ผลของการลดปริมาณโซเดียมไนเตรทต่อการสร้างสารกันแดดในไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp.

Effect of Sodium Nitrate Content Reduction on Sunscreen Formation in Cyanobacterium *Lygnbya* sp.

นิตยา ไชยเนตร และ นฤมล อุดม
Nittaya Chaiyanate and Narumon Udom

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา
1 Major of Biotechnology, Office of Educational Affairs, Faculty of Science, Burapha University
*E-mail: nittaya@go.buu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการลดปริมาณโซเดียมไนเตรทในสูตรอาหาร BG-11 ต่อการสร้างสารกันแดด Scytoneminและ Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) ในไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ที่แยกจากดินนาข้าวกึ่งอินทรีย์ จ.พระนครศรีอยุธยา ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเข้มแสง 1,500-1,800 ลักซ์ อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างและอากาศตลอด 24 ชั่วโมง โดยเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย Lyngbya sp. ในอาหารสูตร BG-11 ที่มีปริมาณโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) และสูตรอาหาร BG-11 ที่มีปริมาณโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร (ชุดทดลอง) จำนวนชุดละ 3 ซ้ำ เก็บเกี่ยวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ในวันที่ 10, 15 และ 20 ของการทดลองเลี้ยง และนำมาสกัดสารเพื่อวิเคราะห์หาสารกันแดด โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 200-700 นาโนเมตร ผลการนำสารสกัดหยาบ Scytonemin ไม่ปรากฏจุดสูงสุดของกราฟในช่วง 252, 278 หรือ 300 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นของ Scytonemin แต่พบสารชีวภาพอื่น ๆ ได้แก่ MAAs คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ ในขณะค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบทั้งชุดทดลองและชุดควบคุม ปรากฏจุดสูงสุดของกราฟในช่วงความยาวคลื่น 327-348 นาโนเมตรในวันที่ 10 ของการทดลองเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย ทั้งนี้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 310 - 362 นาโนเมตรเป็นความยาวคลื่นของ MAAs ดังนั้นจากการศึกษานี้การลดปริมาณโซเดียมไนเตรทสามารถกระตุ้นให้ไซยาโนแบคทีเรีย Lyngbya sp. สร้างสารกันแดด MAAs แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้สร้าง Scytonemin

คำสำคัญ: ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* Mycosporine-like Amino Acids Scytonemin สารกันแดด

Abstract

This research aimed to study the effect of sodium nitrate content decreasing in BG-11 medium on sunscreen compounds, Scytonemin and Mycosporine-like Amino Acids (MAAs), formation in cyanobacterium *Lyngbya* sp. which was isolated from semi-organic paddy soil in Phra Nakhon Si Ayutthaya .Cyanobacterium *Lyngbya* sp .was cultured in BG-11 medium which had sodium nitrate 1.5 gram per liter (control) and 0.75 gram per liter (treatment) in triplicate each. Cultures were grown at 25-28 °C in a cool white fluorescent tube providing a light intensity of 1,500-1,800 lux for 24 hours. Cyanobacterium *Lyngbya* sp. cells were harvested on day 10, 15 and 20. Cells were extracted and analyzed for sunscreen substance. Absorption of the crude extracts was measured in the wavelength from 200-700 nm using UV-Vis spectrophotometer. The

results showed that the UV-absorption spectrum of cyanobacterium *Lyngbya* sp. crude extracts of MAAs at 327-348 nm on day 10 of cells cultivation in both control and treatment, the absorption peak at 310-362 nm is the UV-absorption spectrum of photoprotective compound MAAs. Whereas UV-absorption of Scytonemin has not appeared at the wavelength of 252, 278 or 300 nm .The absorbance spectra of scytonemin extracts of *Lyngbya* sp. showed other biological substance peaks, e.g. MAAs, chlorophyll, and carotenoids. From this study, the decreasing of sodium nitrate contents can stimulate sunscreen formation MAAs but not for scytonemin in cyanobacterium *Lygnbya* sp.

Keywords: Cyanobacteria, *Lyngbya*, Mycosporine-like Amino Acids, Scytonemin, Sunscreen

