การคัดแยกและการจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากดินในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว ในบริเวณจังหวัดเพชรบูรณ์ และชัยภูมิ

ปัถย์ หมีอินทร์[1*], สุภาวดี พาหิระ[2], ปิยะรัตน์ ศรีสว่าง[3], ดำรงศักดิ์ เป๊กทอง[1]

[1]ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, [2]ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ [3]ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

[*]path_m_nott@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารออกออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้จากตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว ในบริเวณจังหวัดเพชรบูรณ์ และชัยภูมิ และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลที่ได้จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินในอุทยานน้ำหนาว สามารถแยกได้ 10 ไอโซเลต เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำเพาะในแต่ละสภาวะเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเหนี่ยวนำให้มีการสร้างสารทุติยภูมินั้นพบว่ามี 2 ไอโซเลตได้แก่ S1 และ S2 ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิได้ดีในอาหาร Glucose yeast peptone medium นำอาหารเหลวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาสกัดแยกโดยวิธี liquid-liquid extraction ด้วย ไดคลอโรมีเทนได้สารสกัด S1DCM และ S2DCM และสกัดด้วยเอทธิลอะซีเตทได้สารสกัด S1OAC และS2OAC นำสารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละชั้นไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HT-29 และ HCT116 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหาค่าร้อยละการตายของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และ cell apoptosis assay พบว่าสารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HT-29 และ HCT116 ได้ดีโดยเฉพาะสารสกัด S2OAC ให้ค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าทำให้เกิดการตายในระยะเริ่มต้นและระยะสุดท้ายของเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 และ HCT116 เท่ากับร้อยละ 70 และ 80 ตามลำดับ โดยสรุปสารทุติยภูมิที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลต S1 และ S2 ในตัวอย่างดินสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารต้านมะเร็งลำไส้ได้ต่อไป

คำสำคัญ: สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารทุติยภูมิ การตายของเซลล์ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

Isolation and Identification of Bacteria from Soil from Nam Nao National Park In Phetchabun and Chaiyaphum provinces

Path Meeain[1*], Supawadee Parhira[2], Piyarat Srisawang[3], Dumrongsak Pekthong[1]

[1] *Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University*
[2] *Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University*
[3] *Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University*
* *path_m_nott@hotmail.com*

Abstract

The objective of this research is to isolate bacteria and screening bacteria that are capable of producing bioactive compounds from soil samples obtained from Nam Nao National Park In Phetchabun and Chaiyaphum provinces, and finding suitable conditions for the production of bioactive substances. The results of bacterial isolation from the soil in the Nam Nao National Park can be separated into 10 isolates, but when cultured in a specific culture medium in each condition to find suitable conditions to induce the product bioactive compound, it was found that 2 isolates S1 and S2 could produce secondary metabolite in the Glucose yeast peptone medium. The liquid-liquid extracted from culture was extracted by a partition with dichloromethane (S1DMC, S2DMC), ethyl acetate (S1OAC, S2OAC) and the aqueous layer and evaporate until dry before leading to the in vitro assay. Colorectal cells including HT-29 and HCT116 were incubated with S1OAC, S2OAC, S1DCM, and S2DCM extracts at the dose of 0.1-1. 0 mg/ml for 24 h and cell viability was evaluated by MTT assay. The extracts inhibited cell proliferation in HT29 and HCT116 cells in a dose dependent manner with S2OAC had highest inhibitory effect at concentration at 50% (IC_{50}) approximately 0.5 mg/ml in both cells compared with the control cells treated with 0.1% DMSO. Following treatment of extract S2OAC at 1 mg/ml for 24 h on HT-29 and HCT116, cancer cells turned into the early and late stages of apoptosis approximately at 70% and 80% respectively. It suggests apoptosis effect following extract S2OAC treatment in colorectal cancer cells. The bacteria isolates of S1 and S2 which are isolate from soil sample from Nam Nao National Park can be further used as anticancer agents against colon cancer cell lines

Keywords: bioactive compound, secondary metabolites, *apoptosis,* anticancer activity

