



## รายงานการวิจัย

การศึกษความหลากหลายของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้  
จากตัวอย่างดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา  
ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระ  
เทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี-มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
(อพ.สธ.-มทส.)

Biodiversity of Anti-microbial Producing Bacteria from Soil in  
Suranaree University of Technology, Nakorn Ratchasima, Plant  
Genetic Conservation Project under the Royal Initiative of Her Royal  
Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn-Suranaree University of  
Technology (RSPG-SUT)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ จาก  
ตัวอย่างดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา ภายใต้โครงการ  
อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ

สยามบรมราชกุมารี-มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (อพ.สธ.-มทส.)

Biodiversity of Anti-microbial Producing Bacteria from Soil in Suranaree  
University of Technology, Nakorn Ratchasima, Plant Genetic Conservation  
Project under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha  
Chakri Sirindhorn-Suranaree University of Technology (RSPG-SUT)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. นวรัตน์ นันทพงษ์

สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพ

รัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวปัญจมาภรณ์ จันทเสนา นักศึกษาปริญญาโท ที่ให้ความช่วยเหลือ  
ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ และขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจาก  
พระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
สำหรับการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

## บทคัดย่อภาษาไทย

โรคติดเชื้อจากเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสจัดเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข โดยเฉพาะในแหล่งชุมชนที่มีประชากรอาศัยอยู่อย่างหนาแน่น ทั้งนี้เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสหลายสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นเชื้อดื้อยา ดังนั้นการวิจัยเพื่อค้นหาสารปฏิชีวนะตัวใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพต้านเชื้อก่อโรค โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ดื้อยา จึงมีความสำคัญ

แบคทีเรียในดินหลายสปีชีส์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้โดยเฉพาะกลุ่มของ Actinobacteria ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในด้านการแพทย์และการค้า ก็ผลิตมาจากเชื้อ Actinobacteria ที่แยกจากดินในยีสต์ *Streptomyces* และ *Micromonospora* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะได้

เชื้อแบคทีเรียที่แยกจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 12 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารต้านเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่ใช้ในการทดสอบได้ จากผลการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA พบว่า เชื้อที่แยกได้ 11 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในยีสต์ *Streptomyces* และ 1 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในยีสต์ *Nonomuraea* เชื้อที่แยกได้จากดินเหล่านี้ ส่วนใหญ่สร้างสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติเป็น narrow spectrum มีเพียง 2 สายพันธุ์ คือ PJ36 และ PJ95 ที่สร้างสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติเป็น broad spectrum ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ ได้ การศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA จากเชื้อที่แยกจากดิน พบว่า เชื้อบางสายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ PJ33 PJ75 PJ90 PJ95 และ PJ107 มีสายวิวัฒนาการที่แยกออกไปจากเชื้อในยีสต์ *Streptomyces* สายพันธุ์อื่น ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อเหล่านี้อาจจะเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ที่ยังไม่เคยมีการรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank การนำเชื้อกลุ่มนี้ไปศึกษาวิจัยอาจจะนำไปสู่การพัฒนาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพได้ต่อไป

**คำสำคัญ:** Soil bacteria, Antibiotics, Actinobacteria, Actinomycetes



## บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

The opportunistic pathogen infections are a serious public health problem especially in the area where large numbers of people are in close localization. Many strains of opportunistic pathogens are found to be resist to antimicrobial drugs. Thus, there is the need for the search of new potent antibiotic agents, particularly against drug resistant strains.

Some bacterial species isolated from soil has been found to produce antibiotics especially in the group of Actinobacteria. Almost 80% of commercially and medically useful antibiotics are produced from soil bacteria belonging to the genera *Streptomyces* and *Micromonospora*. The present study attempts to isolate the antibiotics producing bacterial strains from soil in Suranaree University of Technology.

Twelve antibiotic producing strains isolated from soil in Suranaree University of Technology were belonged to Actinomycetes family. They produced antimicrobial agents which were active against tested opportunistic pathogens. Based on 16s rRNA genes analysis, these strains were close affiliated with the genus *Streptomyces* (11 isolates) and *Nonomuraea* (1 isolate). Most of soil isolate strains showed narrow antimicrobial spectrum activities; however, two isolates named PJ36 and PJ95 exhibited the broad antimicrobial spectrum against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and yeasts. Phylogenetic tree analysis of 16S rDNA reveals that soil isolate PJ33, PJ75, PJ90, PJ95 and PJ107 strains are not cluster with others strain of *Streptomyces* from GenBank database. They are represent a distinct phyletic line which could be suggested a novel strains. The study of these soil isolates could lead to the development of new potent antimicrobial drugs.