บทนำ

ไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสร้างกลไกป้องกันตัวเองจากการได้รับรังสียูวี (UV) ด้วยการหลีกเลี่ยง (Avoidance) รังสีUV โดยการอพยพหรือเคลื่อนย้ายเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียให้อยู่ในบริเวณที่มีรังสี UV ต่ำ การป้องกัน (Protection) ด้วยการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมและสร้างสารประกอบชีวภาพที่ป้องกันเซลล์จากแสงแดด การซ่อมแซมรหัสทางพันธุกรรม การสังเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น สารประกอบชีวภาพที่สังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ และปล่อยออกมานอกเซลล์อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และเซลล์เพื่อช่วยดูดซับรังสี UV ได้แก่ mycosporine-like amino acids (MAAs) และ scytonemin ซึ่งยอมรับว่าเป็นสารชีวภาพที่กันแดดได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถป้องกันการเสียหายของเซลล์จากรังสี UV ได้ สารประกอบที่ดูดซับรังสี UV เหล่านี้ทำหน้าที่เป็นครีมกันแดดให้กับสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในธรรมชาติ ลดความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากรังสี UV (Rastogi et al., 2017) MAAs เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ไม่มีสี ละลายน้ำ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (< 400 Da) มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 310-362 นาโนเมตร พบได้ในไซโตพลาสซึมของไซยาโนแบคทีเรีย และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอื่น ๆ เช่น ไดโนแฟลกเจลเลท ปัจจุบันพบ MAAs มากกว่า 25 ชนิดจากสิ่งมีชีวิตที่หลากหลาย ซึ่ง MAAs แตกต่างชนิดกันถูกแยกออกมาจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกันของสาหร่ายขนาดใหญ่ สาหร่ายขนาดเล็ก และไซยาโนแบคทีเรียทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ โมเลกุล MAA ทั้งหมดมีวงแหวน cyclohexanone หรือวงแหวน cyclohexenimine อยู่ตรงกลางโครงสร้างโมเลกุล

Scytonemin เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก สีเหลืองน้ำตาล น้ำหนักโมเลกุลต่ำ 544 Da ละลายได้ดีในไขมัน Scytonemin ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 252, 278 และ 300 นาโนเมตร โดยทั่วไป Scytonemin อยู่ในรูป oxidized (สีเขียว) หรือรูป reduced (สีแดง) เป็นสารประกอบที่ผลิตโดยไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสะสมเป็นสารภายนอกเซลล์ (extracellular polymeric substances, EPS) ที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย (Derikvand et al., 2017) การสังเคราะห์ Scytonemin ในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียได้รับผลจากปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มยีน Scytonemin ได้แก่ scyA, scyB, scyC, scyD, scyE และscyF (Pathak et al., 2015) การเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ Scytonemin พบได้ในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ Nostoc punctiforme PCC 73102 ในสภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจนโดยใช้โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองร่วมกับการให้รังสีUVA ความเข้มแสง 3 Wm-2 เป็นเวลา 13 วัน และไม่ให้รังสี UVA (Fleming and Castenholz, 2008) ในขณะที่ความเค็มเป็นปัจจัยที่ใช้เหนี่ยวนำหรือกดดันให้ไซยาโนแบคทีเรียสร้างหรือสังเคราะห์ Scytonemin และ MAAs ได้ โดยไม่ต้องร่วมกับรังสี UV Rath et al. (2012) กระตุ้นการสร้าง scytonemin ในไซยาโนแบคทีเรีย Lyngbya aestuarii ผลการทดลองพบว่า ที่ความเค็ม 28, 56 และ 90 ppt กระตุ้นให้ Lyngbya aestuarii สร้างสาร Scytonemin โดยความเค็ม 56 ppt เซลล์

ไม่ได้รับความเสียหายและเยื่อหุ้มเซลล์ (sheath) ไม่ฉีกขาด และปริมาณ Scytonemin มากกว่าในไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงความเค็ม 28 และ 90 ppt ซึ่งเซลล์บางส่วนตาย เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาดและหลุดออก Rath et al. (2014) ศึกษาผลของความเค็มที่ระดับ 0, 3.5, 7, 14, 28, 56 และ 90 g/L ต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของ *Lyngbya aestuarii* และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ แคโรทีนอยด์ และ MAAs พบว่าที่ความเค็ม 3.5 g/L ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ แคโรทีนอยด์มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด และที่ความเค็ม 56 g/L MAAs มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด นอกจาก *Lyngbya aestuarii* แล้ว *Rivularia* sp. HKAR-4 ก็เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างสารกันแดด

ข้อมูลจากบทความวิชาการและบทความวิจัยที่หลากหลายข้างต้นผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาสารกันแดดในไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ที่แยกจากดินนาข้าวกึ่งอินทรีย์ ตำบลช่างเหล็ก อำเภอบางไทร จังหวัดพระนครศรีอยุธยาการทดลองนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นของสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย และปัจจัยที่ควบคุมได้ในห้องปฏิบัติการเพื่อผลิตสารกันแดด โดยมุ่งไปที่ธาตุไนโตรเจนในรูปโซเดียมไนเตรทที่เป็นสารหลักและควบคุมปริมาณได้ในอาหารเลี้ยงและมีการทดลองผลของโซเดียมไนเตรทต่อการสร้างสารชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิด ดังนั้นแล้ววัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของการลดปริมาณโซเดียมไนเตรทในอาหารสูตร BG-11 ต่อการสร้างสารกันแดดในไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp.

