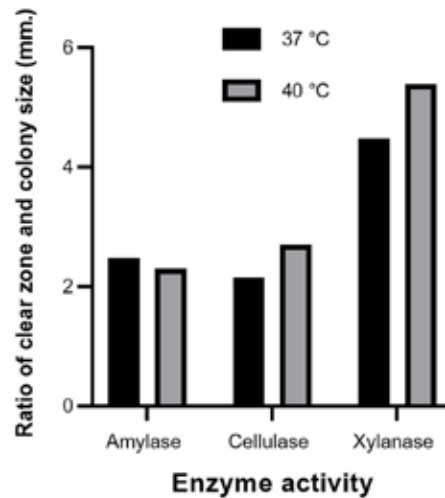
**ความสามารถของ *Streptomyces* sp. WPN31 ในการสร้าง เอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาลเลส**

การศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาลเนส โดยการลงเชื้อตำแหน่งเดียว โดยเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. WPN31 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีแหล่งคาร์บอนหลักเป็นแป้ง เซลลูโลส หรือไซแลน และบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้น หยดสารละลายไอโอดีนหรือสี congo red บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Figure 3) พบว่า *Streptomyces* sp. WPN31 สามารถผลิต เอนไซม์ย่อยสลายแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทั้งที่ อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยสังเกตได้จากการสร้าง บริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการบันทึกผลการทดลอง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของขนาดโคโลนีและบริเวณใส จาก นั้นหาค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดโคโลนีและบริเวณใสที่เกิดขึ้น (Figure 4) นอกจากนี้ เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. WPN31 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อไม่สามารถ เจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์ได้ (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง)

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* sp. WPN31 สามารถผลิตเอนไซม์ ไซลาลเนสได้สูงกว่าเอนไซม์ อื่นๆ ทั้งที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความ สอดคล้องกับ *Streptomyces fulvissimus* CKS7 ที่พบว่ามีการ ผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้สูงกว่าเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้รำข้าวสาลี รำข้าวบาร์เลย์ และรำข้าว (Mihajlovski *et al.*, 2020) และ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ 15, 18 และ 30 ที่แยกได้จากดินเกษตร มีการผลิตเอนไซม์ ไซลาลเนสได้สูงกว่าเอนไซม์เซลลูเลสในทุกช่วงเวลาของการเพาะ เลี้ยงเชื้อ (Castaneda-Cisneros *et al.*, 2020) แต่มีรายงาน ของ *Streptomyces mutabilis* ที่พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสมากกว่าเอนไซม์อะไมเลส และไม่มีการสร้างเอนไซม์ ไซลาลเนสเกิดขึ้น (Shinde. & Jadhav., 2021) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ อะไมเลส เซลลูเลส และ ไซลาลเนส ของเชื้อ *Streptomyces* sp. WPN31



**Figure 3** The clear zone of amylase activity at 37 °C and 40 °C (A and D), cellulase activity at 37 °C and 40 °C (B and E) and xylanase activity at 37 °C and 40 °C (C and F) respectively.



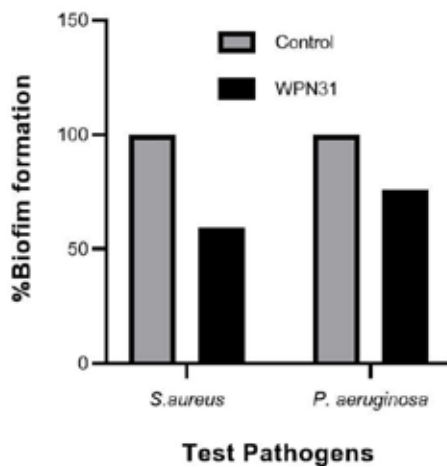
**Figure 4** The ratio of clear zone of enzyme activity and colony size at 37 °C and 40 °C. All experiments were performed in triplicate.