1. บทนำ

ในประเทศไทยของเรานั้นมีทรัพยากรธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ ทั้งนี้ทรัพยากรดินถือได้ว่าเป็นแหล่งกำเนิด สิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติ ดินเกิดจากการสลายพุพังของหินนานาชนิดใช้เวลานานนับร้อยปีในการถูกย่อยสลาย และผู้ย่อยสลายตามธรรมชาตินั้นก็คือ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจำนวนมากมายที่อาศัยอยู่ในดินโดยเฉพาะจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กชนิดหนึ่งที่มีหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายทั้งซากพืชซากสัตว์ ทั้งยังมีความหลากหลายทั้งทางสายพันธุ์และระบบนิเวศ ดังนั้น จุลินทรีย์ในดินจึงมักจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงความอุดมสมบูรณ์ของดินและระบบนิเวศโดยรอบได้เป็นอย่างดี นอกจากนั้นยังพบว่าดินในเขตป่าอนุรักษ์ของไทย มีความอุดมสมบูรณ์สูงและมีความหลากหลายทางชีวภาพทางจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของจุลินทรีย์และศักยภาพในการสร้างสารชีวภาพของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียจากดินนั้น ยังมีไม่มากนัก โดยพื้นที่เป้าหมายในการดำเนินโครงงานวิจัย คือ ป่าธรรมชาติในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัด เพชรบูรณ์ ซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศในแบบป่าไม้เขตร้อน นอกจากนี้ยังมีความหลายหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะพืชและสัตว์ อย่างไรก็ตามรายงานการวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ มีปรากฏเพียงการศึกษาในกลุ่มของยีสต์เท่านั้น ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่น ๆ จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก

ในปัจจุบันนั้นได้มีการศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรีย และการนำมาใช้ประโยชน์ ซึ่งมีอยู่มากมายในสิ่งแวดล้อม จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มีความสามารถในการสร้างสารที่ออกฤทธิ์ทางยาต่าง ๆ มากมาย เช่น ยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ เพื่อใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา หรือ ไวรัส ตลอดจนสามารถสร้างสารต้านมะเร็งบางชนิดได้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียจากดินในเขตป่าธรรมชาติ ในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว ในจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่ซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศน์ป่าไม้เขตร้อน เพื่อรวบรวมเป็นข้อมูลของเชื้อที่แยกได้และเพื่อหาสภาวะที่มีความเหมาะสมในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งเป็นเครื่องบ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของแบคทีเรียจากดินและสามารถต่อยอดเพื่อพัฒนาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

2. วัตถุประสงค์งานวิจัย

เพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากดินและหาสภาวะที่มีความเหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง

3. สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HT-29 และ HCT116 จากบริษัท American Type Culture Collection ATCC ประเทศสหรัฐอเมริกา) สารมาตรฐาน MTT culture medium dimethyl sulfoxide ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเกรดสำหรับการวิเคราะห์ ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียซื้อจากบริษัท ทีทีเค ซายเอนท์จำกัด ประเทศไทย สารละลายอินทรีย์ทุกชนิดในการทดลองนี้ เป็นเกรดสำหรับการวิเคราะห์ ซื้อจากบริษัท RCI Labscan ประเทศไทย

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองของการศึกษานี้ ได้แก่ Ultrasonicator (บริษัท Elma ประเทศเยอรมนี) Analytical balance (บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) Rotary evaporator (บริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) Vacuum freeze dryer (บริษัท Kinetic engineering ประเทศไทย) และ Microplate reader (บริษัท BioTek ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่อง Muse cell Analyzer (บริษัท Millipore ประเทศเยอรมัน)

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินด้วยวิธีการ Aseptic technique โดยเก็บในบริเวณที่มีความสนใจ ในที่ ๆ ต่างกัน โดยการใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทำการเปิดบริเวณชั้นหน้าดินลึกลงไปประมาณ 5-10 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร โดยเก็บตัวอย่างดิน 100-150 กรัมต่อ พื้นที่ โดยการเก็บตัวอย่างดินนั้นจะทำการเก็บในอลูมิเนียมฟอยล์ หลังจากนั้นทำการคัดก้อนหินและรากไม้ต่างๆ ออก ให้เหลือเฉพาะดิน แล้วจึงนำไปใส่ถุงซิปล็อคที่ปลอดเชื้อ ปิดให้สนิทแล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปแยกเชื้อ

