

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีทรัพยากรธรรมชาติอย่างมากมายและมีความอุดมสมบูรณ์เป็นอย่างยิ่งไม่ว่าจะเป็นทรัพยากรป่าไม้ ทรัพยากรดิน ทรัพยากรน้ำ และทรัพยากรแร่ธาตุเป็นต้น ดินเป็นสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติเกิดจากการสลายพังพังของหินชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังพบสิ่งมีชีวิตมากมายที่อาศัยอยู่ในดินโดยเฉพาะจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์อย่างสูงในด้านนิเวศวิทยา เป็นผู้ย่อยสลายเศษซากต่างๆ เพื่อให้กลายเป็นห่วงโซ่อาหารปฐมภูมิจึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศ ดินจึงเหมาะเป็นแหล่งที่น่าสนใจต่อการศึกษาถึงความหลากหลายทางชีวภาพมาก

แอกติโนมัยสีท (actinomycete) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญงอกงามบางชนิดไม่ต้องการ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย มีตั้งแต่กลม ท่อน และเป็นเส้นคล้ายเชือกที่มีการแตกแขนง เชื้อกลุ่มนี้มีความสามารถในการสร้างสารต่างๆ ที่น่าสนใจและมีประโยชน์เป็นอย่างยิ่ง เช่น สารปฏิชีวนะ เอนไซม์ และวิตามินต่างๆ และยังพบว่ายาปฏิชีวนะใหม่ๆ หลายชนิดได้จากเชื้อแอกติโนมัยสีทหายาก แต่ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการกระจายตัวของเชื้อแอกติโนมัยสีทยังมีน้อย ในประเทศไทยเองการศึกษาชนิดและการกระจายของเชื้อกลุ่มนี้มีค่อนข้างจำกัด

ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาชนิดของแอกติโนมัยสีทและศึกษาความหลากหลายของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทย โดยทำการจัดจำแนกในระดับสกุล เพื่อรวบรวมเก็บรักษาไว้และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป เช่น ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ การผลิตเอนไซม์ที่สำคัญทางการค้า ได้แก่ protease cellulase และ xylanase เป็นต้น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อแอกติโนมัยสีทในดินส่วนใหญ่ที่พบเป็นเชื้อในกลุ่มของ *Streptomyces* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวและความหนาแน่นมากที่สุด เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะสร้างเส้นใยอาหาร (substrate

mycelium) ที่แตกกิ่งก้าน และสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ที่ประกอบด้วยสายสปอร์รูปแบบต่างๆ บางสายพันธุ์ของ *Streptomyces* มีโครงสร้างหุ้มสปอร์คล้าย sporangia, sclerotia มีโคโลนีเป็นแบบแผ่กระจายคล้ายไลเคน มีหลายสีได้แก่ ขาว เทา แดง เหลือง เขียว น้ำเงิน และม่วง ซึ่งเป็นสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบน ส่วนเส้นใยอาหารที่ด้านล่างของโคโลนีมักมีสีน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ ในการเจริญระยะแรกโคโลนีมีผิวเรียบ ต่อมาจะพัฒนาเส้นใยอากาศจนปรากฏเป็นกลุ่มก้อนคล้ายแป้ง (powdery) หรือกำมะหยี่ (velvet) โครโมโซมของ *Streptomyces* มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง (linear chromosome) มีขนาดจีโนมประมาณ 7.8-8.0 เมกะเบส ประกอบด้วยเบสกวานีน (guanine) และ ไซโตซีน (cytosine) ในอัตราสูง (high GC content) ประมาณ 70-74 เปอร์เซ็นต์ (Williams, 1989)

Streptomyces สร้างรงควัตถุเมลานินละลายออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นเกณฑ์หนึ่งในการจัดจำแนก *Streptomyces* ออกจากแอคติโนมัยซีทอื่นๆ ได้ และยังสามารถผลิตรงควัตถุชนิดอื่นๆ ได้จึงทำให้เห็นสีของเส้นใยแตกต่างกันบนอาหารแข็ง (Shirling and Gottlieb, 1966) นอกจากนี้ยังผลิตสาร geosmin ซึ่งมีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายกลิ่นดิน (earth odor) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.5-8.0 (Lechevalier and Lechevalier, 1970) แหล่งคาร์บอน และ ไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงาน เช่น กลูโคส กลีเซอรอล และ เพปไทน์ เป็นต้น มักทนเค็มได้ดีที่ 3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บางชนิดทนได้ถึง 13 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร (Williams, 1989)

นอกจากนี้ยังมีอีกกลุ่มที่จัดเป็นพวก *non-streptomycete* หรือ ที่เรียกว่าแอคติโนมัยซีทหายาก (rare actinomycete) ซึ่งมีอยู่ประมาณ 100 สกุลที่มีความหลากหลายทางด้านรูปร่าง นิเวศวิทยา และสายวิวัฒนาการ (Miyadoh, 1997) แอคติโนมัยซีทชนิดอื่นๆ เช่น *Micromonospora*, *Microtetraspora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Dectylosporangium* และ *Actinoplanes* เป็นต้น (Hayakawa et al., 1988) ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา มีการศึกษาแอคติโนมัยซีทหายากโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ (Lazzarini et al., 2000) โดยพบว่าประชากรของเชื้อ *Streptomyces* ในดินพบประมาณ 96 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Nocardia* พบ 2 เปอร์เซ็นต์ และ *Micromonospora* พบ 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสกุลอื่นน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (Kim, 1992) ดังนั้นการเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อจึงมีความสำคัญต่อการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทหายาก

จากข้อมูลของศาสตราจารย์ ดร. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด ได้เขียนไว้ในเรื่อง *Streptomyces* spp.: แบคทีเรียคุณค่าสูงจากธรรมชาติไว้ว่า *Streptomyces* เป็นเชื้อแบคทีเรียจัดอยู่ในไฟลัม (phylum) และคลาส (class) ชื่อเดียวกัน คือ Actinobacteria อยู่ใน Order Actinomycetales ซึ่งเชื้อทั้งหมดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก *Streptomyces* เป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่มี G+C content สูงมาก ใน order Actinomycetales จัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียออกเป็นจำนวน 40 families ตามข้อมูลของ Catalogue of life (2007) ซึ่งใน order Actinomycetales มีแบคทีเรียทั้งที่มีประโยชน์และก่อโรคแก่มนุษย์และสัตว์ แต่อาจแบ่งกลุ่มเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ กลุ่ม Coryneform (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas*) กลุ่ม Propionic acid bacteria (*Propionibacterium*, *Eubacterium*), กลุ่มที่เป็น Obligate anaerobes (*Bifidobacterium*, *Acetobacterium*) และกลุ่ม Actinomycetes ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่อยู่เป็นสายยาว (filament) และมีเชื้อหลายชนิดในกลุ่มนี้สร้าง mycelium คล้ายเชื้อรา และอาจแตกกิ่ง (branching) เชื้อในกลุ่ม Actinomycetes แบ่งออกเป็น

8 กลุ่มย่อย ตามข้อมูลของหนังสือ Brock: Biology of Microorganism (Madigan et al, 2009) ซึ่งมีการใช้ชื่อซ้ำกันทำให้อาจสับสนได้ จึงขอกล่าวถึงทั้ง 8 กลุ่ม ดังนี้

