

การประยุกต์ใช้ MALDI-TOF MS ในการระบุชนิดของ *Streptomyces* อย่างรวดเร็ว Application of MALDI-TOF MS to Rapid Identification of *Streptomyces*

อภิญา บุญเขียน¹ วิทวัส แจ้งเยี่ยม¹ และ มาร์ุต ตั้งวัฒนาชูลีพร^{2*}

Apinya Bunkhean¹, Witawat Jangiam¹ and Marut Tangwattanachuleeporn^{2*}

¹ หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

² สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

¹ Bioengineering Program, Faculty of Engineering, Burapha University

² Medical Sciences Program, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University

Received : Feb 25, 2023

Revised : Mar 20, 2023

Accepted : Apr 4, 2023

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบายการใช้งาน MALDI-TOF MS ในการจำแนกชนิดของ *Streptomyces* ซึ่งแยกได้จากสวนทุเรียน ในจังหวัดจันทบุรี ประเทศไทย อย่างรวดเร็ว โดย *Streptomyces* จำนวน 12 ไอโซเลท คัดเลือกโดยศึกษาทางอนุกรมวิธานตามลักษณะฟีโนไทป์ โดยในระยะแรกโคโลนีมักมีลักษณะเรียบ จากนั้นจะมีการพัฒนาเส้นใยอากาศ ผิวโคโลนีย่น บางโคโลนีมีลักษณะเป็นผง หรือก้ำมะหยี่ เมื่อนำไปจำแนกด้วย MALDI-TOF MS พบว่า ทั้ง 12 ไอโซเลทถูกจำแนกชนิดได้อย่างรวดเร็ว (<15 นาที) ซึ่งมีค่าคะแนนระหว่าง 1.72 ถึง 2.56 และระบุว่าเป็น *S. matensis*, *S. albogriseolus*, *S. matensis*, *S. cavourensis*, *S. albidoflavus*, *S. albidoflavus*, *S. cavourensis*, *S. cavourensis*, *S. cavourensis*, *S. viridodiataticus*, *S. griseoincarnatus*, *S. cavourensis* (ค่าคะแนน ได้แก่ 1.72, 1.79, 2.28, 2.23, 2.13, 2.28, 2.60, 2.06, 2.17, 1.77, 1.75 และ 2.56 ตามลำดับ) จากผลการศึกษานี้ชี้ว่า MALDI-TOF MS เป็นเครื่องมือที่คุ้มค่า ในการใช้จำแนกชนิดของ *Streptomyces* ได้อย่างรวดเร็ว

คำสำคัญ : มัลดีทอพ; เอ็มเอส; สเตรปโตมัยซี; ระบุชนิดรวดเร็ว

Abstract

This study aimed to describe the use of MALDI-TOF MS for the rapid identification of *Streptomyces* isolates from the durian orchard in Chanthaburi province, Thailand. Twelve *Streptomyces* were taxonomically studied based on their phenotypic characteristics. Firstly colonies are relatively smooth surfaced but later they develop a weft of aerial mycelium that may appear floccose, powdery, or velvety. The results shown that 12 isolates were rapidly identified (<15 minutes) with high scores between 1.72 to 2.56. Twelve isolates were identified as *S. matensis*, *S. albogriseolus*, *S. matensis*, *S. cavourensis*, *S. albidoflavus*, *S. albidoflavus*, *S. cavourensis*, *S. cavourensis*, *S. cavourensis*, *S. viridodiataticus*, *S. griseoincarnatus*, *S. cavourensis* (Score value are 1.72, 1.79, 2.28, 2.23, 2.13, 2.28, 2.60, 2.06, 2.17, 1.77, 1.75 and 2.56 respectively). These results

indicate that MALDI-TOF MS could be used as a cost-effective tool for rapid identification of *Streptomyces* isolates.