4.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างดินที่ได้มาทำ Serial dilution technique โดยนำตัวอย่างดินที่เก็บมา 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (นับเป็น 10-1) หลังจากนั้นทำการปั่นให้เข้ากัน แล้วจึงปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลองที่ 2 ที่มีน้ำกลั่นปริมาณ 9 มิลลิลิตร (นับเป็น 10-2) หลังจากนั้น ทำซ้ำขั้นตอนเดิมจนถึงหลอดที่มีความเจือจาง เท่ากับ 10-5 หลังจากนั้น เลือกนำหลอดที่มีความเจือจางที่ 10-4 และ 10-5 มาทำการ Spread plate technique โดยการปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่บนผิวหน้าของอาหารแข็งที่จัดเตรียมไว้ อาหารที่ใช้คือ Starch casein agar และ Glucose yeast peptone medium โดยแต่ละอาหารที่เตรียมไว้นั้นจะต้องเติม ไซโคลเฮกซาไมด์ (cyclohexamide) 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อรา หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปบ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน หรือ คอยสังเกตเป็นระยะ หลังจากการบ่มเพาะเชื้อที่ได้ให้ทำการแยกเชื้อที่ได้จนเป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure colony) และเก็บรักษาเชื้อไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

4.3 การหมักและการสกัด

หลังจากการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถแยกได้นั้น นำมาทำการหมักต่อเพื่อดูความสามารในการการสร้างสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ของเชื้อต่อโดยการนำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร 7 ชนิดต่างกันดังนี้ Glucose yeast peptone medium (GYP), Starch casein broth, Tryptone yeast extract broth (ISP Medium No. 1), Yeast extract malt extract (ISP Medium No. 2), Oat meal (ISP Medium No. 3), Inorganic salt starch (ISP Medium No. 4), Tyrosine agar (ISP Medium No. 7)

หลังจากการลงเชื้อในแต่ละชนิดอาหารแล้ว ให้นำอาหารแต่ละชนิดนั้นไปบ่มเพาะในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ใช้ความเร็ว 180 รอบต่อนาที โดยในขั้นตอนนี้เราจะทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อในการสร้างสารทุติยภูมิโดยจะทำการเลือกใช้อาหารทั้ง 7 ชนิด บ่มเพาะที่ 2 อุณหภูมิคือ 27 และ 37 องศา โดยใช้ระยะเวลาที่ 7 และ 15 วัน โดยหลังจากครบกำหนดตามวันที่บ่มเพาะ อาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มเพาะจะถูกนำไปแยกตัวเชื้อออกด้วยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000-10,000 g เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างน้ำที่ได้จากการกรองเชื้อ ไปทำการสกัดแบบ ของเหลวโดยใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, DCM) และตัวทำละลายเอทธิลอะซีเตท (Ethyl acetate, EtOAc) โดยใช้ไดคลอโรมีเทนกับสารน้ำที่ได้มาผสมกันในอัตรา 2 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมสารละลายโดยใช้อ่างคลื่นความถี่สูง (Sonicator bath) 20 นาที หลังจากนั้นนำไปเทใส่กรวยแยกสารทิ้งไว้ 10-20 นาทีเพื่อให้สารละลายทำการแยกชั้น โดยเราจะแยกเก็บชั้นสารละลายไดคลอโรมีเทน แล้วนำชั้นน้ำสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง หลังจากนั้นจะนำชั้นน้ำไปทำการแยกกับสารละลายเอทธิลอะซีเตท จากนั้นรวบรวมสารสกัดทั้ง 2 ชั้นได้แก่ ชั้นสารละลายไดคลอโรมีเทน ชั้นสารละลายเอทธิลอะซีเตท นำไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ จากนั้นนำตัวอย่างสารสกัดหยาบที่ได้นำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