เป็นที่ทราบกันดีว่า *Streptomyces* ที่แยกได้จาก สิ่งแวดล้อมที่รุนแรง เป็นผู้ผลิตเอนไซม์ชนิดใหม่ที่มีศักยภาพสูง ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเอนไซม์สำคัญที่ ผลิตจากเชื้อในจีนัส *Streptomyces* ได้แก่ เอนไซม์ไซลาลเนส โคคิตเนส อะไมเลส ไลเปส คิวติเนส เพคตินเนสและเซลลูเลส (Kumar *et al.*, 2020; Mukhtar *et al.*, 2017) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการค้นพบเชื้อในจีนัส *Streptomyces* ที่สามารถ ทนร้อนได้สูงและยังผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง เช่น *Streptomyces thermocoprophilus* CP1 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และทนความร้อนได้สูงถึง 45 องศาเซลเซียส (Tingthong *et al.*, 2021) *Streptomyces* sp. MI-1 และ *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Al-Dhabi *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2022) *Streptomyces albus* และ *Streptomyces hygroscopicus* ผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสและทนความร้อนได้สูงถึง 50 องศา เซลเซียส (Priya *et al.*, 2012) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ถูกนำไปใช้ใน อุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา ผงซักฟอก และ ไปโอเอทานอล เป็นต้น (Mohammed *et al.*, 2011; Tingthong *et al.*, 2021) ดังนั้น WPN31 จึงอาจจะเป็นสายพันธุ์ใหม่ของ จีนัส *Streptomyces* ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ ทั้งสามชนิดและทนความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจจะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้

**ความสามารถของ *Streptomyces* sp. WPN31 ในการยับยั้ง การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค**

ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นไปที่การศึกษาสารประกอบที่ *Streptomyces* sp. WPN31 ปล่อยออกมาออกเซลล์ ที่ไม่มี ผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค แต่มีผลต่อ ความสามารถในการควบคุมปัจจัยอื่นๆ ในการก่อโรคที่รุนแรง

(virulence factors) เช่น การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม เนื่องจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในสภาวะไบโอฟิล์มสามารถทนต่อระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ยาปฏิชีวนะ และการรักษาด้วยวิธีอื่นๆ (Vestby *et al.*, 2020) การศึกษาการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* โดยใช้ส่วนเหนือตะกอนของ WPN31 ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าร้อยละของการสร้างไบโอฟิล์มบนเพลท 96 หลุมของสารเหนือตะกอนของ WPN31 กับชุดควบคุม จะเห็นได้ว่า เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ผสมกับส่วนเหนือตะกอน มีการสร้างไบโอฟิล์มลดลง (Figure 5) พบว่า การสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ลดลงร้อยละ 41 และ *P. aeruginosa* ลดลงร้อยละ 24



**Figure 5** Inhibition of biofilm formation by *Streptomyces* sp. WPN31 supernatant against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. All experiments were performed in triplicate.

ซึ่งการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มโดยใช้ส่วนเหนือตะกอน อาจจะเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์นอกเซลล์ เนื่องจากมีรายงาน การนำส่วนเหนือตะกอนที่สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มได้ ไปสกัดเป็นสารสกัดหยาบ พบว่าการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* หายไป แสดงว่าสารประกอบที่สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มที่อยู่ในส่วนเหนือตะกอน ซึ่งอาจเป็นสารในกลุ่มเปปไทด์หรือโปรตีนนอกเซลล์ที่เชื้อผลิตออกมา (Park *et al.*, 2012) Flemming และ Wingender (2010) รายงานว่าเอนไซม์นอกเซลล์มีบทบาทหลายอย่างที่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์ม ทั้งในด้านโครงสร้างของไบโอฟิล์มและการสื่อสารของเซลล์ภายในไบโอฟิล์ม

มีรายงานการศึกษาเอนไซม์นอกเซลล์จากเชื้อรา *Penicillium janthinellum* ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และโปรตีนเอส และพบว่าสามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* (Nagraj & Gokhale, 2018) นอกจากนี้ยังมีรายงานการสกัดเอนไซม์อะไมเลสจาก

*Streptomyces griseus* (Lakshmi *et al.*, 2022) รวมถึงการศึกษาเอนไซม์ไฮลาเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* (Lee *et al.*, 2018) สามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* และมีการศึกษาเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่มของเอนไซม์เซลลูเลส ก็พบว่าสามารถยับยั้งไบโอฟิล์มของ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ได้ (Karmakar *et al.*, 2023)