1. Group I Actinomycetes เชื้อในกลุ่มนี้ไม่สร้าง mycelium ตัวอย่างเช่น *Actinomyces* (อยู่ใน Family *Actinomycetaceae*)
2. Group II Mycobacteria อยู่ใน Family *Mycobacteriaceae* ที่รู้จักกันมาก เพราะก่อโรคที่สำคัญ คือ วัณโรค ได้แก่ *Mycobacterium tuberculosis*
3. Group III Nitrogen-fixing actinomycetes ซึ่งเป็นเชื้อที่ตรึงไนโตรเจนในไม้เนื้อแข็ง อยู่ใน Family *Frankiaceae* ตัวอย่างเช่น *Frankia* เชื้อกลุ่มนี้สร้าง mycelium
4. Group IV Actinoplanes เชื้อในกลุ่มนี้จะสร้าง mycelium และสปอร์ ภายใน sporangia ตัวอย่างเช่น *Actinoplanes* (Family *Micromonosporaceae*), *Streptosporangium* (อยู่ใน Family *Streptosporangiaceae*)
5. Group V Dermatophilus group สร้าง mycelia filament แต่ไม่สร้าง aerial mycelium ตัวอย่างเช่น *Dermatophilus* (อยู่ใน Family *Dermatophilaceae*), *Geodermatophilus* (อยู่ใน Family *Geodermatophilaceae*)
6. Group VI Nocardias ตัวอย่างเช่น Family *Nocardiaceae* ได้แก่ เชื้อใน Genus *Nocardia*
7. Group VII Streptomycetes เป็นเชื้อในกลุ่มที่สร้าง aerial mycelium จำนวนมาก และสร้างสปอร์ที่มักเป็นสายยาว ที่รู้จักและใช้ประโยชน์กันมาก คือ *Streptomyces*, *Streptoverticillium* และ *Kitasatospora* (ทั้งหมดอยู่ใน Family *Streptomycetaceae*) และ *Sporichthya* (อยู่ใน Family *Sporichthyaceae*)
8. Group VIII Micromonosparas group สร้าง mycelium และมักสร้างสปอร์เดี่ยว แต่ก็อาจพบสปอร์แบบคู่หรือสายสั้นๆ ตัวอย่างเช่น *Micromonospora* (Family *Micromonosporaceae*), *Microbispora* (Family *Streptosporangiaceae*), *Thermmoonospora* (Family *Thermomonosporaceae*)

จะเห็นได้ว่า Actinomycetes จะหมายถึงแบคทีเรียทั้ง 8 กลุ่มใหญ่หรืออาจหมายถึง แบคทีเรียใน Group I ซึ่งอยู่ใน Family *Actinomycetaceae* ขณะที่ Streptomycetes จะหมายถึงเชื้อใน Family *Streptomycetaceae* และ Family *Sporichthyaceae* สำหรับเชื้อที่อยู่ใน Family *Streptomycetaceae* จะมีอยู่หลาย genera ได้แก่ *Kitasatospora*, *Streptacidiphilus*, *Streptomyces* และ *Streptoverticillium* อย่างไรก็ตาม ขอให้เข้าใจว่าการจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียนั้น อยู่บนพื้นฐานของข้อมูลต่างๆ ที่มีอยู่ในปัจจุบัน หากมีการพบข้อมูลด้านต่างๆ เพิ่มขึ้นอาจมีการจัดแบ่งกลุ่มเชื้อใหม่ หรือกำหนด Family หรือ genus ขึ้นใหม่ได้

ในปี ค.ศ. 1988 Nonomura และ Hayakawa ได้พัฒนาวิธีสำหรับแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งวิธีเหล่านี้อาศัยเทคนิคต่างๆ ประกอบด้วยกันคือ pretreatment techniques กับ enrichment techniques ที่มีการเติมสารบางอย่างเข้าไปเพื่อคัดแยกเชื้อหายาก (Hayakawa, 1990)

เชื้อแอคติโนมัยซีทหายากที่แยกจากอาหาร selective medium จากดินในญี่ปุ่น (Hayakawa, 2008) ได้แก่ *Actinoplanes*, *Actinokineospora*, *Acrocarpospora*, *Actinosynnema*, *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Catenuloplanes*, *Cryptosporangium*, *Dactylosporangium*,

Kineosporia, *Kutzneria*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Microtetrastroma*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Thermomonospora*, *Pseudonocardia*, *Thermobifida*, *Saccharomonospora*, *Spirilliplanes*, *Streptosporangium* และ *Virgosporangium*

การเจริญของเชื้อในกลุ่มนี้จะใช้เวลานานกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ทำให้การแก่งแย่งอาหารในการเจริญไม่ดี รวมถึงในสภาวะธรรมชาติเช่นกัน ดังนั้นการแยกเชื้อเหล่านี้จึงต้องมีการพัฒนาโดยการเติมสารบางอย่างลงไปเพื่อไปยังยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ เพื่อให้เหลือเพียงแอคติโนมัยีสที่ที่สามารถเจริญได้เพียงอย่างเดียว (Cross, 1982) ในปี ค.ศ. 1987 Hayakawa และ Nonomura ค้นพบสูตรอาหาร Humic acid-vitamin (HV) agar ซึ่งเป็นอาหารสูตรใหม่ที่ประกอบด้วย humic acid จากดินซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน อาหารนี้ช่วยในการเจริญของสปอร์ และช่วยในการจัดจำแนกเชื้อได้ง่ายขึ้น โดย HV agar จะถูกเติมด้วยสารยับยั้งแบคทีเรียด้วย nalidixic acid และ trimethoprim (Hayakawa et al., 1996a) นอกจากนี้ยังมีอาหารอื่นๆอีก เช่น LSV-SE agar ซึ่งประกอบด้วย Kraft lignin เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน อาหารนี้ช่วยเพิ่มปริมาณเชื้อ *Microtetrastroma* spp. (Hayakawa et al., 1996b)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและอุปกรณ์

จานเพาะเชื้อ (petri dish) ขนาด 9 เซนติเมตร
ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาดปริมาณ 20 และ 1,000 ไมโครลิตร
หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 15 และ 25 มิลลิลิตร
ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
เวอร์เนียร์คาลิเปอร์
กล้องถ่ายรูป ยี่ห้อ Canon รุ่น 500D ประเทศญี่ปุ่น
กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) ยี่ห้อ Olympus ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องซั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ ADAMEQUIPMENT รุ่น ABCplus 150 ประเทศอังกฤษ
หม้อนึ่งฆ่าเชื้ออัตโนมัติ (autoclave) ยี่ห้อ Uturdy ประเทศไต้หวัน
เครื่องวัดความเป็นกรด - เบส (pH meter) ยี่ห้อ Consort รุ่น C860 ประเทศเบลเยียม
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet) ยี่ห้อ Dwyer รุ่น mark II ประเทศสหรัฐอเมริกา
ตู้อบเชื้อ (incubator) ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น 400 ประเทศเยอรมนี
อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ของเชื้อจะให้อาหารเลี้ยงเชื้อ Strach casien agar ที่มี Carboxymethyl Cellulose (CMC), avicel, xylan, locust bean gum, polybutylene succinate (PBS), skim milk, เป็นต้น

อาหารเลี้ยงเชื้อ actinomyces medium

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาลักษณะของแอคติโนมัยซีท ISP 2 Yeast extract-malt extract agar, ISP 3 Oatmeal agar และISP 4 Inorganic salt-starch agar

วิธีดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากดินรอบต้นชวนชมที่ปลูกในกระถาง, ดินแ่งกระถาง จ.เพชรบุรี, ดินรอบต้นชวน, ดินอำเภอเชียงราก จ.ปทุมธานี ดินสถาบันเทคโนโลยีปทุมวัน และดินจากป่าชายเลน จ.สตูลทำการเก็บดินโดยใช้พลั่วตักดินชุดลึกจากผิวดินลงไป 1-10 เซนติเมตรใส่ในถุงพลาสติกกรัดยางปากถุงให้แน่น เมื่อนำกลับมาห้องปฏิบัติการนำตัวอย่างออกมาแผ่แล้วปล่อยให้ตัวอย่างแห้งในที่ร่ม แล้วบดให้ละเอียดเก็บไว้ในภาชนะที่มีดซิ

2. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินตัวอย่าง

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินที่เตรียมด้วยวิธีการที่ต่างกัน 4 วิธี คือ

2.1 เจือจางตัวอย่างดินที่ความเจือจาง 1:100 ในสารละลาย ผสมของ yeast extract ความเข้มข้น 6% และ SDS ความเข้มข้น 0.05% ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และจากนั้นเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นในความเจือจางที่เหมาะสม (Nonomura และ Hayakawa, 1988) และวิธีที่เสนอโดย Hayakawa และคณะ (1991) ดังต่อไปนี้

2.2 อบดินที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง และนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่มีความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-4}

2.3 แช่ดินที่ความเจือจาง 1:10 ด้วยสารละลาย phenol ความเข้มข้น 1.5% นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นที่ความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-4}

2.4 อบดินที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ร่วมกับแช่ดินที่ความเจือจาง 1:10 ด้วยสารละลาย phenol ความเข้มข้น 1.5% นาน 30 นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

หลังจากนั้นเกลี่ยตัวอย่างดินที่เตรียมด้วยวิธีการทั้ง 4 วิธี ที่ระดับความเจือจางต่างกันบนอาหาร Starch-Casein agar บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญจากตัวอย่างดิน ทำการคัดแยกไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สนใจ นำมาซีดลงบนอาหาร Starch-Casein agar บ่มให้เชื้อเจริญและแยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์

3. การทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีทในการผลิตเอนไซม์

นำเชื้อบริสุทธิ์มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารชนิดต่างๆ บนอาหารแข็ง SC ที่เติมสับสเตรทต่างๆ กันได้แก่ 1% tributyrin สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ esterase, 1% oleic acid สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ lipase, 1% skim milk สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ proteinase, 1% carboxymethyl cellulose และ 1% avicel สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ cellulase, 1% polybutylene succinate (PBS) สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ depolymerase, 0.5% Beech wood xylan สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ xylanase และ 0.5% Locust bean gum สำหรับ

ทดสอบการผลิตเอนไซม์ mananase เชื้อแอคติโนมัยสียที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่จำเพาะต่อการย่อยสลายสับสเตรทแต่ละชนิดจะสร้างวงใส (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นๆ และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในหน่วยมิลลิเมตร (mm) เปรียบเทียบวงใสที่เกิดขึ้นเพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดและศึกษาลักษณะของเชื้อต่อไป

4. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีย

ใช้ลูปเชี่ยเชื้อแอคติโนมัยสียที่แยกได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์มาขีดเป็นเส้นตรงในแนวกึ่งกลาง แลชิดลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 2, ISP 3, ISP 4 ในแนวตั้งฉากกับแนวของเชื้อแอคติโนมัยสียที่ขีดไว้เดิม บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-7 วัน

5. การจัดจำแนกไอโซเลท

ในการจัดจำแนกไอโซเลทจะใช้ส่วนของยีน 16S rDNA fragment มาทำ PCR โดยมีการออกแบบ universal oligonucleotide primers ในการทดลองได้ออกแบบไพรเมอร์ดังนี้

16sE8-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)

16sE1509-R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT)

โดยในการออกแบบได้ประยุกต์วิธีของ Lane (1991) สำหรับการทำ PCR จะใช้ Chromosomal DNA ของแต่ละไอโซเลทเป็น template DNA โดยขั้นตอนในการทำ PCR มีดังนี้ เริ่มจากผสม PCR reaction mixture: chromosomal DNA (50-100 ng), 1X PCR buffer, 0.1 μ M ของ 16sE8-F และ 16sE1509-R, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.03 U *Taq* DNA polymerase สำหรับ PCR reaction condition จะดำเนินการดังนี้ เริ่มจากต้องทำให้สาย DNA แยกออกจากกันโดยจะใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนของการเพิ่มจำนวน DNA (amplification) จะตั้งโปรแกรมให้ดำเนินการ 30 cycles ซึ่งจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้คือ ขั้นตอน Denaturing จะใช้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน Annealing จะใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน Extension จะใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที หลังจากทำ ครบ 30 cycles ก็จะทำ Extension อีกครั้งที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำมา ทำให้เย็นลงที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการทำให้ PCR นี้จะอาศัยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (PCR machine)

PCR product ที่ได้จะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัย NucleoSpin[®] Extract II Kit จากนั้น นำมาตรวจสอบขนาดของ PCR product ที่ได้โดยอาศัยการทำใน 1% agarose gel electrophoresis สำหรับการจัดจำแนกไอโซเลทนั้นจะดำเนินการดังนี้ นำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบสโดยอาศัยการทำ ABI PRISM BigDyeTM หลังจากที่ได้ลำดับเบสของแต่ละไอโซเลทมาแล้วก็จะทำการวิเคราะห์โดยอาศัย BLAST program เพื่อศึกษาว่าแต่ละไอโซเลทมีลำดับเบสของ 16S rDNA เหมือน (homology) เชื้อใดในฐานข้อมูล

6. การศึกษาลักษณะของแอคติโนมัยสียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

(SEM)

เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Rye medium ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 14 วัน จากนั้นศึกษาลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสียโดยใช้วิธีการของวิลเลียมและเดวิส (Williams และ Davies, 1967)

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การตรวจนับและแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท

การทดลองการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ต่างๆ จากดินในบริเวณต่างๆ ดังนี้

- ดินรอบต้นชวนชมที่ปลูกในกระถางที่บ้าน
- ดินจากแก่งกระจาน จ.เพชรบุรี
- ดินจากอำเภอยะรัง จ.ปทุมธานี
- ดินจากสถาบันเทคโนโลยีปทุมวัน
- ดินรอบต้นขนุนที่บ้าน

โดยทำการตรวจนับเชื้อบนอาหาร Starch Casein agar ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีท ที่พบในดิน

I. ดินรอบต้นชวนชมที่ปลูกในกระถางที่บ้าน	3.4×10^7 CFU/g
II. ดินจากแก่งกระจาน จ.เพชรบุรี	1.4×10^7 CFU/g
III. ดินจากอำเภอยะรัง จ.ปทุมธานี	1.8×10^7 CFU/g
IV. ดินจากสถาบันเทคโนโลยีปทุมวัน	3.7×10^6 CFU/g
V. ดินรอบต้นขนุนที่บ้าน	2.8×10^5 CFU/g

สำหรับที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบในดิน ดินสถาบันเทคโนโลยีปทุมวัน 3.4×10^4 CFU/g

เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จำนวนทั้งสิ้น 50 ไอโซเลท ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ ดังนี้

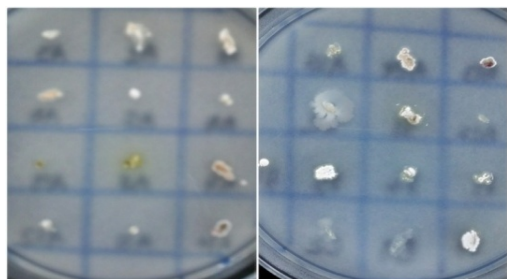
● ดินรอบต้นชวนชมที่ปลูกในกระถาง	17 ไอโซเลท
● ดินแก่งกระจาน จ.เพชรบุรี	7 ไอโซเลท
● ดินรอบต้นขนุน	2 ไอโซเลท
● ดินอำเภอยะรัง จ.ปทุมธานี	22 ไอโซเลท
● ดินสถาบันเทคโนโลยีปทุมวัน	2 ไอโซเลท

เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จำนวนทั้งสิ้น 6 ไอโซเลท ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ ดังนี้

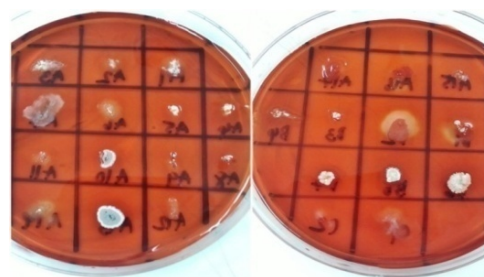
● ดินสถาบันเทคโนโลยีปทุมวัน	6 ไอโซเลท
-----------------------------	-----------

2. การทดสอบความสามารถในผลิตเอนไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยสีท

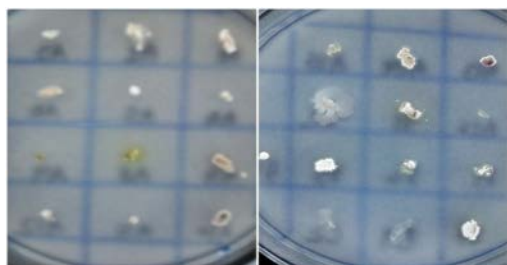
นำเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่ทำการคัดแยกได้ทั้ง 56 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารชนิดต่างๆ บนอาหารแข็ง Starch Casein agar ที่เติมสับสเตรทต่างๆกัน ดังแสดงในรูปที่ 1 รูปที่ 2 และรูปที่ 3



skim milk



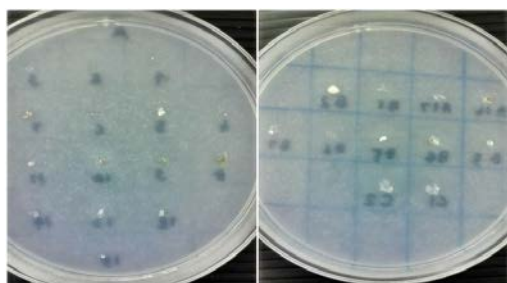
carboxymethyl cellulose (CMC)



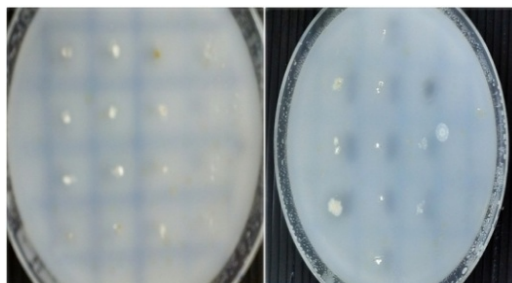
avicel



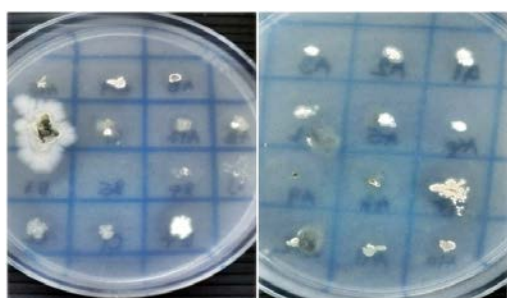
beech wood xylan



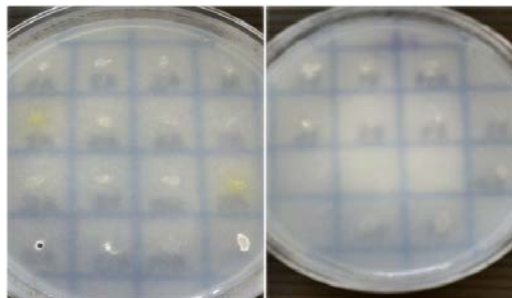
tributyrin



oleic acid

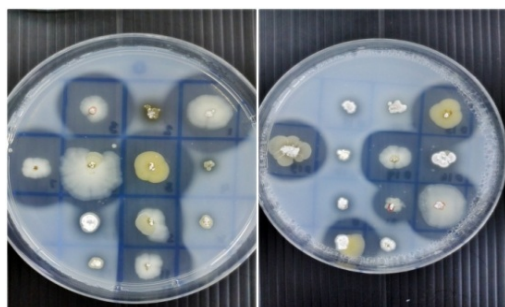


locust bean gum

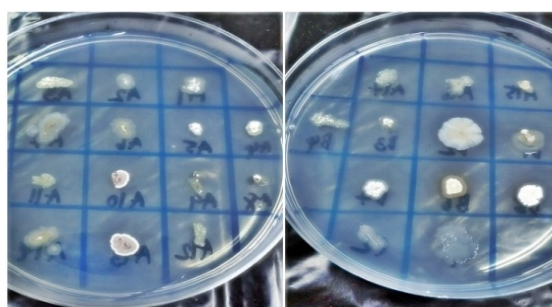


polybutylene succinate (PBS)

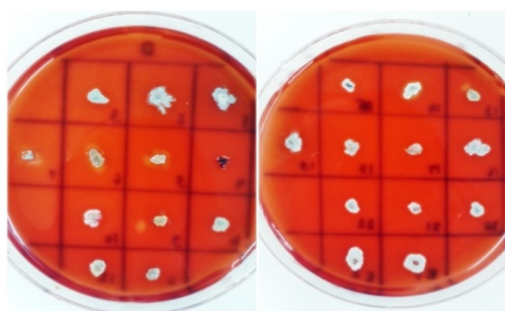
รูปที่ 1 ขนาดวงใสที่เกิดขึ้นของเชื้อไอโซเลท A1-A17, B1-B7 และ C1-C2 เมื่อบ่มภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



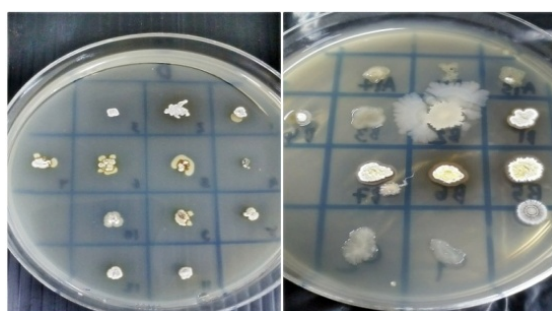
skim milk



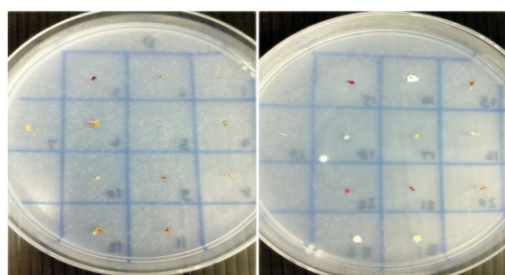
carboxymethyl cellulose (CMC)