Keywords : MALDI-TOF MS; *Streptomyces*; rapid identification

*Corresponding author. E-mail : marutt@go.buu.ac.th

บทนำ

ปัญหาความรุนแรงของโรคพืชที่ระบาดในสวนผลไม้เศรษฐกิจของประเทศไทย ส่งผลให้พื้นที่เพาะปลูกมีอัตราลดลง ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพต่ำ เกษตรกรในหลายพื้นที่จึงมีการทดลองใช้สารเคมีหลากหลายชนิดตามความเชื่อ หรือตามคำแนะนำของบริษัทจำหน่ายสารเคมี หรือร้านจำหน่ายสารเคมีทางการเกษตรในพื้นที่ในอัตราที่สูง สารเคมีเหล่านี้จึงกระตุ้นความต้านทานของเชื้อก่อโรคและพัฒนาไปเป็นเชื้อดื้อยาในที่สุด (สุธาสิณี อึ้งสูงเนิน, 2558) กรมวิชาการเกษตรจึงเสนอการประยุกต์ใช้แนวทางป้องกันกำจัดโรคพืชโดยวิธีผสมผสาน นั่นคือการใช้ชีวภัณฑ์ร่วมกับสารเคมี (สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6, 2565) เป็นผลให้มีการแข่งขันทั้งจากทางภาครัฐและเอกชน เพื่อค้นหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สำหรับพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคพืช (ชีวพาร สุชาติ, 2565) ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีทกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องด้วยแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารแอนติไบโอติกได้หลากหลายชนิด โดยสกุลที่นำมาใช้ประโยชน์มากที่สุดคือ *Streptomyces* (Ghanem *et al.*, 2022)

Streptomyces เป็นแบคทีเรียชั้นสูง แกรมบวก มีการสร้างเส้นใย ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นสปอร์ที่มีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อม (Amin *et al.*, 2014) พบได้ทั้งในมหาสมุทร บริเวณป่าชายเลน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดิน นอกจากนี้ยังถูกจัดเป็นผู้ย่อยสลาย ทำให้วัฏจักรของดินมีความอุดมสมบูรณ์ การศึกษาวิจัยในช่วงหลายปีที่ผ่านมาเปิดเผยว่า *Streptomyces* หลายสายพันธุ์สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ (González *et al.*, 2022) ที่ส่งผลให้เชื้อราและแบคทีเรียไม่สามารถเจริญต่อไปได้ มีความจำเพาะสูง รวมถึงสามารถผลิตเอนไซม์ที่ส่งเสริมการเจริญของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม

อย่างไรก็ตาม หากกล่าวถึงการจำแนกสายพันธุ์ของ *Streptomyces* ด้วยวิธีมาตรฐานนั้นไม่สามารถระบุชนิดได้ในระดับสปีชีส์ เนื่องด้วยวิธีการมาตรฐานจะมีการวิเคราะห์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี เป็นต้น ในปัจจุบันจึงมีการใช้วิธีทางอณูชีววิทยาอย่างการศึกษาลำดับเบสบนยีนส์ 16S rRNA ในบริเวณที่จำเพาะ ซึ่งจำเป็นต้องผ่านกระบวนการสกัดให้ได้สารพันธุกรรมที่มีความบริสุทธิ์สูง กระบวนการเพิ่มจำนวน และการบลาสต์ข้อมูล ตลอดกระบวนการดังกล่าวใช้ระยะเวลาไม่น้อยกว่า 2 วัน จึงไม่เหมาะสมต่องานวิจัยที่ต้องการความรวดเร็วในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อกลุ่ม *Streptomyces* (Kim *et al.*, 2012) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเสนอวิธีการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptomyces* ด้วยเครื่องมือที่มีความแม่นยำ รวดเร็ว และใช้ปริมาณของเซลล์จุลินทรีย์เพียงเล็กน้อย วิธีการวิเคราะห์ที่ไม่ซับซ้อน