**Keywords:** Soil bacteria, Antibiotics, Actinobacteria, Actinomycetes

## สารบัญ

|                                                        | หน้า |
|--------------------------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ.....                                   | ก    |
| บทคัดย่อภาษาไทย.....                                   | ข    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....                                | ค    |
| สารบัญ.....                                            | ง    |
| สารบัญภาพ.....                                         | ช    |
| สารบัญตาราง.....                                       | ซ    |
| บทที่ 1 บทนำ.....                                      | 1    |
| 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย.....                | 1    |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....                       | 3    |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....                             | 3    |
| 1.4 การทบทวนวรรณกรรม.....                              | 4    |
| 1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย..... | 6    |
| 1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....                  | 6    |

## สารบัญ (ต่อ)

|                                                                                                                                                   | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....                                                                                                                   | 7    |
| 2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ.....                                                                                                   | 7    |
| 2.2 สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์.....                                                                                                              | 8    |
| 2.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน.....                                                                                                       | 8    |
| 2.4 ทดสอบฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้วิธี<br>Perpendicular streak plate.....                                 | 9    |
| 2.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา<br>ร่วมกับวิธีทางอนุพันธุศาสตร์.....                                  | 11   |
| บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย.....                                                                                                       | 12   |
| 3.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะจากดิน.....                                                                   | 12   |
| 3.2 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการ<br>หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA.....                       | 21   |
| 3.3 ประสิทธิภาพการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ Actinomycetes สายพันธุ์ PJ33 PJ36<br>PJ43 PJ51 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107..... | 23   |
| 3.4 การศึกษาความสัมพันธ์และสายวิวัฒนาการของเชื้อ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51 PJ75<br>PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107 โดยใช้ยีน 16S rRNA.....      | 30   |
| บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย.....                                                                                                                       | 32   |

## สารบัญ (ต่อ)

|                                                                                                                      | หน้า |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| บรรณานุกรม.....                                                                                                      | 34   |
| ภาคผนวก.....                                                                                                         | 36   |
| ภาคผนวก ก. ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51 PJ75 PJ76<br>PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107..... | 37   |
| ภาคผนวก ข. งานวิจัยจากโครงการนี้ที่มีการเผยแพร่ในงานประชุมทางวิชาการระดับ<br>นานาชาติ.....                           | 45   |

## สารบัญภาพ

### หน้า

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ภาพที่ 2.1 การทดสอบฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรีย.....                                                              | 10 |
| ภาพที่ 3.1 แนวการเพาะเชื้อ PJ และ เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาส เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้าง<br>สารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ ..... | 24 |
| ภาพที่ 3.2 แผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Neighbor-joining ของเชื้อสายพันธุ์ PJ กับเชื้อใน Family<br>Actinomycetes สายพันธุ์ต่าง ๆ.....     | 31 |

## สารบัญตาราง

### หน้า

|              |                                                                                                                                                             |    |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ตารางที่ 3.1 | แสดงจำนวนเชื้อเป็นโคโลนีที่พบบนอาหาร SC agar และจำนวนเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะได้.....                                                                       | 13 |
| ตารางที่ 3.2 | ประสิทธิภาพของเชื้อ PJ1 ถึง PJ123 ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบชนิดต่าง ๆ.....                                                                           | 15 |
| ตารางที่ 3.3 | ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 16S rRNA ของเชื้อ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107 กับเชื้อในฐานข้อมูล GenBank ..... | 22 |
| ตารางที่ 3.4 | การสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ .....                                                                                                             | 25 |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ทรงมีสายพระเนตรกว้างและยาวไกล ทรงเห็นความสำคัญของการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ทรงให้นำพรรณไม้จากภูมิภาคต่าง ๆ มาปลูกไว้ในสวนจิตรลดา เพื่อเป็นแหล่งศึกษา และทรงมีโครงการพระราชดำริที่เกี่ยวกับการอนุรักษ์พัฒนาทรัพยากรธรรมชาติ ในปี พ.ศ. 2535 สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้ทรงสืบทอดพระราชปณิธานต่อโดยมีพระราชดำริกับเลขาธิการพระราชวัง ให้ดำเนินการอนุรักษ์พืชพรรณของประเทศโดยพระราชทานให้โครงการสวนพระองค์ฯ สวนจิตรลดา เป็นผู้ดำเนินการจัดตั้งธนาคารพืชพรรณขึ้นในปี พ.ศ. 2536 และดำเนินงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา จนถึงปัจจุบันมีหน่วยงาน สถานศึกษา และสถาบันต่าง ๆ ร่วมสนองพระราชดำริเพิ่มขึ้นหลายหน่วยงานทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ ทำให้พื้นที่และกิจกรรมดำเนินงานของโครงการฯ กระจายออกไปในภูมิภาคต่าง ๆ และมีการดำเนินงานที่หลากหลายมากขึ้น ปัจจุบันงานของโครงการฯ มิได้จำกัดเพียงการศึกษาอนุรักษ์พันธุ์พืชเท่านั้น แต่ขยายวงกว้างไปถึงการศึกษาเพื่ออนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติอื่นด้วย เช่น ดิน หิน แร่ และสิ่งมีชีวิตทุกประเภท เนื่องจากทุกสิ่งที่กล่าวมานั้นมีความเกี่ยวพันกัน สิ่งหนึ่งสิ่งใดขาดไปก็จะกระทบต่อการดำรงอยู่ของสิ่งอื่นในสิ่งแวดล้อม กิจกรรมของโครงการฯ ที่ทำสำเร็จลุล่วงและกำลังดำเนินการจึงมีความหลากหลายและครอบคลุมในหลายพื้นที่