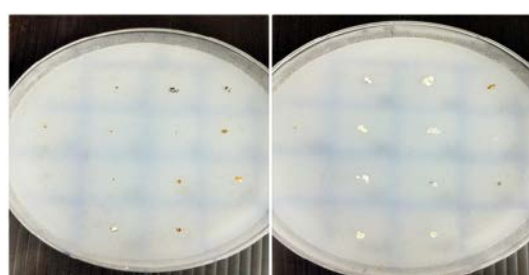
avicel



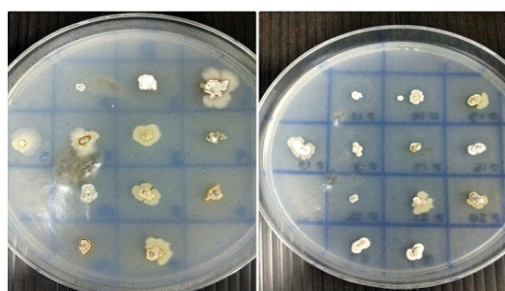
beech wood xylan



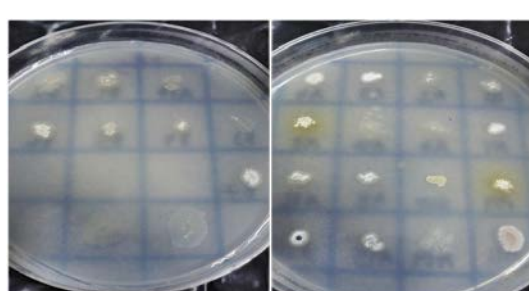
tributyrin



oleic acid



locust bean gum

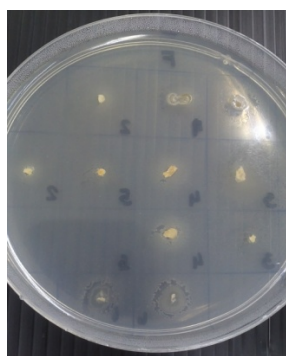


PBS

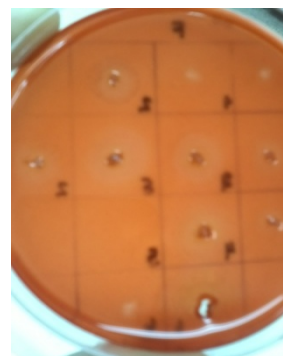
รูปที่ 2 ขนาดวงใสที่เกิดขึ้นของเชื้อไฮโซเลท D1-D22 และ E1-E2 เมื่อบ่มภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



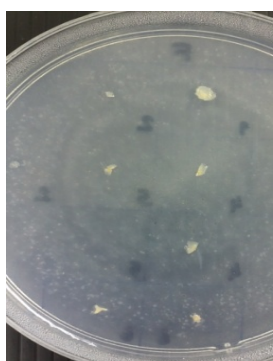
skim milk



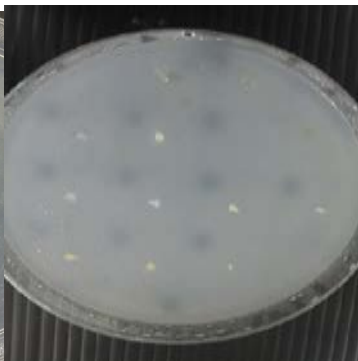
CMC



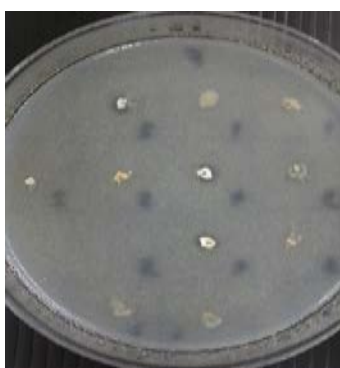
avicel



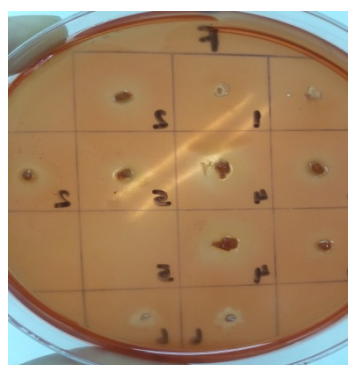
tributyrin



oleic acid



PBS



beech wood xylan

รูปที่ 3 ขนาดวงใสที่เกิดขึ้นจากเชื้อไอโซเลท TF1-TF6 เมื่อบ่มภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

การทดสอบการผลิตเอนไซม์จากทุกไอโซเลทบนอาหาร SC ที่มีสับสเตรทชนิดต่างๆ นั้นได้สรุปขนาดวงใสที่เกิดขึ้นไว้ในตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ดังนี้

ตารางที่ 1 ผลของขนาดวงใส (มิลลิเมตร) ที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งที่มีสับสเตรทต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เชื้อแอ คตินิมัย สีท	สับสเตรทที่ใช้ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ (วัดขนาดวงใสในหน่วย มิลลิเมตร)							
	skim milk	carboxymethyl cellulose (CMC)	avicel	tributyrin	oleic acid	beech wood xylan	locust bean gum	PBS
A1	0.5	-	-	-	-	1.0	-	-
A2	0.5	-	-	-	-	1.0	-	-
A3	1.0	-	-	-	-	1.5	-	-
A4	2.0	-	-	1.0	-	1.5	-	-
A5	2.0	-	-	1.5	-	1.5	-	-
A6	0.5	-	-	1.5	-	2.0	-	-
A7	0.5	0.5	-	2.0	-	2.5	-	-
A8	1.5	-	-	-	-	6.5	-	-
A9	0.5	-	-	1.0	-	3.5	-	-
A10	7.0	-	-	1.5	-	3.0	-	-
A11	1.0	0.5	-	1.0	-	1.5	-	-
A12	1.0	-	-	1.0	-	2.0	-	-
A13	5.0	-	-	1.0	-	1.0	-	-
A14	0.5	-	-	1.5	-	2.0	-	-
A15	1.0	-	-	-	-	2.5	-	-
A16	-	-	-	-	-	-	-	-
A17	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	2.0	-	-	-	1.5	-	-
B2	3.0	3.0	-	-	-	4.5	-	-
B3	0.5	-	-	-	-	-	-	-
B4	0.5	-	-	2.0	-	2.0	-	-
B5	0.5	-	-	2.0	-	1.5	-	-

B6	0.5	–	–	1.5	–	2.0	–	–
B7	0.5	–	–	1.0	–	2.0	–	–
C1	5.0	–	–	–	–	–	–	–
เชื้อแอ คติ โนมัยสีท	สับสเตรทที่ใช้ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ (วัดขนาดวงใสในหน่วย มิลลิเมตร)							
	skim milk	carboxymethyl cellulose (CMC)	avicel	tributyrin	oleic acid	beech wood xylan	locust bean gum	PBS
C2	4.5	–	–	–	–	–	–	–
D1	8.5	2.0	–	–	–	5.0	2.0	–
D2	2.5	4.0	–	–	–	4.5	2.0	–
D3	8.5	–	–	–	–	1.5	–	–
D4	1.0	3.0	–	–	–	4.0	2.0	–
D5	7.0	–	–	–	–	3.0	–	–
D6	4.0	–	–	1.0	–	2.0	–	–
D7	9.0	–	–	–	–	2.0	–	–
D8	–	–	–	–	–	2.5	–	–
D9	7.0	–	–	–	–	3.0	–	–
D10	1.5	4.0	–	–	–	3.0	–	–
D11	7.0	–	–	0.5	–	1.5	–	–
D12	1.5	–	–	0.5	–	1.0	–	–
D13	7.0	–	–	1.0	–	3.0	2.0	–
D14	1.0	3.0	–	–	–	3.5	1.5	–
D15	1.0	2.0	–	–	–	3.5	2.0	–
D16	1.0	4.5	–	0.5	–	4.0	2.0	–
D17	8.0	–	–	1.0	–	4.0	2.5	–
D18	0.5	–	–	1.0	–	3.0	2.5	–
D19	5.5	4.5	–	–	–	4.0	1.0	–
D20	5.0	–	–	–	–	2.0	1.0	–