วิธีการวิจัย

เลี้ยงเพิ่มจำนวนไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ในห้องปฏิบัติการ SD 107 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นชั่งเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lyngbya* sp. บริสุทธิ์ปริมาณ 0.5 กรัมน้ำหนักเปียกต่อ 800 มิลลิลิตรของอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่มีปริมาณโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) และสูตรอาหาร BG-11 ที่มีปริมาณโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร (ชุดทดลอง) ชุดละ 3 ซ้ำ โดยสภาวะทดลองเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่ความเข้มแสง 1,500-1,800 ลักซ์ อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส และให้อากาศตลอด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 20 วัน เก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียวันที่ 10, 15 และ 20 ของการทดลองเลี้ยง นำตัวอย่างเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียวิเคราะห์หาปริมาณสารกันแดด scytonemin และ MAAs โดยดัดแปลงจากวิธีของ Pathak et al. (2015)

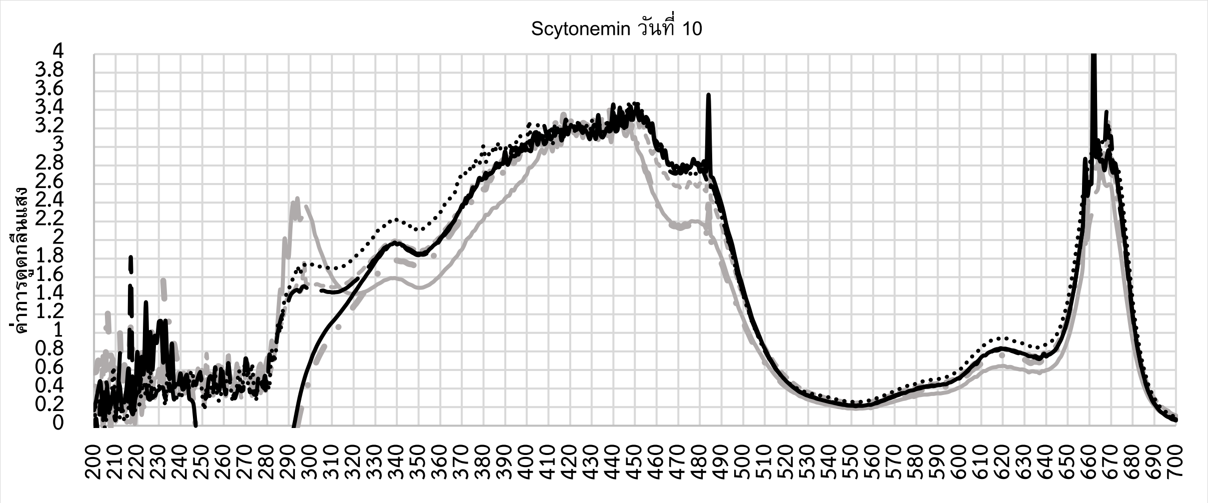
วิเคราะห์สารกันแดด scytonemin โดยชั่งไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. 0.5 กรัมน้ำหนักสด เติม ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 1:1 (v/v) ปริมาตร 20 ml ลงในตัวอย่างทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ เครื่อง Sonicator เป็นเวลา 4 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสไประเหยแห้งเพื่อเพิ่มความเข้มข้น ด้วยเครื่อง Evaporator ที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที ละลายสารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 1:1 (v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 -700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer การวิเคราะห์ MAAs โดยชั่งไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. 0.5 กรัมน้ำหนักสด เติม methanol ปริมาตร 20 ml ทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส ทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง Sonicator เป็นเวลา 4 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสไประเหยแห้งเพื่อเพิ่มความเข้มข้น ด้วยเครื่อง Evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที ละลายสารสกัดหยาบด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

ศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light Microscope) โดยหยดน้ำกลั่นบริสุทธิ์บนแผ่นสไลด์ และนำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ใส่ลงในหยดน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปิดทับด้วยแผ่นปิด

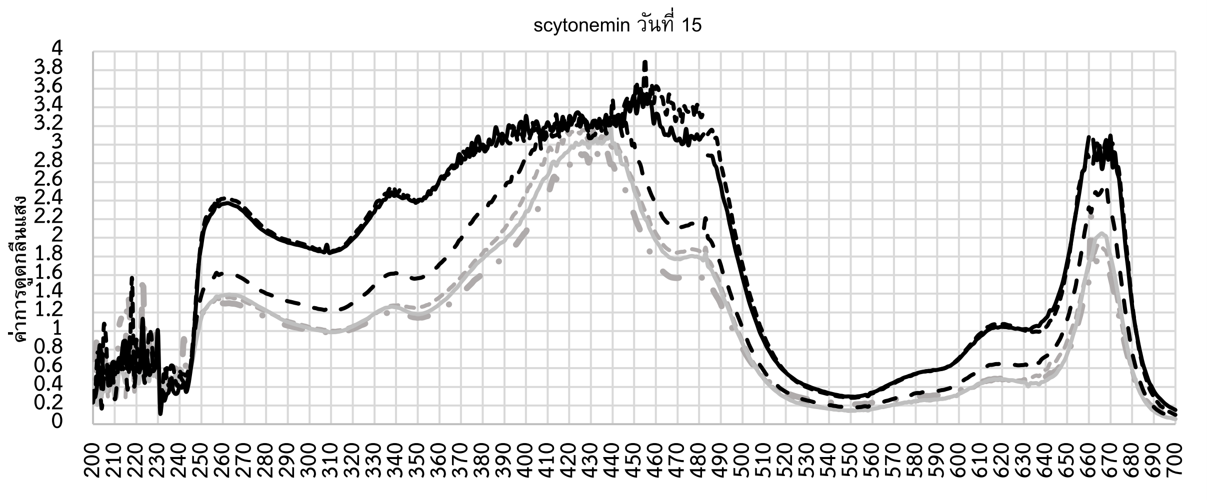
สไลด์ ดูลักษณะของเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ (sheath) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4X 10X และ 40X ตามลำดับ และถ่ายภาพเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X