4.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด HCT116 และ HT-29

4.4.1 การหาค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งโดยใช้ MTT assay

เพาะเลี้ยงเซลล์ HCT116 และ HT-29 จำนวน 15,000 เซลล์ต่อหลุมใน 96 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด อาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย S1 และ S2 ปริมาตร 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ตัวอย่างต่อชนิดของเซลล์ บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารละลาย MTT 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน Phosphate buffer solution ในแต่ละหลุม แล้วนำไปบ่มต่อที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วดูดสารละลาย MTT ออกเติม dimethyl sulfoxide 150 ไมโครลิตรต่อหลุมเพื่อละลายฟอร์มาซานที่ได้จากปฏิกิริยา นำไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism5

4.4.2 การวิเคราห์การตายของเซลล์มะเร็งแบบ Apoptosis (Cell apoptosis assay)

เพาะเลี้ยงเซลล์ HCT116 และ HT-29 จำนวน 60,000 เซลล์ต่อหลุมใน 24 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด อาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย S1 และ S2 ปริมาตร 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ตัวอย่างต่อชนิดของเซลล์ plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffer solution และ Annexin V binding buffer ย้อมเซลล์ด้วย Alexa Fluor 488 annexin V และ PI นาน 30 นาทีวิเคราะห์ระยะการตายของเซลล์โดยใช้เครื่อง Muse cell Analyzer (MCH100105, Millipore, Germany)

4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความแตกต่างทางสถิติของค่า IC_{50} แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 และ HCT116 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย S1 และ S2 ทดสอบโดยใช้วิธี One-way ANOVA ตามด้วย Post Hoc test แบบวิธี Bonferroni โดยจะถือว่ามีความแตกต่างกันหากค่า *P*-value < 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS version 15.0

5. ผลและอภิปรายผลการวิจัย

5.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์

การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน โดยใช้วิธีการ Spread plate technique พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 10 ไอโซเลต ดังนี้ คือ S1 S2 PN29 PN35 PN45 PN46 PN94 PN95 PN110 และ PN213

5.2 ผลการหมักและการสกัดของสารสกัดหยาบ

เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้ ทั้ง 10 ไอโซเลต นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวทั้ง 7 ชนิด ที่อุณหภูมิ 27 และ 37 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างทุกวันที่ 7 และ 15 วัน พบว่ามี 2 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิได้ดีคือไอโซเลต S1 และ S2 ในอาหาร Glucose yeast peptone broth medium (GYP) ได้ตั้งแต่วันที่ 7 ถึงวันที่ 15 ทั้ง 2 อุณหภูมิ

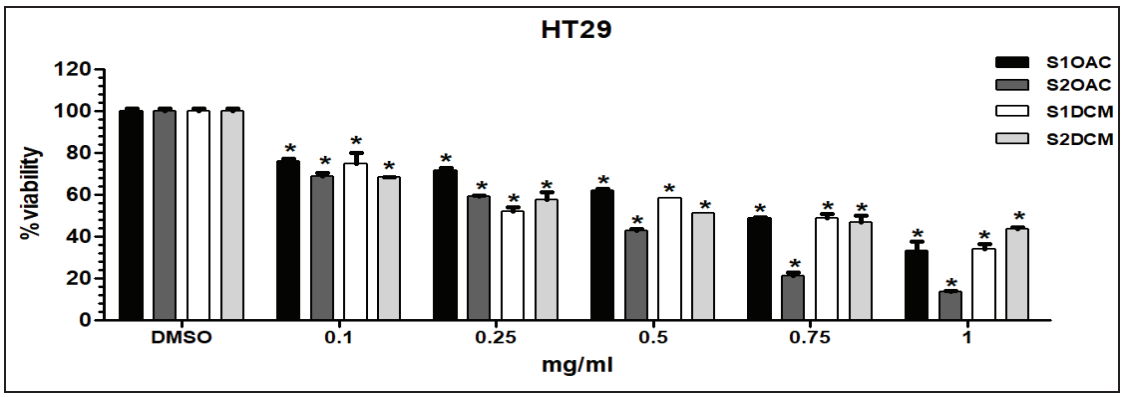
จากผลการทดสอบการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ ผู้วิจัยได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารของแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต ผลที่ได้แสดงตามตารางที่1