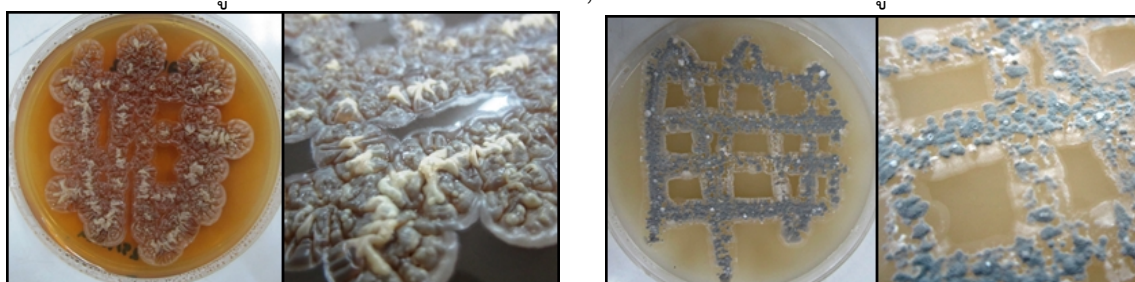
D21	4.5	3.0	–	–	–	3.0	–	–
D22	2.5	–	–	–	–	3.0	1.0	–
E1	0.5	3.5	–	–	–	4.0	–	–
E2	4.0	2.5	–	–	–	4.5	–	–

ตารางที่ 2 ผลของขนาดวงใส (มิลลิเมตร) ที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งที่มีสับสเตรทต่างๆ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

สับสเตรทที่ใช้ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์								
เชื้อแอคติโนมัยสีท	(วัดขนาดวงใสในหน่วย มิลลิเมตร)							
	skim milk	CMC	avicel	tributyrin	oleic acid	beech wood xylan	locust bean gum	PBS
TF1	–	3.0	1.0	2.0	–	–	–	4.0
TF2	3.0	–	3.0	–	–	3.0	–	1.0
TF3	3.5	–	5.5	–	–	8.0	–	–
TF4	1.5	–	4.5	–	–	6.0	–	1.0
TF5	5.0	–	2.0	–	–	3.5	–	–
TF6	6.0	1.5	–	–	–	7.0	–	–

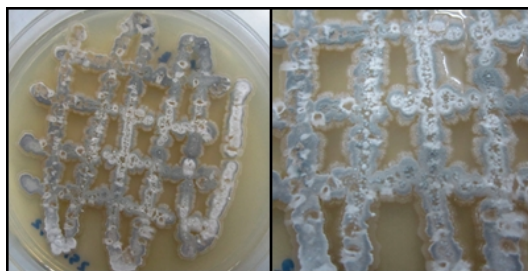
3. การศึกษาพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ในการศึกษาพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทได้เลือกไอโซเลท TF1 และ TF4 มาศึกษาเพราะมีความน่าสนใจเนื่องจากเป็นไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดและเป็นเอนไซม์ที่ทนร้อนซึ่งมีความน่าสนใจในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมในอนาคต การเจริญของเชื้อ TF1 บนอาหาร IPS2, IPS3 และ IPS4 แสดงดังรูปที่ 4 และ TF4 บนอาหาร IPS2, IPS3 และ IPS4 แสดงดังรูปที่ 5



TF1 บน IPS2

TF1 บน IPS3

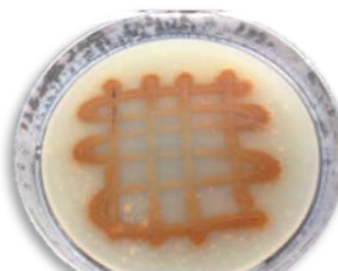


TF1 บน ISP4

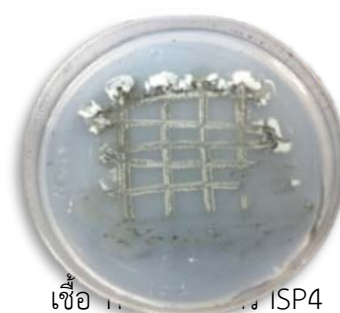
รูปที่ 4 การเจริญของเชื้อ TF1 บนอาหาร IPS2, IPS3 และ IPS4 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน



เชื้อ TF1 บนอาหาร IPS2



เชื้อ TF1 บนอาหาร IPS3



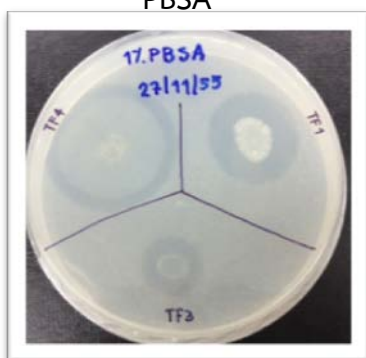
เชื้อ TF1 บนอาหาร IPS4

รูปที่ 5 การเจริญของเชื้อ TF4 บนอาหาร IPS2, IPS3 และ IPS4 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

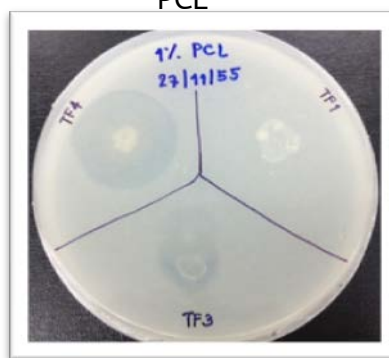
4. การศึกษาความสามารถของเชื้อ TF1 TF3 และ TF4 ที่สามารถย่อยพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ โดยใช้อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส

ในการทดลองนี้ได้ใช้พลาสติกชีวภาพ polylactic acid (PLA), polycaprolactone (PCL), PBS (polybutylene succinate) และ PBSA (polybutylene succinate-co-adipate) เป็นสับสเตรตผสมกับอาหาร SC agar ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลการทดลองสรุปพบว่า TF 1 สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PBS, PBSA และ PLA ได้ดีที่สุด TF 3 สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PBSA และ PCL และ TF4 สามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ PBS, PBSA และ PCL แสดงในรูปแบบที่ 6 และสรุปขนาดวงใสไว้ในตารางที่ 3

PBSA



PCL



PBS



PLA



รูปที่ 6 การศึกษาการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ จากเชื้อ TF1 TF3 และ TF4 ตารางที่ 3 ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) ในการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพจากเชื้อสายพันธุ์ TF1 TF3 และ TF4

Substrate พลาสติกชีวภาพ	ขนาด clear zone (มิลลิเมตร)		
	TF1	TF3	TF4
PBS	4.0	-	1.0
PBSA	8.0	4.0	3.0
PLA	2.0	-	-
PCL	-	3.0	1.0

5. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ

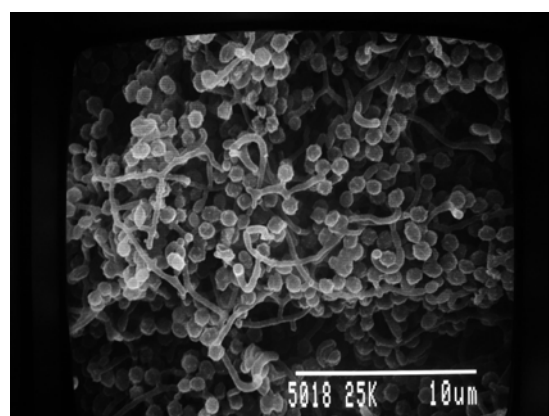
นำไอโซเลท TF1 TF3 และ TF4 หาลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อสายพันธุ์ TF1 มีความใกล้เคียงกับ *Actinomadura miaoliensis* (99%) สายพันธุ์ TF3 มีความใกล้เคียงกับ *Brevibacillus agri* (99%) ซึ่งไม่ใช่เชื้อในกลุ่มแอสโคไมซีต และสายพันธุ์ TF4 มีความใกล้เคียงกับ *Laceyella sacchari* (99%) หรือ *Thermoactinomyces* (99%) ตามลำดับ

6. การศึกษาลักษณะของเชื้อสายพันธุ์ TF1 และ TF4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