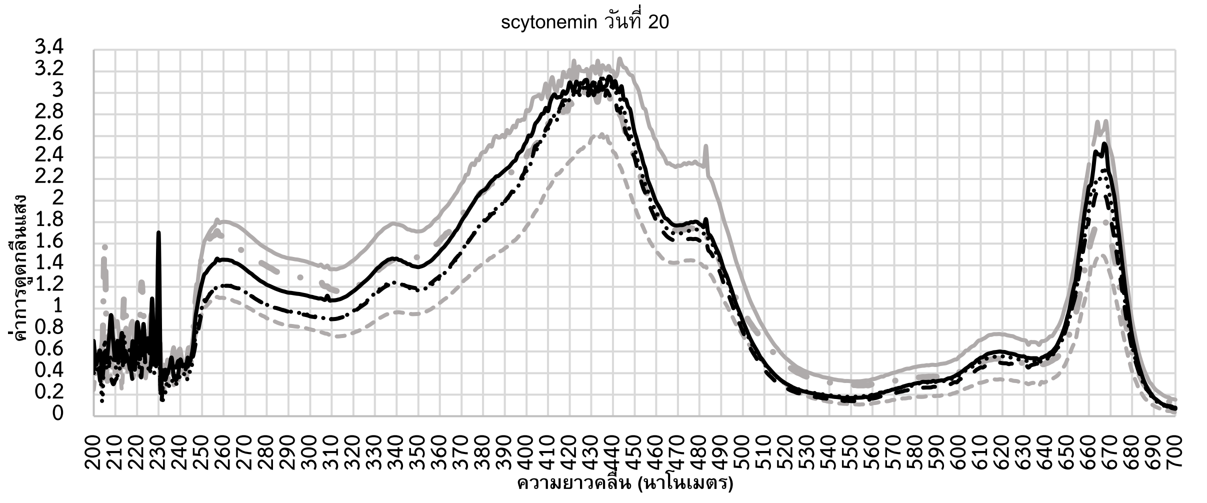
ผลการวิจัย

ผลจากการนำสารสกัดหยาบจากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) และโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร (ชุดทดลอง) เป็นเวลา10 15 และ 20 วัน และวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 700-200 นาโนเมตร เพื่อหาการมีอยู่ของ Scytonemin โดยการปรากฏจุดสูงสุดของกราฟ (Peak) การดูดกลืนแสงของ Scytonemin ที่ความยาวคลื่น 252, 278 และ 300 นาโนเมตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงเป็นเวลาวันที่ 10 และ15 ในอาหารชุดทดลอง ปรากฏ peak ของสารชีวภาพต่าง ๆ สูงกว่าสารสกัดหยาบจากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารชุดควบคุม และค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงเป็นเวลาวันที่ 20 ในอาหารเหลวชุดควบคุมปรากฏ peak ของสารชีวภาพต่าง ๆ สูงกว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวชุดทดลอง แต่ไม่พบ peak ของค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงเป็นเวลา 10, 15 และ 20 ที่ความยาวคลื่น 252, 278 และ 300 นาโนเมตร (ภาพที่ 1)