นอกจากการใช้เอนไซม์เพื่อยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มแล้ว ยังพบว่ามีรายงานการนำสารต้านจุลชีพมาใช้ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มด้วย โดยมีรายงานการใช้สารต้านจุลชีพที่สกัดจาก *Streptomyces ansochromogenes* สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรค *P. aeruginosa* (Amorim *et al.*, 2020) รวมถึงการใช้สารต้านจุลชีพจาก *Streptomyces euryhalinus* สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ได้ (Biswas *et al.*, 2021) แต่แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่าความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration หรือ MIC) เพื่อยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ก็พบว่า สารต้านจุลชีพก็ยังคงมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* (Dong *et al.*, 2012) และอาจจะชักนำให้เกิดการก่อตัวของไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งการใช้สารต้านจุลชีพในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า MIC ก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดต่อยาปฏิชีวนะได้ (Aka & Haji, 2015) และเพื่อพิสูจน์ว่าการยับยั้งไบโอฟิล์มของ *Streptomyces* sp. WPN31 ไม่ได้มีปัจจัยมาจากสารต้านจุลชีพ ผู้วิจัยจึงตรวจสอบความสามารถของสายพันธุ์ WPN31 ในการสร้างสารต้านจุลชีพและพบว่า WPN31 ไม่สามารถสร้างสารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ดังนั้นฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Streptomyces* sp. WPN31 ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* น่าจะมาจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์นอกเซลล์ (อะไมเลส เซลลูเลส และไฮลาเนส) ที่สร้างจากเชื้อ WPN31

นอกจากนี้ การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Streptomyces* sp. WPN31 ที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ได้มากกว่า *P. aeruginosa* อาจเกิดได้จากประสิทธิภาพของการผ่านของเอนไซม์เข้าไปในแบคทีเรียแกรมลบมีน้อย ซึ่งการผ่านของสารได้ต่ำนี้ ทำให้เป็นอุปสรรคในการผ่านของยาปฏิชีวนะและโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ อีกด้วย เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ มีองค์ประกอบหลักเป็นโครงสร้างของลิโปโพลีแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide หรือ LPS) ช่วยป้องกันไม่ให้โมเลกุลที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ผ่านเข้าไปได้ ซึ่งมีความแตกต่างจากโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีเพียงชั้นของเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งไม่ได้เป็นอุปสรรคในการผ่านของสารประกอบ

ต่างๆ ทำให้แบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารประกอบ  
ต่างๆ มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Kurnianto *et al.*, 2020;  
Singh *et al.*, 2014)

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* sp.  
WPN31 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบริเวณรากต้นเตยหอม  
มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรม  
ได้แก่ อะไมเลส เซลลูเลส และไซลันเนส ที่อุณหภูมิ 37 และ  
40 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม  
ที่หลากหลายได้ นอกจากนี้ *Streptomyces* sp. WPN31 ยังมี  
ประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus*  
และ *P. aeruginosa* งานวิจัยนี้จัดเป็นงานวิจัยแรกที่รายงาน  
ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Streptomyces* sp.  
WPN31

ทั้งนี้การศึกษาในอนาคตของเชื้อ *Streptomyces* sp.  
WPN31 ควรมุ่งเน้นการแยกและระบุลักษณะของสารออกฤทธิ์  
ยับยั้งไบโอฟิล์มที่หลั่งออกมาจากเซลล์

### กิตติกรรมประกาศ

This work was supported by Suranaree University  
of Technology, Thailand Science Research and Innovation  
(TSRI), and National Science, Research, and Innovation  
Fund (NSRF) (NRIIS number: 160348; Project code:  
FF1-111-65-12-10). Wannika Pana expresses her  
gratitude to Kittibuditt scholarships for the financial  
support for her tuition.

### เอกสารอ้างอิง

Aka, S. T., & Haji, S. H. (2015). Sub-MIC of antibiotics  
induced biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*  
in the presence of chlorhexidine. *Brazilian Journal of*  
*Microbiology*, 46(1), 149-154.

Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A.-K. M., Arasu,  
M. V., Duraipandiyar, V., & Ponmurugan, K. (2020).  
Isolation and purification of starch hydrolysing amylase  
from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 obtained from  
the Jazan region of Saudi Arabia with industrial  
applications. *Journal of King Saud University-Science*,  
32(1), 1226-1232.

Alam, K., Mazumder, A., Sikdar, S., Zhao, Y. M., Hao, J.,  
Song, C., Wang, Y., Sarkar, R., Islam, S., Zhang,  
Y., & Li, A. (2022). *Streptomyces*: The biofactory of  
secondary metabolites. *Front Microbiol*, 13, 968053.