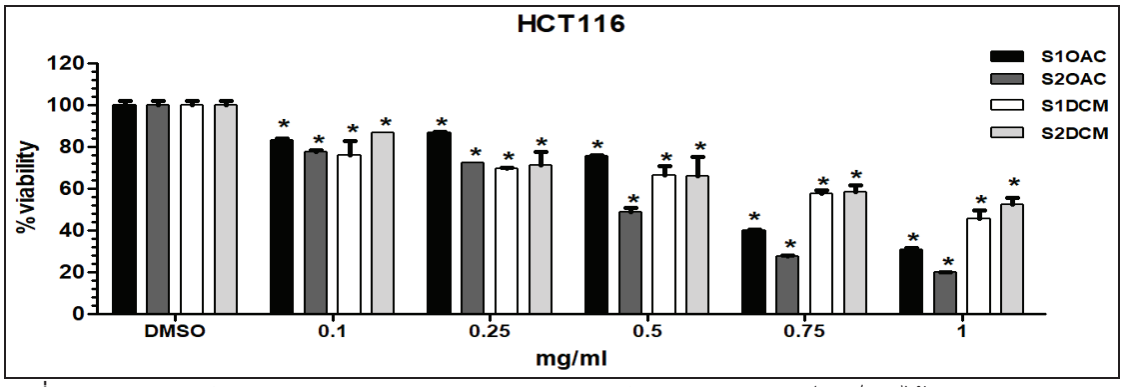
ตารางที่ 1 ร้อยละของผลผลิต การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย S1 และ S2 ในอาหารและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

ไอโซเลตเชื้อแบคทีเรีย	ระยะเวลาในการบ่ม (วัน)	อุณหภูมิ (°C)	ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (mg)	ร้อยละของผลผลิต (%)	ลักษณะทางกายภาพ
S1	7	27	DCM	17.90	7.16	Clear yellow, viscous
	7	27	EtOAc	24.30	9.72	Brown, viscous
	7	37	DCM	12.63	5.05	Light brown, viscous
	7	37	EtOAc	13.00	5.20	Yellow, viscous
	15	27	DCM	10.67	4.27	Yellow, viscous
	15	27	EtOAc	19.13	7.65	Brown, viscous
	15	37	DCM	13.17	5.27	Yellow, viscous
	15	37	EtOAc	23.17	9.27	Yellow, viscous
S2	7	27	DCM	15.77	6.31	Brown, viscous
	7	27	EtOAc	24.40	9.76	Brown, viscous
	7	37	DCM	16.70	6.68	Brown, viscous
	7	37	EtOAc	48.47	19.39	Dark brown, viscous
	15	27	DCM	16.00	6.40	Light brown, viscous
	15	27	EtOAc	21.53	8.61	Yellow, viscous
	15	37	DCM	17.53	7.01	Brown, viscous
	15	37	EtOAc	16.93	6.77	Yellow, viscous

5.3 ผลของสารสกัด S1OAC, S2OAC, S1DCM และ S2DCM ต่อการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HT-29 และ HCT116

ผลการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 และ HCT116 เมื่อบ่มกับสารสกัดของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 2 ไอโซเลตได้แก่ S1OAC, S2OAC, S1DCM และ S2DCM ที่ความเข้มข้น 0.1-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 24 ชั่วโมง ดังแสดงตามรูปที่ 1 พบการตายของเซลล์แปรผันตามความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและสารสกัด S2OAC แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมากที่สุดโดยมีค่าร้อยละ 50 ของการยับยั้งที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด

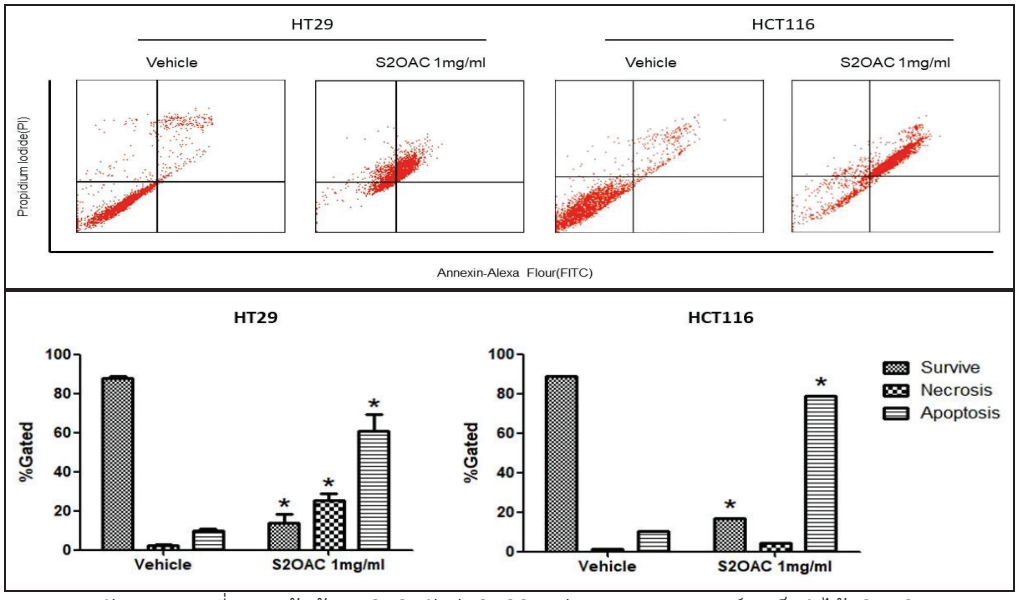




รูปที่ 1 ผลของสารสกัด S1OAC, S2OAC, S1DCM และ S2DCM ต่อการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิดชนิด HT-29 และ HCT116 เมื่อบ่มเพาะนาน 24 ชั่วโมง แสดงค่าเป็นร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
แสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 9 ครั้ง
หมายเหตุ: * มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ *P*-value < 0.05

5.4 ผลของสารสกัด S2OAC ต่อการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HT-29 และ HCT116 แบบ apoptosis

ผลของสารสกัด S2OAC ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิดชนิด HT-29 และ HCT116 แบบ apoptosis เมื่อบ่มเพาะนาน 24 ชั่วโมงดังแสดงตามรูปที่ 2 พบว่าสารสกัด S2OAC ทำให้เกิดการตายในแบบ apoptosis ในระยะเริ่มต้นและระยะสุดท้ายของเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 และ HCT116 รวมร้อยละ 70 และ 80 ตามลำดับแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 2 ผลของสารสกัด S2OAC ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิดชนิด HT-29 และ HCT116 แบบ apoptosis เมื่อบ่มเพาะนาน 24 ชั่วโมง ย้อมเซลล์ด้วย Annexin V/PI วิเคราะห์เซลล์ด้วย เครื่อง Muse cell Analyzer แสดงค่า dot plot analysis แบ่งเป็น 4 ส่วนและกราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ necrosis และ apoptosis เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
แสดงค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง
หมายเหตุ: * มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ P-value < 0.05

6. สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ โดยใชวิธี Spread plate technique พบวาสามารถคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 10 ไอโซเลท และมีเชื้อ 2 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิได้ดี พบว่าสารสกัดหยาบทั้ง 4 ชนิด (S1DCM, S2DCM, S1OAC และ S2OAC) ที่นำมาทดสอบนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HT-29 และ HCT116 ได้ดีโดยเฉพาะสาร1สกัด S2OAC ให้ค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าทำให้เกิดการตายในระยะเริ่มต้นและระยะสุดท้ายของเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 และ HCT116 เท่ากับร้อยละ 70 และ 80 ตามลำดับ โดยสรุปสารทุติยภูมิที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลต S1 และ S2 ในตัวอย่างดินสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารต้านมะเร็งลำไส้ได้ต่อไป

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2559 หมายเลขโครงการ R2559B130

เอกสารอ้างอิง (References)

Abebe B., Feleke M. and Berhanu A. (2013). Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town. North West Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, 2013 3(5), 375-381.