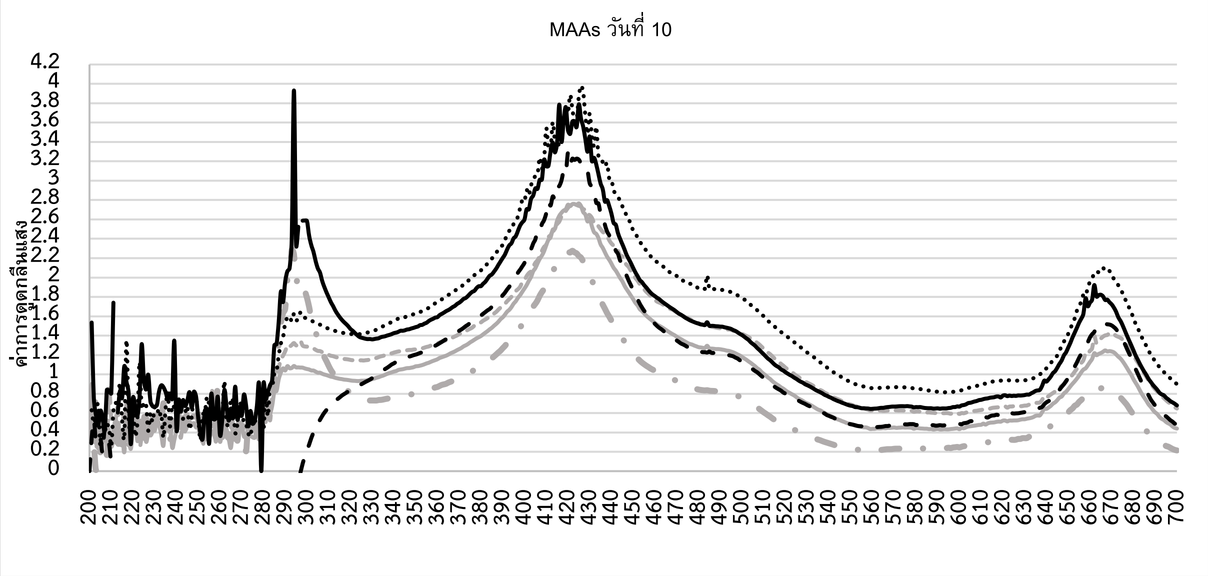


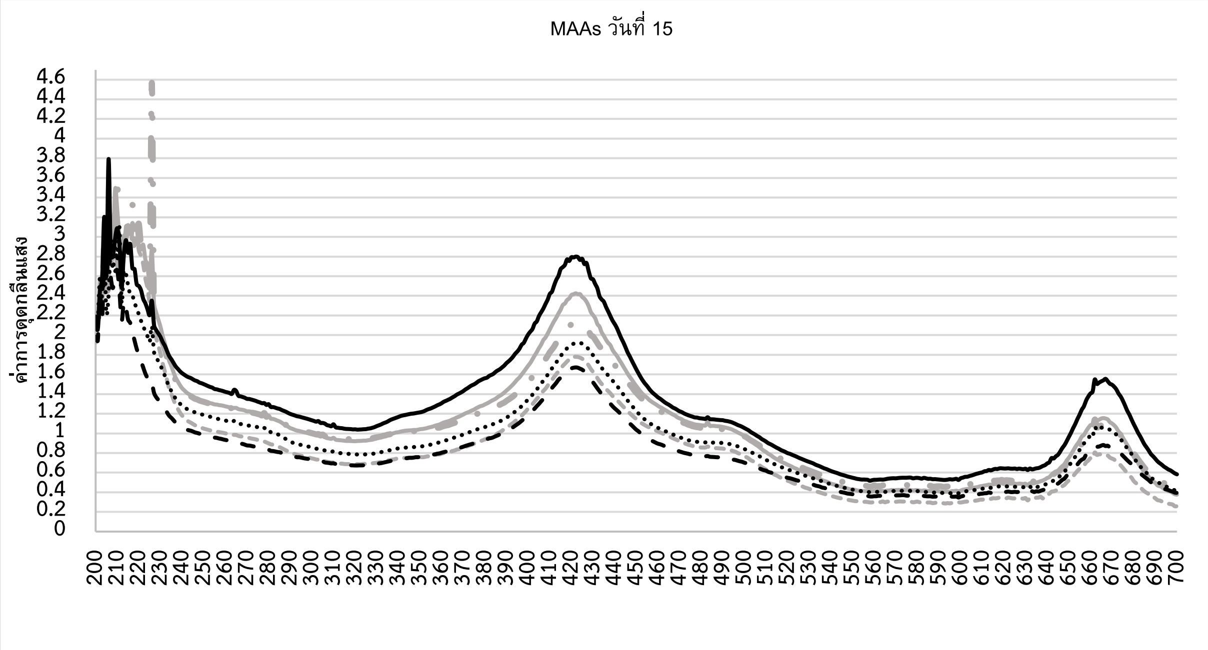
ภาพที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบ Scytonemin ที่สกัดจาก *Lyngbya* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) และ 0.75 กรัมต่อลิตร (ชุดทดลอง) ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 15 และ 20 วัน (▬ ▪ อาหารเหลBG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 1 ---- อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 2 ▬ อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 3 ▬ ▬ ▬ อาหารเหลวBG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 1 ········ อาหารเหลวBG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่2 ▬ อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 3)