Ali, I., Sultan, S., Tahir Mahmood, R., Tariq, M., Shamim,  
Z., Mushtaq, A., & Asiri, M. (2022). Production and  
characterization of  $\alpha$ -amylase from indigenously  
isolated *Streptomyces* sp. *BioResources*, 18(1), 6-18.

Alotaibi, G. F. (2021). Factors Influencing Bacterial  
Biofilm Formation and Development. *American*  
*Journal of Biomedical Science & Research*, 12(6),  
617-626.

Amorim, E., Castro, E. J. M., da Souza, S. V., Alves, M. S.,  
Dias, L. R. L., Melo, M. H. F., da Silva, I. M. A., Villis,  
P. C. M., Bonfim, M. R. Q., Falcai, A., Silva, M. R. C.,  
Monteiro-Neto, V., Alianca, A., da Silva, L. C. N., &  
de Miranda, R. C. M. (2020). Antimicrobial Potential of  
*Streptomyces ansochromogenes* (PB(3)) Isolated From  
a Plant Native to the Amazon Against *Pseudomonas*  
*aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 574693.

Balasubramanian, S., Othman, E. M., Kampik, D., Stopper,  
H., Hentschel, U., Ziebuhr, W., Oelschlaeger, T. A., &  
Abdelmohsen, U. R. (2017). Marine Sponge-Derived  
*Streptomyces* sp. SBT343 Extract Inhibits Staphylococcal  
Biofilm Formation. *Front Microbiol*, 8, 236.

Biswas, K., Bhattarcharya, D., Saha, M., Mukherjee, J., &  
Karmakar, S. (2021). Evaluation of antimicrobial  
activity of the extract of *Streptomyces euryhalinus*  
isolated from the Indian Sundarbans. *Archives of*  
*Microbiology*, 204(1), 34.

Castaneda-Cisneros, Y. E., Mercado-Flores, Y., Anducho-Reyes,  
M. A., Alvarez-Cervantes, J., Ponce-Lira, B.,  
Evangelista-Martinez, Z., & Tellez-Jurado, A. (2020).  
Isolation and Selection of *Streptomyces* Species  
from Semi-arid Agricultural Soils and Their Potential  
as Producers of Xylanases and Cellulases. *Current*  
*Microbiology*, 77(11), 3460-3472.

Chanhasena, P., Hua, Y., Rosyidah, A. I., Pathom-Aree, W.,  
Limphirat, W., & Nantapong, N. (2022). Isolation and  
Identification of Bioactive Compounds from *Streptomyces*  
*actinomycinicus* PJ85 and Their In Vitro Antimicrobial  
Activities against Methicillin-Resistant *Staphylococcus*  
*aureus*. *Antibiotics*, 11(12), 1797.

Chanvatik, S., Kosiyaporn, H., Lekagul, A., Kaewhankhaeng, W.,  
Vongmongkol, V., Thunyahan, A., & Tangcharoensathien, V.  
(2019). Knowledge and use of antibiotics in Thailand:  
A 2017 national household survey. *PLoS One*, 14(8),  
e0220990.