เมื่อเลี้ยงเชื้อ TF1 และ TF4 บนอาหารแข็ง Rye medium เป็นเวลา 12 วัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ TF1 มีสปอร์ลักษณะคล้ายหนามรอบๆ ฝัวยสปอร์ ส่วน TF4 สปอร์มีลักษณะกลมรอบเส้นใย ดังแสดงในรูปที่ 7



TF1



TF4

รูปที่ 7 ลักษณะ aerial mycelium ของเชื้อ *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ TF1 และ *Laceyella* sp. สายพันธุ์ TF4 โดยเลี้ยงบนอาหาร Rye medium ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

การทดลองนี้สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้สายพันธุ์ต่างๆ จากดินในบริเวณต่างๆ โดยทำการตรวจนับเชื้อบนอาหาร Starch Casein agar ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมีปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบในดินมากกว่าอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เนื่องจากเชื้อส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile สำหรับเชื้อที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสนั้นจัดอยู่ในกลุ่ม thermophile ในการคัดแยกเชื้อนั้นได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลทโดยพบว่าการคัดแยกได้จากวิธีการเตรียมตัวอย่างดิน 2 วิธี คือ วิธีที่1) เจือจางตัวอย่างดินที่ความเจือจาง 1:100 ในสารละลายผสมของ yeast extract ความเข้มข้น 6% และ SDS ความเข้มข้น 0.05% ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และวิธีที่3) แช่ดินที่ความเจือจาง 1:10 ด้วยสารละลาย phenol ความเข้มข้น 1.5% นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นที่ความเจือจางที่เหมาะสมซึ่งทั้งสองวิธีนี้ใช้ตัวอย่างดินที่ไม่ผ่านการอบที่ 120 องศาเซลเซียสเป็นวิธีที่ดีที่สุดที่สามารถแยกเชื้อได้มากกว่าวิธีอื่นๆ

การวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งที่มีสับสเตรทต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ที่แยกได้ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสามารถผลิตเอนไซม์ย่อย skim milk ซึ่งเป็นสับสเตรทประเภทโปรตีน และสามารถผลิตเอนไซม์มาย่อย beech wood xylan ซึ่งเป็นสับสเตรทประเภทไซแลนได้เกือบทุกไอโซเลท แต่ไม่พบไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์มาย่อยสลาย avicel ซึ่งเป็นสับสเตรทเซลลูโลสประเภทไม่ละลายน้ำที่พบได้ในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และไม่พบเอนไซม์เพื่อย่อย polybutylene succinate ซึ่งเป็นพลาสติกชีวภาพ เมื่อศึกษาการย่อยสลายสับสเตรทที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จัดเป็นเชื้อในกลุ่มชอบร้อนที่มีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทได้แก่ avicel และพลาสติกชีวภาพชนิดต่างๆ จึงน่าสนใจในการนำมาศึกษาเพื่อต่อยอดทางการวิจัยต่อไป

การศึกษากำหนดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้นั้นได้เลือกไอโซเลทที่น่าสนใจมาศึกษา ได้แก่ ไอโซเลท TF1 TF3 และ TF4 เมื่อจัดจำแนกด้วยยีน 16S rDNA พบว่าไอโซเลท TF1 มีความใกล้เคียงกับ *Actinomadura miaoliensis* (99%) สายพันธุ์ TF3 มีความใกล้เคียงกับ *Brevibacillus agri* (99%) ซึ่งไม่ใช่เชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยสีท และสายพันธุ์ TF4 มีความใกล้เคียงกับ *Laceyella sacchari* (99%) หรือ *Thermoactinomyces* (99%) ตามลำดับ จากนั้นจึงนำลำดับดีเอ็นเอฝากเข้าระบบใน GenBank โดย accession number ของ TF1 TF3 และ TF4 คือ *Actinomadura* sp. TF1 (KC529344), *Brevibacillus* sp. TF3 (KC529345) และ *Laceyella* sp. TP4 (JX402751) ยีน rDNA ถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตอย่างมาก โดยพบว่ายีนเหล่านี้มีความเหมือนกันมากในสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน จึงนำยีนนี้มาใช้ศึกษาวิวัฒนาการของแบคทีเรีย ดังนั้นในการทดลองจึงใช้วิธีวิเคราะห์ยีน 16S rDNA เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ของยีนที่คล้ายคลึงกันจึงใช้ประโยชน์จากบริเวณนี้มาสร้างไพรเมอร์เพื่อหาชิ้นส่วนของยีนด้วยวิธี PCR และนำมาเปรียบเทียบ

กับฐานข้อมูลเพื่อช่วยให้ จัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ยังศึกษาทาง ลัทธิฐานวิทยาของเชื้อ TF1 และ TF4 บนอาหาร ISP พบว่าเชื้อสร้างสปอร์ที่มีสีแตกต่างกันบนอาหาร ISP แต่ละชนิดซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการจัดกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสิทและเป็นกลุ่มที่มีปริมาณเบส กวานีนและไซโตซีนในเซลล์มากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ (Ruan, 1994) และผนังเซลล์ประกอบด้วยมิว โคเปปไทด์ซึ่งประกอบด้วย N-acetyl muramic acid, diaminopimelic acid (DAP), glutamic acid, glycine และ alanine (Davis et al., 1973)

เชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็น *Streptomyces* เป็นส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นมากที่สุด สำหรับกลุ่มที่เป็น non-streptomycete หรือแอคติโนมัยสิทหายากมีอยู่ประมาณ 100 สกุลที่มีความหลากหลายด้าน รูปร่าง นิเวศวิทยา และสายวิวัฒนาการ (Miyadoh, 1997) *Actinomadura* sp. TF1 จัดอยู่ในกลุ่มนี้ และยังสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ต้องการอากาศในการเจริญ สร้างเส้นใย ราบที่มีการแตกแขนงแต่เส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศมีการสร้าง arthospore ที่มีลักษณะเป็นสายสั้น หรือใน sporangia ที่มี 1 ถึงหลายสปอร์ ผนังเซลล์เป็นแบบที่ III มี DAP เป็นแบบ meso-DAP (Lechevalier et al., 1971) สำหรับเชื้อ *Laceyella* sp. TP4 (JX402751) จัดอยู่ในกลุ่ม Thermoactinomycete เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง มีการสร้างเอ็นโดสปอร์อย่างแท้จริง ทนความร้อนได้ดีแต่มีเบสกวานีนและไซโตซีนต่ำกว่าพวกแอคติโนมัยสิททั่วไปโดยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Bacillus* แต่มีการพัฒนาสร้างเส้นใยได้ดี และมีลัทธิฐานวิทยาที่ต่างจากพวก *Bacillus*

จากงานวิจัยนี้ทำให้ได้เชื้อแอคติโนมัยสิทหายากที่น่าสนใจในการนำไปศึกษาคุณสมบัติ ทางการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ตลอดจน ศึกษากลไก การทำงานของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ และยังศึกษาการผลิตเอนไซม์ที่ สำคัญจากเชื้อที่แยกได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถใช้น้ำตาลจากแหล่งวัสดุเหลือ ทิ้งทางการเกษตรได้อีกด้วยทำให้ลดต้นทุนในการผลิตได้ในอนาคต

- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. *Streptomyces* spp.: แบคทีเรียคุณค่าสูงจากธรรมชาติ ได้ จาก <http://www.sc.mahidol.ac.th/scbt/articles/MMB%20Module-WP-19%20Jan%2010.pdf>. 1 มกราคม 2555.
- Catalogue of life: 2007 Annual Checklist: Species of Life IT IS Catalogue Edition (2007)
- Cross, T. (1982) Actinomycetes: a containing source of new metabolites. *Developments in Industrial Microbiology*. 23: 1-18.
- Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Genberg, H. And Wood, W. (1973) *Microbiology* 3rd edition. Harper and Row Publishing, Maryland.
- Hayakawa, M., Ishizawa, K. and Nonomura, H. (1988) Distribution of rare actinomycetes in Japanese soil. *Journal of Fermentation Technology*. 66: 367-373
- Hayakawa, M. (1990) Studies on selective isolation methods and distribution of soil actinomycetes. *Actinomycetol.* 4: 103-112.
- Hayakawa, M. (2008) Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetologica*. 22: 12-19.
- Hayakawa, M. and Nonomura, H. (1987) Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*. 65: 501-509.
- Hayakawa, M., Takeuchi, T. and Yamazaki, T. (1996a) Combined use of trimethoprim with nalidixic acid for the selective isolation of actinomycetes from soil. *Actinomycetol.* 10: 80-90.
- Hayakawa, M., Momose, Y., Yamazaki, T., and Nonomura, H. (1996b) A method for the selective isolation of *Microtetraspora glauca* and related four-spored actinomycetes from soil. *Journal of Applied Bacteriology*. 80: 375-386.
- Kim, J.C. (1992) Isolation and screening of actinomycetes from natural environment. In UNESCO Regional Training Workshop on Exploitation of Novel Microorganisms, Especially Actinomycetes, Taedox Science Town, Taejon, Republic of Korea. Aug. 24-Sep. 2.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. and Marinelli, F. (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 78: 399-405.
- Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H. (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 20: 435-443.
- Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P. and Gerber, N.N. (1971) Chemical composition as criterion in the classification of actinomycetes. *Advances in Applied Microbiology*. 14: 47-72.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. (2009) In "*Brock*

- Biology of Microorganism*” 20th ed. Pearson, Benjamin Cummings, Pearson Education, Inc.
- Miyadoh, S. (1997) Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan. Asakura publishing, Japan
- Nonomura, H. and Hayakawa, M. (1988) New methods for the selective isolation of soil actinomycetes. In “*Biology of Actinomycetes*” 88th ed. Okami, Y., Beppu, T. and Ogawara, H. pp. 288-293. Tokyo: Japan Scientific Societies Press.
- Ruan, J.S. (1994) Rapid isolation and identification of actinomycetes in UNESCO southeast asia regional training workshop “rapid method in microbiology and biotechnology dept of microbiology, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. Oct.19-28.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D. (1966) Method for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic and Bacteriology. 16: 313-340.
- Williams, R.H. (1989) Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. Vol 4 Williams and Wikins, Baltimore.

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวพิชาภัค สมยูทร์พย์

เกิด 29 กุมภาพันธ์ 2523

สถานที่เกิด กรุงเทพมหานคร

ที่ทำงาน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา

โทร. (ที่ทำงาน) 02-649-5000 ต่อ 8507

อีเมลล์ peechapack@swu.ac.th

การศึกษา

ระดับปริญญาตรี วท.บ (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ระดับปริญญาโท วท.ม (พันธุวิศวกรรม) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระดับปริญญาเอก Ph.D. (Natural Science and Technology)

Okayama University Japan

รางวัลและเกียรติประวัติ

1. นักเรียนทุนมอนบูโช (The MEXTscholarship) รัฐบาลประเทศญี่ปุ่น สำหรับ การศึกษาระดับปริญญาเอก (ปีการศึกษา 2548-2551)
2. นักเรียนทุนรัฐบาลตามความต้องการเร่งด่วนของส่วนราชการ เพื่อสนับสนุน นวัตกรรมภาครัฐ ประจำปีงบประมาณ 2550 (ทุนสร้างสรรค์นวัตกรรมภาครัฐ)

ผลงานทางวิชาการ

Proceeding abstract

1. Somyoonsap P, Sriyapai T, Siripoke S, Chansiri K and Kawai F (2011) Cloning of thermostable esterase gene from *Actinomadura* sp. S14 and its expression in *E.coli* and *P. Pastoris*. The 4th Congress of European Microbiologists, FEMS 2011, 26-30 July 2011, Geneva, Switzerland (poster presentation)
2. Sriyapai T, Somyoonsap P, Kawai F and Chansiri K (2011) Sequence analysis, gene expression and characterization of the gene encoding endoxylanase from *Actinomadura* sp. S14. The 4th Congress of European Microbiologists, FEMS 2011, 26-30 July 2011, Geneva, Switzerland (poster presentation)
3. Sukrakanchana L, Sriyapai T, Sukkhum S, and Somyoonsap P (2011) Screening, isolation and characterization of bacterium that degrades various bioplastics. The 4th Young Scientist Seminar Capacity building and development of microbial potential and fermentation technology towards new era, 26-27 September 2011, Kasetsart University, Thailand (oral presentation)

Proceeding full paper

1. Somyoonsap P and Siripoke (2009) Screening of poly(carpolactone)-degrading thermophilic microorganisms in soil samples from compost. 35th Congress on Science and technology of Thailand. 15-17 October 2009 Thailand
2. พิชามัก สมบูรณ์ทรัพย์, ทายาท ศรียาภัย, สมใจ ศิริโชค และ โกสุม จันทร์ศิริ (2011) การโคลน ยีนและการแสดงออกของเอนไซม์ thermostable esterase จาก *Actinomadura* sp. strain S14. The 17th National Genetics Conference. 7-9 เมษายน 2011 อิมพีเรียลแมงป่อง เชียงใหม่
3. Luksamee Sukrakanchana, Sukhumaporn Sukkhum, and Peechapack Somyoonsap (2012) Isolation of bioplastics-degrading bacteria from compost soil in Thailand. The 23rd Annual Meeting of the Thai Society of Biotechnology. 1-2 February 2012 at the Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand

วารสารตีพิมพ์

1. Sriyapai T, Somyoonsap S, Matsui K, Kawai F and Chansiri K. (2011) Cloning of a thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. S14 and its expression in *E. coli* and *Pichia pastoris*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 111: 528-536

2. อรอนงค์ พริ้งสุลกะ, ญัฐธิกา สุวรรณาศรัย และ พิชากค์ สมยूरथร์พย์ (2553) การผลิตไวน์โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เซลล์ตรึงรูปในชั้นผลไม้. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว 26(2): 127-138.
3. พิชากค์ สมยूरथร์พย์, ทายาท ศรียาภัย, สมใจ ศิริโชค, และ โกสุม จันทรศิริ (2554) การแยกและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบร้อนที่ย่อยสลายพอลิคาร์โพรแลกโตน วารสารวิทยาศาสตร์ มศว ปีที่ 27(2): 177-195.
4. Thayat Sriyapai and Peechapack Somyoonsap (2012) Screening and isolation of thermophilic lignocelluloses degrading bacteria and their potential for enzyme production. International conference on microbial taxonomy, basic and applied microbiology, 4-6 October 2012 at Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand (Proceeding full paper and poster presentation)
5. Peechapack Somyoonsap, Thayat Sriyapai, Somjai Siripoke, Kosum Chansiri and Fusako Kawai (2012) Cloning and expression of a novel thermostable esterase gene from *Actinomadura* sp. S14. Final asian core program joint seminar on capacity building and development of microbial potential and fermentation technology towards New Era, 18-20 November 2012 at Kaikyo Messe Shimonoseki, Yamaguchi, Japan (Proceeding full paper, Oral and poster presentation)
6. Thayat Sriyapai, Peechapack Somyoonsap, Supatra Areekit, Paisarn Khawsak, Arda Pakpitcharoen, Kosum Chansiri. (2013) Isolation, cloning and molecular characterization of a thermotolerant xylanase from *Streptomyces* sp. THW31. AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 12(4): 427-437.