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ในปัจจุบันนับว่าเป็นเครื่องมือที่มีระบบซอฟต์แวร์และฐานข้อมูลโปรตีนสเปกตรัมของทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และราสายค่อนข้างครอบคลุม จึงถูกนำมาใช้วิเคราะห์ข้อมูลการจำแนกแบคทีเรียในงานประจำทางจุลชีววิทยาคลินิก (Seng *et al.*, 2013) และมีรายงานการใช้ MALDI-TOF MS ในการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม เชื้อจุลินทรีย์เจริญยาก ตลอดจนกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน ซึ่งผลการจำแนกมีความแม่นยำ ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สั้น ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย แม้ว่าจะใช้วิธีอย่างง่าย เช่น การนำโคโลนีแบคทีเรียไปวิเคราะห์โดยตรง โดยไม่ผ่านการสกัดใด ๆ (Cayrou *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces* มีความหลากหลายและมักมีการสร้างเส้นใยเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเสนอวิธีการจำแนกชนิดแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces* อย่างรวดเร็วด้วย MALDI-TOF MS เพื่อเพิ่มทางเลือกแก่นักวิจัยที่ต้องการทราบชนิดของ *Streptomyces* จำนวนมากภายในระยะเวลาที่รวดเร็ว

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการแยกเชื้อ *Streptomyces* จากดินในพื้นที่สวนทุเรียน จังหวัดจันทบุรี คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น สีโคโลนี ลักษณะโคโลนีแห้ง หยาบ มีการสร้างเส้นใย จากนั้น ทำการ sub-culture กระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยอาหาร ISP-2 (Himedia, India) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีที่นำไปใช้ในการศึกษาควรเป็น active cell อายุของตัวอย่างที่นำมาทดสอบไม่ควรเกิน 72 ชั่วโมง เนื่องด้วยมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน รวมถึงต้องไม่ผ่านการเก็บรักษา ในอุณหภูมิต่ำ เช่น 4 องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์ชนิดด้วย MALDI-TOF MS ต่อไป

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง *Streptomyces* เพื่อจำแนกชนิดด้วย MALDI-TOF MS ตามขั้นตอนใน MALDI Biotyper® protocol guide edition 5 (2017) ได้แนะนำสำหรับจุลินทรีย์กลุ่มพิเศษ คือ วิธี extraction ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ นำโคโลนีบริสุทธิ์ของ *Streptomyces* อย่างน้อย 10 โคโลนี (หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ใส่ลงในหลอด eppendorf ที่บรรจุ high performance liquid chromatography (HPLC) grade water (J.T. Baker, USA) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมขึ้นลงด้วยปิเปตตัวอย่างน้อย 20 ครั้ง เติมน้ำละลาย absolute ethanol (J.T. Baker, USA) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมขึ้นลงด้วยปิเปตตัวอย่างน้อย 20 ครั้ง (ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* บางสายพันธุ์มีลักษณะค่อนข้างแข็ง จึงไม่สามารถละลาย เป็นเนื้อเดียวกับสารละลายได้) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 15,000 x g เป็นระยะเวลา 2 นาที ณ อุณหภูมิห้อง ดูด supernatant ที่ด้วยความระมัดระวัง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 15,000 x g เป็นระยะเวลา 2 นาที ดูด supernatant ที่ด้วยความระมัดระวัง ทำการเปิดฝาของหลอด eppendorf ณ อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เซลล์แห้ง เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 5 นาที จึงทำการเติม 70 เปอร์เซ็นต์ของ formic acid (Merck KGaA, Finland) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมขึ้นลงให้เซลล์กระจาย ทั่วหลอด จากนั้นจึงเติม acetonitrile (Honeywell, USA) เข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลอดเดียวกัน ผสมขึ้นลง 2-3 ครั้ง ให้เซลล์สัมผัสสารละลายทั่วทั้งหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 x g เป็นระยะเวลา 2 นาที จากนั้นดูด supernatant ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ของแต่ละไอโซเลท ลงบน MALDI-TOF steel target plate (Bruker Daltonics, Germany) พักไว้กระทั่งสารละลายแห้ง จึงหยด matrix solution ซึ่งมีส่วนผสมของ α -cyano-hydroxycinnamic acid (Bruker Daltonics, Germany) ก่อนการใช้งานจะถูกละลายด้วย standard solvent ที่มีส่วนผสมของ acetonitrile, trifluoroacetic และ HPLC grad water (Honeywell, USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ให้ครอบคลุมตัวอย่าง พักไว้ให้สารละลายแห้ง สังเกตได้จากการเปลี่ยนเป็น ฟอสฟอรัสเหลืองอ่อน จึงนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF ในลำดับถัดไป