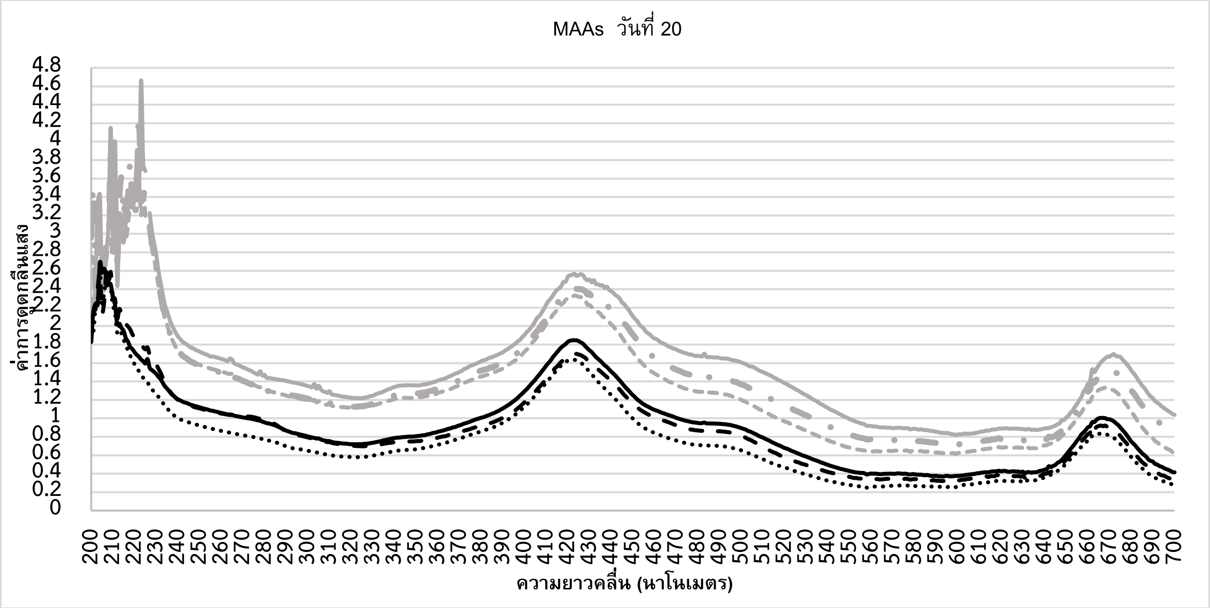


ภาพที่ 1(ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบ Scytonemin ที่สกัดจาก *Lyngbya* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) และ 0.75 กรัมต่อลิตร (ชุดทดลอง) ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 15 และ 20 วัน (อาหารเหลBG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 1 อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 2 อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 3 อาหารเหลวBG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 1 อาหารเหลวBG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่2 อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 3)





ภาพที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบ Mycosporine-like Amino Acids (MAAs)ที่สกัดจาก *Lyngbya* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) และ 0.75 กรัมต่อลิตร (ชุดทดลอง) ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10, 15 และ 20 วันของการทดลอง (อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 1 อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 2 อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 3 อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 1 อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 2 อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่3)



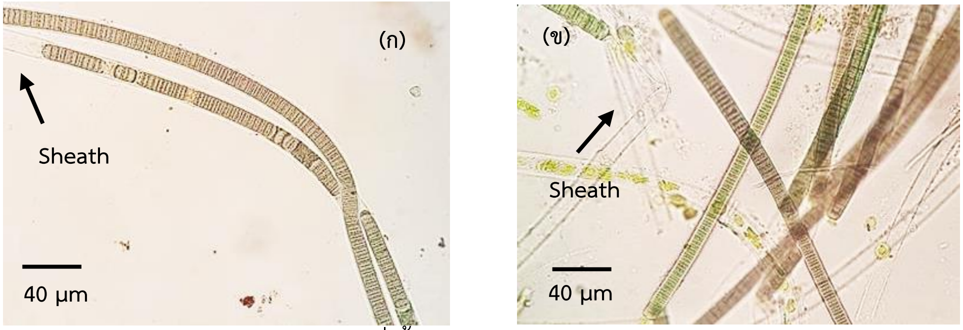
ภาพที่ 2 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบ Mycosporine-like Amino Acids (MAAs)ที่สกัดจาก *Lyngbya* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) และ 0.75 กรัมต่อลิตร (ชุดทดลอง) ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10, 15 และ 20 วันของการทดลอง (▬ · · อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 1 ---- อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 2 ── อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 3 ▬ ▬ อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 1······· อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75กรัมต่อลิตร ซ้ำที่ 2 ── อาหารเหลว BG11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร ซ้ำที่3)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lyngbya* sp. เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่มีปริมาณโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) และสูตรอาหาร BG-11 ที่มีปริมาณโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร (ชุดทดลอง) จำนวนชุดละ 3 ระยะเวลา 20 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า

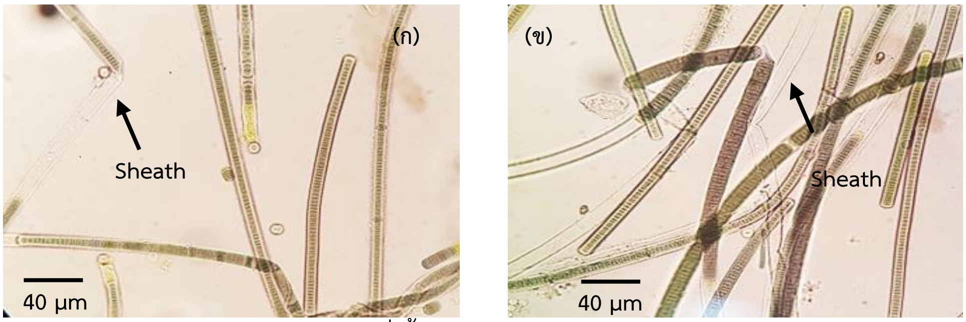
วันที่ 10 ของการทดลองเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ในอาหารเหลวชุดทดลองเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมีสีเหลืองซีด เซลล์มีขนาดใหญ่ มองเห็นเยื่อหุ้มเซลล์ (Sheath) และภายในเซลล์มีการบีบอัดทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ (ภาพที่ 3ก) ในอาหารชุดควบคุมเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมีขนาดเล็กกว่าชุดทดลอง บางเซลล์หลุดออกจาก sheath (ภาพที่ 3ข)