Atta, H. M. (2010). Production, Purification, Physico- Chemical Characteristics and Biological Activities of Antifungal Antibiotic produced by Streptomyces antibioticus. AZ-Z710. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, 2010 5(1), 39-49.

Bakker P., Berendsen R., Doornbos R., Wintermans P. and Pieterse C. (2013). The rhizosphere revisited: root microbiomics. **Frontiers in Plant Science,** 2013 4, 165.

Bibb M.J. (2005). Regulation of secondary metabolism in Streptomycetes. **Current Opinion in Microbiology,** 2005 (8), 208-215.

Collins C.H., P.M. Lyne and J.M. Granje, (1995). **Microbiological Methods.** (129-131). Butterworth and Heinemann Publishers, London,

Eman M.J. and Noor H.R. (2014). Extraction and Purification of Antimicrobial agent Produced from Actinomycetes Isolated from Agriculture soils. **Journal of Babylon University. Pure and Applied Sciences,** 2014 (2),

Kavita T. and Rajinder K. Gupta. (2013). Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. **Critical Reviews in Microbiology**, 2013 39(3), 256-294.

LABEDA D.P. and SHEARER M.C. (1990). Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. In: D.P. Labeda (ed.) **Isolation of Biotechnological Organisms from Nature**, McGraw-Hill Lnc, New York, 1-19.

Monisha K., Renu S. and Rup L. (2011). SELECTIVE ISOLATION OF RARE ACTINOMYCETES PRODUCING NOVEL ANTIMICROBIAL COMPOUNDS. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research,** 2011 2(3), 357-375.

Nagwa A.A., Sahar M.T. and Dina M.H. (2012). SELECTIVE ISOLATION OF RARE ACTINOMYCETES FROM DIFFERENT TYPES OF EGYPTIAN SOIL. **The Egyptian Society of Experimental Biology (bot.)**, 2012 8(2), 175-182.

Newman D.J. and Cragg G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products,** 2007 70(3), 461-477.

Newman D.J., Cragg G.M. And Snader K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, 2003 66(7)**,** 1022-1037.

Okudoh V.I. and Wallis F.M. (2007). Antimicrobial activity of rare actinomycetes isolated from natural habitats in KwaZulu-Natal, South Africa. **South Africa Journal of Science,** 2007 (103), 216-222

Olaf T., Chunxu S., Jeroen S.D., Michiel V. and Paolina G. (2017). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria, **Trends in Microbiology**, 2017 25(4), 280-292.

Panchanathan M., Jayachandran V. and Kannan S. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. **Microbiological Research,** 2014 169(4), 262-278.

Ramesh S. and William A. (2013). Culturable rare Actinomycetes : diversity, isolation and marine natural product discovery. **Applied Microbiology Biotechnology,** 2013 (97), 9291-9321.

Shiring E.B. and Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of Streptomyces species. **International Journal of Systematic bacteriology,** 1966 (16), 313-340.

Usha K.M., Vijayalakshmi M., Sudhakar P. and Sreenivasulu K. (2012). Isolation, Identification and Molecular Charecterization of Rare Actinomycetes from Mangrove Ecosystem of Nizampatnam**. Malaysian Journal of Microbiology,** 2012 8(2), 83-91.

Van Wezel G.P. and McDowell K.J. (2011). The regulation of the secondary metabolism of Streptomyces: new links and experimental advances. **Natural Product Reports,** 2011 (28), 1311-1333.

Yoke-Kqueen C., Learn-Han L., Cheng-Yun C.C. and Vui-Ling Clemente .M.W. (2015). Isolation, identification and screening of Actinobacteria in volcanic soil of Deception Island (the Antarctic) for antimicrobial metabolites. **Polish polar Research,** 2015 36(1), 67-78.

You K.M. and Park Y.K. (1996). A new method for the selective isolation of actinomycetes from soil. **Biotechnology Techniques,** 1996 (10), 541-546.