เครื่อง MALDI-TOF ที่ใช้ในการศึกษานี้ตั้งอยู่ ณ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ซอฟแวร์ที่ใช้ วิเคราะห์ คือ Flex control ตรวจวัดเฉพาะโปรตีนที่มีขนาด 2-20 kDa ที่มีประจุบวกเท่านั้น (nitrogen laser light, wavelength 337 nm) โดยทำงานร่วมกับ microfle LT/SH BD MALDI-TOF MS spectrometer เมื่อเลเซอร์ทำงานจะมีการรวบรวมสเปกตรัมของเชื้อเพื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในเครื่อง จากนั้นเปิดโปรแกรม MBT compass เพื่อใช้งาน auto run สำหรับการควบคุมคุณภาพเครื่องจะใช้ bacteria test standard (Bruker Daltonics, Germany) ซึ่งเป็นเชื้อ *Escherichia coli* DH5alpha เป็นชุดควบคุมบวก และใช้ matrix solution ที่ไม่มีการเติมตัวอย่างเป็นชุดควบคุมลบ ดำเนินการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ ซึ่งผลความแม่นยำ ในการระบุสายพันธุ์แบ่งออกเป็น 3 ระดับ ตามค่าคะแนนที่ได้ดังนี้ ผลเป็นสีเขียว ค่าคะแนน ≥ 2 หมายถึง สามารถระบุได้ในระดับสปีชีส์ ผลเป็นสีเหลือง ค่าคะแนนอยู่ระหว่าง 1.70 - 1.99 หมายถึง สามารถระบุได้ในระดับจิ้นัส และผลเป็นสีแดง ค่าคะแนน < 1.7 หมายถึง ผลการจำแนกชนิดไม่น่าเชื่อถือ

ผลการวิจัย

จุลินทรีย์ที่นำมาศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่บ่งชี้ว่าอยู่ในสกุล *Streptomyces* อาทิ โคโลนีมีลักษณะแห้ง ยึดติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ผิวโคโลนีหยาบและเป็นร่อง ย่น บางไอโซเลทมีการสร้างเส้นใยจำนวนมาก มีสีโคโลนี อาทิ เหลือง ขาว ครีม หรือมีลักษณะคล้ายผงแป้ง สามารถเจริญภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 1a)

เมื่อทำการจำแนกชนิดของ *Streptomyces* ด้วย MALDI-TOF MS เชื้อทั้ง 12 ไอโซเลทที่ได้รับคัดเลือกนั้นสามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* โดยระดับความแม่นยำแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสีเหลือง (score value < 2 และ ≥ 1.7) ซึ่งมีความแม่นยำของการจำแนกชนิดในระดับจีโนมจำนวน 4 ไอโซเลท คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มสีเขียว (score value 1.70 - 1.99) มีความแม่นยำในการจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์จำนวน 8 ไอโซเลท คิดเป็น 66.66 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อที่จำแนกได้นั้นมีดังนี้ Act51, Act53, Act55, Act56, Act57, Act58, Act61, Act62, Act79, Act77, Act101 และ Act103 ซึ่งระบุว่าเป็น *S. matensis*, *S. albogriseolus*, *S. matensis*, *S. cavourensis*, *S. albidoflavus*, *S. albidoflavus*, *S. cavourensis*, *S. cavourensis*, *S. cavourensis*, *S. viridodiataticus*, *S. griseoincarnatus*, *S. cavourensis* ตามลำดับ (score value ได้แก่ 1.72, 1.79, 2.28, 2.23, 2.13, 2.28, 2.60, 2.06, 2.17, 1.77, 1.75 และ 2.56 ตามลำดับ) โดยใช้เวลาวิเคราะห์ผลน้อยกว่า 15 นาที (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1b, c, d, e)