วันที่ 15 ของการทดลองเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ในอาหารเหลวชุดทดลองสังเกตเห็นช่องว่างระหว่าง sheath กับเส้นสายเซลล์ชัดเจนบางเซลล์หลุดออกจากเส้นสายลักษณะเป็นเซลล์รูปร่างกลมขนาดเล็กหลุดออกนอก sheath (ภาพที่ 4ก) ในอาหารเหลวชุดควบคุมเส้นสายของเซลล์มีขนาดใหญ่กว่าเส้นสายเซลล์ในชุดควบคุม บางเซลล์ตาย และหลุดออกมาจาก sheath ทำให้พบ sheath ที่ไม่มีเส้นสายเซลล์ภายในจำนวนมาก (ภาพที่ 4ข)

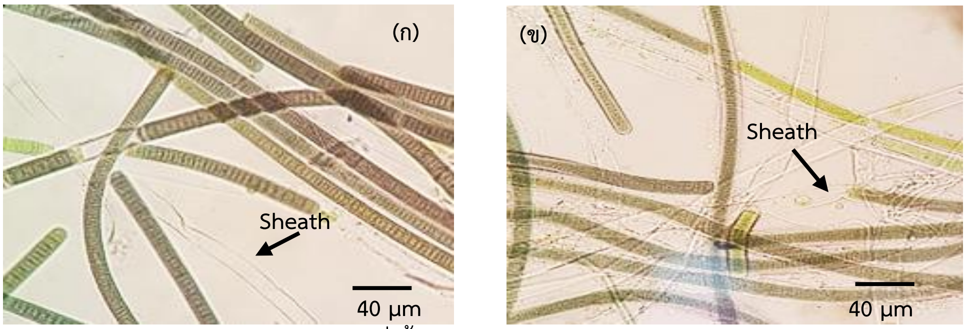
วันที่ 20 ของการทดลองเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ในอาหารเหลวชุดทดลองเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมีขนาดใหญ่ขึ้น มีสีม่วงอมดำมากกว่าเซลล์สีเขียว เส้นสายเซลล์ใหญ่เต็ม sheath ทำให้ไม่เห็นช่องว่างระหว่างเซลล์กับ sheath (ภาพที่ 5ก) ในอาหารเหลวชุดควบคุม เส้นสายเซลล์ยังมีเซลล์สีเขียวอ่อนจำนวนมาก แต่มี sheath ที่ภายในไม่มีเซลล์อยู่จำนวนมากเช่นกัน (ภาพที่ 5ข)



ภาพที่ 3 เซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ **(ก)** ในอาหารเหลวสูตร BG- 11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร **(ข)** ในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4 เซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ที่เลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ **(ก)** ในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร **(ข)** ในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 5 เซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ที่เลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ก) ในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 0.75 กรัมต่อลิตร (ข) ในอาหารเหลวสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรท 1.5 กรัมต่อลิตร

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากผลกราฟค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ที่วิเคราะห์หาการมีอยู่ของสารกันแดด Scytonemin และ MAAs กลับปรากฏ peak ของรงควัตถุต่าง ๆ และลดลงในวันที่ 20 ของการทดลองแสดงให้เห็นว่าธาตุไนโตรเจนอย่างเดียวไม่สามารถกระตุ้นให้ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngby* sp. สร้างสารกันแดด Scytonemin ได้ ในขณะที่ peak ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ที่วิเคราะห์หาการมีอยู่ของ MAAs ปรากฏขึ้นที่ความยาวคลื่นประมาณ 340 นาโนเมตรของตัวอย่างที่เลี้ยงได้ 15 และ 20 วันทั้งชุดควบคุมและชุดทดลอง การกระตุ้นให้ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya aestuarii* สร้างสารกันแดด Scytonemin ต้องใช้รังสียูวีร่วมด้วยจึงจะเห็นผลกระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มยีน Scytonemin ได้ เพราะรังสี UVA จะกระตุ้นทางอ้อมผ่านอนุมูลอิสระในเซลล์ รังสี UVB กระตุ้นทั้งทางตรงและทางอ้อมโดยทำลายทั้ง DNA RNA หรือโปรตีน และกระตุ้นอนุมูลอิสระให้รบกวนการทำงานของเซลล์ (Rastogi et al., 2017) ถึงแม้ว่ารังสี UV จะกระตุ้นให้ไซยาโนแบคทีเรียสร้างสารกันแดดแต่ต้องได้รับในความเข้มแสง และ