- Chater, K. F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000Research*, 5, 2795.
- de Veras, B. O., dos Santos, Y. Q., Diniz, K. M., Carelli, G. S. C., & dos Santos, E. A. (2018). Screening of protease, cellulase, amylase and xylanase from the salt-tolerant and thermostable marine *Bacillus subtilis* strain SR60. *F1000Research*, 7, 1704.
- Djemouai, N., Meklat, A., Gaceb-Terrak, R., Youcef, K. O. H., Nacer, A., Saadi, S. A., Saad, S., Verheecke-Vaessen, C., & Bouras, N. (2022). *Streptomyces* species from the rhizosphere of the medicinal plant *Artemisia herba-alba* Asso: screening for biological activities. *Biologia*, 77(8), 2281-2299.
- Donald, L., Pipite, A., Subramani, R., Owen, J., Keyzers, R. A., & Taufu, T. (2022). *Streptomyces*: Still the Biggest Producer of New Natural Secondary Metabolites, a Current Perspective. *Microbiology Research*, 13(3), 418-465.
- Dong, L., Tong, Z., Linghu, D., Lin, Y., Tao, R., Liu, J., Tian, Y., & Ni, L. (2012, May). Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(5), 390-395.
- Flemming, C. H., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.
- Hagstrom, A., Pinhassi, J., & Zweifel, U. L. (2000). Biogeographical diversity among marine bacterioplankton *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY*, 21, 231-244.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Stanley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9<sup>th</sup> ed.). Williams and Wilkins. pp. 518-537.
- Kamali, E., Jamali, A., Izanloo, A., & Ardebili, A. (2021). In vitro activities of cellulase and ceftazidime, alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *BMC Microbiology*, 21(1), 347.
- Karmakar, M., Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dash, S., Sarkar, T., Pandit, S., Upadhye, V. J., & Ray, R. R. (2023). Purification, Characterization, and Application of Endoglucanase from *Rhizopus oryzae* as Antibiofilm Agent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(9), 5439-5457.
- Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J. F., & Lumyong, S. (2009). Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. *International Journal of Integrative Biology*, 6(3), 143-147.
- Kumar, M., Kumar, P., Das, P., Solanki, R., & Kapur, M. K. (2020). Potential applications of extracellular enzymes from *Streptomyces* spp. in various industries. *Arch Microbiol*, 202(7), 1597-1615.
- Kurnianto, M. A., Kusumaningrum, H. D., & Lioe, H. N. (2020). Characterization of *Streptomyces* Isolates Associated with Estuarine Fish *Chanos chanos* and Profiling of Their Antibacterial Metabolites-Crude-Extract. *International Journal of Microbiology*, 2020, 8851947.
- Lakshmi, S. A., Alexpandi, R., Shafreen, R. M. B., Tamilmuhilan, K., Srivathsan, A., Kasthuri, T., Ravi, A. V., Shiburaj, S., & Pandian, S. K. (2022). Evaluation of antibiofilm potential of four-domain alpha-amylase from *Streptomyces griseus* against exopolysaccharides (EPS) of bacterial pathogens using *Danio rerio*. *Archives of Microbiology*, 204(5), 243.
- Lee, J. H., Kim, Y. G., & Lee, J. (2018). Thermostable xylanase inhibits and disassembles *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofouling*, 34(3), 346-356.
- Leetanasaksakul, K., & Thamchaipenet, A. (2018). Potential anti-biofilm producing marine actinomycetes isolated from sea sediments in Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, 52(3), 228-233.
- Li, J., Zhang, L., Yao, G., Zhu, L., Lin, J., Wang, C., Du, B., Ding, Y., & Mei, X. (2022). Synergistic effect of co-culture rhizosphere *Streptomyces*: A promising strategy to enhance antimicrobial activity and plant growth-promoting function. *Frontiers in Microbiology*, 13, 976484.
- Li, Y., Dong, R., Ma, L., Qian, Y., & Liu, Z. (2022). Combined Anti-Biofilm Enzymes Strengthen the Eradicate Effect of *Vibrio parahaemolyticus* Biofilm: Mechanism on cpsA-J Expression and Application on Different Carriers. *Foods*, 11(9), 1305.
- Lomthong, T., Chorum, M., Samaimai, S., & Thongpoem, P. (2022). Antioxidant and antibacterial activities of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. (Pandanaeae) prop roots and its application for a novel bacterial cellulose (Nata) fermentation by enzymatic hydrolysis. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 10, 147-152.