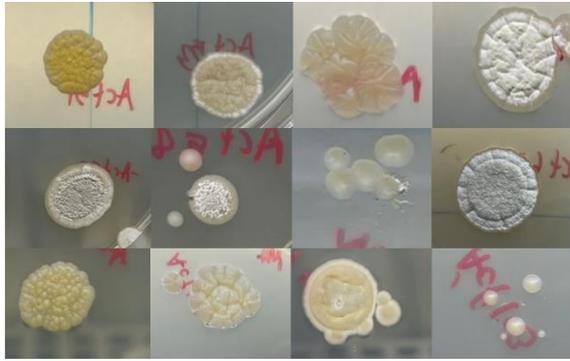
ตารางที่ 1 ผลการจำแนกชนิดเชื้อ *Streptomyces* จำนวน 12 ไอโซเลท โดยใช้ฐานข้อมูลเครื่อง MALDI-TOF

ลำดับ	ไอโซเลท	ผลการจำแนกชนิด	ค่าคะแนน ^a
1	Act51	<i>S. matensis</i>	1.72
2	Act53	<i>S. albogriseolus</i>	1.79
3	Act55	<i>S. matensis</i>	2.28
4	Act56	<i>S. cavourensis</i>	2.23
5	Act57	<i>S. albidoflavus</i>	2.13
6	Act58	<i>S. albidoflavus</i>	2.28
7	Act61	<i>S. cavourensis</i>	2.60
8	Act62	<i>S. cavourensis</i>	2.06
9	Act79	<i>S. cavourensis</i>	2.17
10	Act77	<i>S. viridodiataticus</i>	1.77
11	Act101	<i>S. griseoincarnatus</i>	1.75
12	Act103	<i>S. cavourensis</i>	2.56
13	BTS ^b	<i>E. coli</i>	2.30
14	Matrix solution	No peak found	0.00

หมายเหตุ ^a ค่าคะแนนความเชื่อมั่นการแปรผล ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบสเปกตรัมระหว่างตัวอย่างที่ทดสอบและฐานข้อมูล

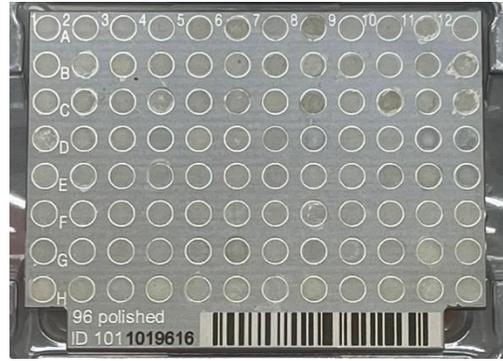
^b จุลินทรีย์มาตรฐานสำหรับการควบคุมคุณภาพของเครื่อง MALDI-TOF MS คือ *Escherichia coli* DH5alpha

^c ชุดควบคุมลบสำหรับควบคุมคุณภาพเครื่อง MALDI-TOF MS คือ สารละลายเมทริกซ์ที่ไม่เติมเชื้อ



(a)

Streptomyces ขณะเจริญบน ISP2 agar



(b)

สารละลายโปรตีนที่ถูกเคลือบด้วยเมทริกซ์บนเพลททดสอบ



(c)

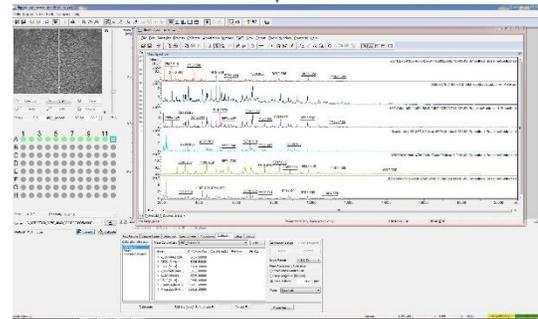
เพลทตัวอย่างถูกนำเข้าสู่เครื่อง MALDI-TOF

Run Identifier: Z30201-1255-1019650 Run Creation Date/Time: 2023-02-01T13:30:47.008