ระยะเวลาที่เหมาะสม นิตยาและกมลนิตย์ (2564) เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ที่ความเค็ม 0, 15, 30 และ 60 ppt ในห้องปฏิบัติการ(ห้องปฏิบัติการเดียวกับงานวิจัยนี้) ร่วมกับเลี้ยงกลางแจ้งนอกห้องปฏิบัติการที่มีความเข้มแสงของแสงแดดธรรมชาติในช่วงเวลา 11.00-14.00 น. สูงถึง 50,000-85,000 ลักซ์ พบว่าเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ที่ความเค็ม 45 และ 60 ppt ตายเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 10 เนื่องจากรังสียูวี และความร้อนจากแสงอาทิตย์ที่ทำให้อุณหภูมิของอาหารเหลวสูงจนไซยาโนแบคทีเรียตาย เซลล์แยกออกจากเส้นสายเป็นเศษเซลล์ พบ sheath เปล่าจำนวนมากไม่มีเส้นสายของเซลล์อยู่ภายใน ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ชนิดเดียวไม่สามารถที่จะทนต่อความเข้มแสงสูงเป็นระยะเวลานานได้ สารกันแดด Scytonemin ถูกวิเคราะห์พบในสารสกัดจากตัวอย่างส่วนบนของตะไคร่น้ำสีเขียวที่ประกอบไปด้วยไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์หลักคือ *Scytonema*, *Lyngbya* และ *Nostoc* ที่ปกคลุมหน้าดินบริเวณพื้นที่นา หลังคาบ้าน เปลือกต้นมะม่วงที่รับแสงแดดโดยตรงจากพระอาทิตย์ ในขณะที่สารกันแดด MAAs สร้างเป็นปกติในไซยาโนแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กบางชนิด (Pathak et al., 2015) โครงสร้างโมเลกุลของ Scytonemin ประกอบไปด้วยอะตอมไนโตรเจน 2 อะตอม ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างหรือสังเคราะห์ Scytonemin ต้องการธาตุไนโตรเจนเพิ่มขึ้น *Nostoc* ก็จะเปลี่ยนเซลล์ปกติไปเป็นเฮเทอโรซิสต์เซลล์เพื่อตรึงก๊าซไนโตรเจนจากบรรยากาศมาเป็นแหล่งของธาตุไนโตรเจนใช้ในการสร้าง Scytonemin (Fleming and Castenholz, 2008) ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. ที่ไม่มีเฮเทอโรซิสต์เซลล์ในการตรึงก๊าซไนโตรเจนจากอากาศต้องธาตุไนโตรเจนเพื่อเพิ่มผลผลิตชีวมวล สารชีวภาพต่าง ๆ ก่อนที่จะสร้างสารทุติยภูมิอื่น

งานวิจัยนี้จะสมบูรณ์และให้คำตอบที่ชัดเจนจะต้องนำสารสกัดไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารกันแดด Scytonemin และ MAAs ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนสารเคมีและเครื่องมือพื้นฐาน

เอกสารอ้างอิง

ณัฐสิทธิ์ จำรัสฉาย. (2560). *ผลของอุณหภูมิสีของหลอดแอลอีดีขาวและการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชิงแสงแบบอากาศยกต่อการเติบโตและการผลิตแคโรทีนอยด์ในจุลสาหร่าย Chlorococcum humicola* [วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย].

นิตยา ไชยเนตร และกมลนิตย์ กกฝ้าย. (2564). สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya* sp. เพื่อให้ผลิตสารป้องกันแสงแดด. ใน ดวงพร ภู่ผะกา (บ.ก.), *งานวิจัยและนวัตกรรมเพื่อการพัฒนาชุมชนเชิงพื้นที่. การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยราชภัฏกลุ่มศรีอยุธยา ครั้งที่ 11* (น. 611-617).

Derikvand, P., Llewellyn, C. A. and Purton, S. (2017). Cyanobacterial metabolites as source of sunscreens and moisturizers: a comparison with current synthetic compounds. *European Journal of Phycology, 52*(1), 43-56.

Fleming, E. D. and Castenholz, R. W. (2008). Effects of nitrogen source on the synthesis of the UV screening compound, scytonemin, in the cyanobacterium *Nostoc punciforme* PCC 73102. *FEMS Microbiology Ecology, 63*, 301-308.

Pathak, J., Richa, R. S.A. S., Kannaujiya, V.K. and Sinha, R. P. (2015). Isolation and partial purification of scytonemin and mycosporine-like amino acids from biological crusts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7*(1), 362-371.

Rastogi, R. P., Sonani, R. R. and Madamwar, D. (2017). *Algal green chemistry*. Netherlands: Elasevier B.V.

Rath, J., Mandal, S. and Adhikary, S.P. (2012). Salinity induced synthesis of UV-screening compound scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya aestuarii*. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology, 115*, 5-8.

Rath, J., Mandal, S. and Adhikary, S. P. (2014). Ecophysiology of the estuarine cyanobacterium *Lyngbya aestuarii* to varying salinity in vitro. *Acto Physiologiae Plantarum, 36*, 409-419.