- Mendes, L. W., Raaijmakers, J. M., de Hollander, M., Mendes, R., & Tsai, S. M. (2018). Influence of resistance breeding in common bean on rhizosphere microbiome composition and function. *ISME J*, 12(1), 212-224.
- Mihajlovski, K., Buntić, A., Milić, M., Rajilić-Stojanović, M., & Dimitrijević-Branković, S. (2020). From Agricultural Waste to Biofuel: Enzymatic Potential of a Bacterial Isolate *Streptomyces fulvissimus* CKS7 for Bioethanol Production. *Waste and Biomass Valorization*, 12(1), 165-174.
- Mohammed, K., Roohi, Jamal M., Arif, & Pramod, W. R. (2011). An Overview of Cold-active Microbial  $\alpha$ -amylase: Adaptation Strategies and Biotechnological Potentials. *Biotechnology*, 10, 246-258.
- Mukhtar, S., Zaheer, A., Aiysha, D., Malik, K. A., & Mehnaz, S. (2017). Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 10(12), 316-319.
- Nagraj, A. K., & Gokhale, D. (2018). Bacterial Biofilm Degradation Using Extracellular Enzymes Produced by *Penicillium janthinellum* EU2D-21 under Submerged Fermentation. *Advances in Microbiology*, 8(9), 687-698.
- Newitt, J. T., Prudence, S. M. M., Hutchings, M. I., & Worsley, S. F. (2019). Biocontrol of Cereal Crop Diseases Using Streptomycetes. *Pathogens*, 8(2), 78.
- Nonthakaew, N., Panbangred, W., Songnuan, W., & Intra, B. (2022). Plant growth-promoting properties of *Streptomyces* spp. isolates and their impact on mung bean plantlets' rhizosphere microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 13, 967415.
- Oberoi, K. J., Momin, T., Ande, R., & Katkar, n. (2020). Inhibition of Bacterial Biofilms by *Streptomyces* Derived Crude Extract. *Journal of Biology and Today's World*, 9(1), 211.
- Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2019). *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(3), 1179-1188.
- Park, J. H., Lee, J. H., Kim, C. J., Lee, J. C., Cho, M. H., & Lee, J. (2012). Extracellular protease in Actinomycetes culture supernatants inhibits and detaches *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Biotechnology Letter*, 34(4), 655-661.
- Priya, B. S., Stalin T., & Selvam, K. (2012). Efficient utilization of xylanase and lipase producing thermophilic marine actinomycetes *Streptomyces albus* and *Streptomyces hygrosopicus* in the production of ecofriendly alternative energy from waste *African Journal of Biotechnology*, 11, 14320-14325.
- Pumtong, S., Suwannaprom, P., Suttajit, S., Puripunyanich, N., & Kiatying-Angsulee, N. (2020). Irrational antibiotic use and distribution in the Thai community: a complex situation in need of integrative solution *Journal of Health Science*, 29, 72-81.
- Rodrigues, I. D. S. V., Silva, C. G. S. e., Silva, R. S. d., Dolabella, S. S., Fernandes, M. F., & Fernandes, R. P. M. (2019). Screening of bacterial extracellular xylanase producers with potential for cellulose pulp biobleaching. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 41(1).
- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 76.
- Shinde., G. M., & Jadhav., A. G. (2021). Characterization and production of groundnut-shell degrading cellulase of *Streptomyces mutabilis*. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 10(8), 153-159.
- Singh, L. S., Shama, H., & Talukdar, N. C. (2014). Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India *BMC Microbiology*, 14, 278.
- Solihin, J., Waturangi, D. E., & Purwadaria, T. (2021). Induction of amylase and protease as antibiofilm agents by starch, casein, and yeast extract in *Arthrobacter* sp. CW01. *BMC Microbiology*, 21(1), 232.
- Srinivasan, R., Santhakumari, S., Poonguzhali, P., Geetha, M., Dyavaiah, M., & Xiangmin, L. (2021). Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Front Microbiol*, 12, 676458.
- Tan, L. T.-H., Chan, K.-G., Chan, C. K., Khan, T. M., Lee, L.-H., & Goh, B.-H. (2018). Antioxidative Potential of a *Streptomyces* sp. MUM292 Isolated from Mangrove Soil. *BioMed Research International*, 2018, 4823126.

- Tingthong, S., Suwanakood, P., Rattanachaikunsopon, P., & Sangswan, J. (2021). Production of Endoglucanases by *Streptomyces thermocoprophilus* CP1 using Rice Straw as a Substrate. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(4), 1963-1975.
- Tresner, H. D., Hayes, J. A., & Backus, E. J. (1966). *Streptomyces Prasinosporus* sp. nov. a new green-spored species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16(2), 161-170.
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel)*, 9(2), 59.
- Viswanathan, K., & Rebecca, J., L. . (2019). Screening of Amylase and Cellulase Enzymes from Marine Actinomycetes. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(8), 3787-3790.
- Xie, T. T., Zeng, H., Ren, X. P., Wang, N., Chen, Z. J., Zhang, Y., & Chen, W. (2019). Antibiofilm activity of three *Actinomycete* strains against *Staphylococcus epidermidis*. *Lett Appl Microbiol*, 68(1), 73-80.
- Xing, L., Xia, Y. Y., Zhang, Q. Y., Xia, Z. F., Wan, C. X., Zhang, L. L., & Luo, X. X. (2022). *Streptomyces griseicoloratus* sp. nov., isolated from soil in cotton fields in Xinjiang, China. *Archives of Microbiology*, 204(5), 254.