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
G7 (+++)(A)	Act158 (Standard)	Streptomyces albidoflavus	2.38	Streptomyces albidoflavus	2.35
G8 (+)(B)	Act61 (Standard)	Streptomyces cavourensis	2.00	Streptomyces sindnensis	2.00
G9 (+)(A)	Act62 (Standard)	Streptomyces cavourensis	2.06	Streptomyces sindnensis	1.88
G10 (+++)(A)	Act79 (Standard)	Streptomyces cavourensis	2.17	Streptomyces sindnensis	1.89
G11 (→)(B)	Act77 (Standard)	Streptomyces viridodiataticus	1.77	Streptomyces albovisolus	1.73

(e)

ผลการเปรียบเทียบความเข้ากันได้ของสเปกตรัม



(d)

การทำงานของเครื่องเพื่อรวบรวมสเปกตรัมของโปรตีน

ภาพที่ 1 การจำแนกชนิดของเชื้อ *Streptomyces* โดยใช้วิธีการสกัดโปรตีน จากนั้นเคลือบโปรตีนด้วยสารละลายเมทริกซ์ ทำการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติเพื่อเปรียบเทียบความเข้ากันได้ของโปรตีนสเปกตรัมกับฐานข้อมูล และรายงานผลการจำแนกชนิด

วิจารณ์ผล

ปัจจุบันปฏิเสธไม่ได้ว่า *Streptomyces* นั้นได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก ในการคัดแยกและค้นหาสายพันธุ์สำหรับพัฒนาเพื่อใช้ในงานด้านการเกษตร แม้ว่าประสิทธิภาพของ *Streptomyces* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคจะเป็นที่ยอมรับ แต่รายงานการวิจัยระดับชาติของประเทศไทยบางส่วน มีการระบุเพียงรหัสที่ตั้งขึ้นมา เนื่องด้วย *Streptomyces* เป็นเชื้อที่ไม่สามารถจำแนกได้ด้วยวิธีดั้งเดิมหรือวิธีทางชีวเคมี ปัจจัยทางด้านค่าใช้จ่ายในการสกัดส่วนของ DNA และส่งวิเคราะห์ลำดับเบสผ่านบริษัทเอกชนในต่างประเทศ รวมถึงอาจใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 1 เดือน (Kim *et al.*, 2012) การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งนำเสนอทางเลือกที่รวดเร็วในการจำแนกชนิดของ *Streptomyces* ด้วย MALDI-TOF MS ในระดับสปีชีส์ ซึ่งผลการวิเคราะห์ *Streptomyces* ทั้ง 12 ไอโซเลท สามารถดำเนินการเสร็จสิ้นภายในระยะเวลาที่น้อยกว่า 15 นาที ปัจจุบัน MALDI-TOF MS version 4.0 มีฐานข้อมูลของ *Streptomyces* อยู่ที่ 157 สปีชีส์ ซึ่งไม่ถือว่าเป็นข้อจำกัดเนื่องด้วยสามารถเพิ่มฐานข้อมูลในไลบรารีได้ในภายหลัง นอกจากนี้ MALDI-TOF MS ไม่เพียงแต่สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรีย แต่ยังมีความแม่นยำในการจำแนกชนิดของยีสต์ และราสายอีกด้วย ซึ่งงานวิจัยนี้สอดคล้องต่อการศึกษาของ (Loucif *et al.*, 2014) ซึ่งได้ทำการแยกเชื้อ *Streptomyces* จากพื้นที่แอลจีเรีย จำนวน 20 ไอโซเลท เพื่อทดสอบความสามารถในการจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ พบว่า MALDI-TOF MS สามารถระบุชนิดของทุกไอโซเลทได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 30 นาที

สรุปและข้อเสนอแนะ

MALDI-TOF MS เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดของ *Streptomyces* ได้อย่างรวดเร็ว ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย (1 ไมโครลิตร) สามารถวิเคราะห์ได้มากถึง 96 ตัวอย่างในครั้งเดียว มีความคุ้มค่าในด้านราคากรณีติดตั้งในระยะยาว และข้อมูลการวิเคราะห์ที่ได้มีความน่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตาม MALDI-TOF MS เป็นเครื่องมือที่มีราคาและค่าบำรุงรักษาสูง ซึ่งเป็นเหตุผลให้ในประเทศไทยมีการติดตั้งเครื่องมือดังกล่าวไม่มากนัก อย่างไรก็ตามในการใช้งานนักวิจัยสามารถเลือกใช้บริการวิชาการจากสถานที่ที่มีการติดตั้งเครื่องมือดังกล่าวภายในประเทศเพื่อพัฒนางานวิจัยต่อไปได้ รวมถึงเพิ่มความหลากหลายของการค้นพบเชื้อปฏิชีวนะเพื่อการควบคุมโรคพืชได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับการให้ความอนุเคราะห์สารเคมีและการทำงานของเครื่อง MALDI-TOF MS รวมถึงสนับสนุนสถานที่ทำการทดลอง ขอขอบคุณคณะวิศวกรรมศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนทุนผู้ช่วยวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา กระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ชีวาพร สุขดี. (2565). *แผนธุรกิจผลิตภัณฑ์สารสกัดชีวภาพควบคุมโรคพืช BIONAR*. สารนิพนธ์หลักสูตรปริญญาการจัดการมหาบัณฑิตวิทยาลัยการจัดการ, มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 กรมวิชาการเกษตร. (2565). *เทคโนโลยีผสมผสานการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน ภาคตะวันออก*. คณะทำงานจัดการความรู้ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6.
- สุธาสิณี อังสูงเนิน. (2558). ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย ฉบับวิชาการและเทคโนโลยี*, 9(1) : 50-63.

- Amin, H., Ashraf, K. and Khosrow, I. (2014). *Streptomyces*: Characteristics and their antimicrobial activities. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(1) : 63-75.
- Bruker Daltonics. (2017). Bruker guide to MALDI sample preparation – MALDI preparation protocols, 5th ed. Bruker Daltonics, Germany.
- Cayrou, C., Raoult, D. and Drancourt, M. (2010). Matrix-assisted laser desorption/ionization time of-flight mass spectrometry for the identification of environmental organisms : the *Planctomyces* paradigm. *Environmental Microbiology Reports*, 2 : 752–60.
- Ghanem, G.A.M., Gebily, D.A.S., Ragab, M.M., Ali, A.M., Soliman, N.E.D. and Abd El-Moity, T.H. (2022). Efficacy of antifungal substances of three *Streptomyces* spp. against different plant pathogenic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32 : 112, doi : 10.1186/s41938-022-00612-9.
- González, V., Vargas-Straube, M.J., Beys-da-Silva, W.O., Santi, L., Valencia, P., Beltrametti, F. and Cámara, B., (2022). Enzyme bioprospection of marine-derived actinobacteria from the Chilean coast and new insight in the mechanism of keratin degradation in *Streptomyces* sp. G11C. *Marine Drugs*, 18(11) : 537, doi : 10.3390/md18110537.
- Kim, K.O., Shin, K.S., Kim, M.N., Shin, K.S., Labeda, D.P., Han, J.H. and Kim, H.B. (2012). Reassessment of the status of *Streptomyces setonii* and reclassification of *Streptomyces fimicarius* as a later synonym of *Streptomyces setonii* and *Streptomyces albovinaceus* as a later synonym of *Streptomyces globisporus* based on combined 16S rRNA/gyrB gene sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 : 2978–85.
- Loucif, L., Bendjama, E., Gacemi-Kirane, D. and Rolain, J.M. (2014). Rapid identification of *Streptomyces* isolates by MALDI-TOF MS. *Microbiological Research*, 169(12) : 940-7.
- Seng, P., Abat, C., Rolain, J.M., Colson, P., Lagier, J.C., Gouriet, F., Fournier, P.E., Drancourt, M. Scola, B.L. and Raoult, D. (2013). Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory : impact of matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 : 2182–94.