เพื่อเป็นการสานต่อพระราชปณิธานแห่งองค์พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว และสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้ทำหนังสือขอพระราชทานพระราชวโรกาสขอสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ และได้รับพระราชานุญาตให้แต่งตั้งคณะกรรมการดำเนินงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเริ่มดำเนินการสำรวจในปี พ.ศ. 2539 ที่ อุทยานแห่งชาติทับลาน จังหวัดนครราชสีมา และในปีงบประมาณ 2555 โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้มอบหมายให้มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเข้าสำรวจทรัพยากรกายภาพและชีวภาพในพื้นที่บริเวณโดยรอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และพื้นที่เขื่อนน้ำพุงของการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย จังหวัดสกลนคร

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ กล่าวคือ มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ความหลากหลายในชนิดพันธุ์และความหลากหลายในระบบนิเวศน์ การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยจึงมีความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนไปกว่าการศึกษาสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เนื่องจากแบคทีเรียมีความสำคัญต่อการหมุนเวียนธาตุอาหารต่าง ๆ ในระบบนิเวศน์ บางชนิดสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ สี และเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม

พื้นที่ป่าโดยรอบบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา พบว่าเป็นป่าเต็งรัง และป่าเบญจพรรณอยู่เป็นบริเวณกว้าง ซึ่งเป็นไปได้ว่าพื้นที่เหล่านี้จะมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามก็ยังไม่เคยมีกลุ่มนักวิจัยเข้าไปสำรวจและเก็บข้อมูลสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้อย่างจริงจัง คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาและเก็บรวบรวมข้อมูลสายพันธุ์ของแบคทีเรียในดินที่พบในบริเวณนี้ โดยคาดหวังว่าการศึกษาครั้งนี้จะมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบ



ความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในดิน การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ทางด้านชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในดินบริเวณป่ารอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ในพื้นที่ป่าโดยรอบของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
2. เพื่อแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินกลุ่มที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ จากพื้นที่ป่าโดยรอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
3. เพื่อศึกษาชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในดินที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ เพื่อรวบรวมและเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในดินที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ ที่พบในพื้นที่ป่าโดยรอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. สุ่มเก็บตัวอย่าง และแยกเชื้อแบคทีเรียจากดิน
2. จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะได้จากตัวอย่างดิน
3. จัดทำฐานข้อมูลความหลากหลายของชนิดของแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ โดยอาจนำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาศึกษาและประยุกต์ใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป

#### 1.4 การทบทวนวรรณกรรม

ดินจัดเป็นแหล่งที่อยู่ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบอยู่ทั่วไปในดิน ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่าย โปรโตซัว รวมถึงไวรัส ดินที่อุดมสมบูรณ์จะพบจุลินทรีย์ในดินเหล่านี้ได้มากถึงพันล้านเซลล์ต่อดินหนึ่งกรัม (สับบัติต, 2549) จุลินทรีย์ในดินเหล่านี้จะทำหน้าที่ในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ต่าง ๆ และทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุและสารอาหาร ดังนั้นถ้ามีจุลินทรีย์ปริมาณสูงในดินจะเป็นการบ่งบอกถึงความสมบูรณ์ของดินนั่นเอง (Hassink et al., 1991)

แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์ที่พบในดินมากที่สุด ทั้งชนิดและจำนวน โดยแบคทีเรียในดินส่วนใหญ่จะมีความสำคัญในการทำให้เกิดวัฏจักรของสาร ได้แก่ วัฏจักรไนโตรเจน วัฏจักรซัลเฟอร์ วัฏจักรฟอสฟอรัส เป็นต้น แบคทีเรียจึงจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญต่อการหมุนเวียนของสารต่าง ๆ ภายในดิน แบคทีเรียในดินหลายชนิดที่เจริญอยู่ร่วมกับรากพืช และช่วยส่งเสริมให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถเปลี่ยนธาตุบางอย่างที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้โดยตรง ให้อยู่ในรูปของสารประกอบที่พืชดูดซึมไปใช้ได้ เช่น เชื้อ *Bradyrhizobium japonicum* ที่อาศัยอยู่ในปมรากถั่ว จะตรึงก๊าซไนโตรเจนจากบรรยากาศ ผ่านกระบวนการที่เรียกว่า Nitrogen fixation เพื่อเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียมไอออน ให้พืชนำไปใช้ได้ โดยปัจจุบันเกษตรกรในหลายประเทศได้นำแบคทีเรียชนิดนี้ไปคลุกกับเมล็ดถั่วก่อนที่จะนำไปเพาะลงแปลงปลูก เพื่อเพิ่มผลผลิตของพืชให้ดีขึ้น (Hume and Blair, 1992)

นอกจากนี้แบคทีเรียที่พบในดินหลายชนิดยังมีความสามารถในการสร้างสารต่าง ๆ เช่น ยาปฏิชีวนะ กรด เอนไซม์ สี และสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิอื่น ๆ สารเหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพและมีประโยชน์มากมาย ยกตัวอย่างเช่น เชื้อ *Pseudomonas acidophila* และ *P. mesoacidophila* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มักพบในดินที่เป็นกรด สามารถผลิตยาปฏิชีวนะ sulfazecin และ isosulfazecin ที่เป็นสารใน

กลุ่ม  $\beta$ -lactam ได้ (Williams et al., 1986) นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณ 66 % ของยาปฏิชีวนะที่แยกได้จากธรรมชาติส่วนใหญ่ จะได้มาจากเชื้อในยีส *Streptomyces* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่พบได้บ่อยในดิน โดยเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น neomycin, chloramphenicol และ streptomycin เป็นต้น (Watve et al., 2001)

แบคทีเรียในดินบางกลุ่มยังสามารถสร้างสารพิษที่มีความจำเพาะต่อแมลงและหนอนที่เป็นศัตรูพืช เช่น เชื้อ *Bacillus thuringiensis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดิน มีความสามารถในการสร้างสารพิษที่ออกฤทธิ์จำเพาะต่อหนอนแมลงที่เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด (Feitelson et al., 1992; Crickmore et al., 1998; Schnepf et al., 1998) เนื่องจากความจำเพาะของสารพิษที่เชื้อสร้าง ทำให้สารเหล่านี้ไม่เป็นพิษต่อคน สัตว์ และ พืช นักวิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเชื้อกลุ่มนี้กันอย่างกว้างขวาง (Gill et al., 1992; Knowles et al., 1994; Thompson et al., 1995) เพื่อที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการปราบแมลงศัตรูพืช แทนสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม

ดังนั้นการศึกษาถึงความหลากหลายของแบคทีเรียในดินบริเวณพื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา นอกจากเป็นข้อมูลทางชีวภาพแล้ว ยังอาจพบแบคทีเรียที่นำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมได้ในอนาคต โดยในการศึกษานี้จะเน้นไปที่กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ เนื่องจากปัญหาหลักที่สำคัญและกำลังได้รับความสนใจทางด้านการแพทย์และสาธารณสุขปัจจุบันนี้คือ ปัญหาการเกิดของเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยา ซึ่งทำให้การรักษาด้วยยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันไม่ได้ผล การค้นคว้าหายาด้านจุลินทรีย์ตัวใหม่ ๆ มาใช้รักษาโรคติดเชื้อที่ดื้อยาเหล่านี้ จึงมีประโยชน์อย่างมหาศาลในเชิงการแพทย์

### 1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

แบคทีเรียในดินส่วนใหญ่จะช่วยในการหมุนเวียนแร่ธาตุและสารอาหารภายในดิน โดยแบคทีเรียจะมีความสามารถในการเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ไปเป็นสารประกอบอนินทรีย์สำหรับให้พืชและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ นำไปใช้ได้ เนื่องจากแบคทีเรียที่พบในดินมีความหลากหลายมากทั้งชนิดและปริมาณ ดังนั้นการศึกษาเพื่อระบุชนิดและกลุ่มของแบคทีเรียที่พบในดินบริเวณที่ยังไม่เคยทำการสำรวจจึงมีความสำคัญ เนื่องจากข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับพัฒนาวิทยาศาสตร์แขนงอื่น ๆ ได้ต่อไป

### 1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ทราบชนิด ความหลากหลาย และการแพร่กระจายของแบคทีเรียที่พบในดินบริเวณพื้นที่ป่ารอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. สร้างฐานข้อมูลของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่พบในดินบริเวณพื้นที่ป่ารอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3. ได้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### พื้นที่ที่ทำการศึกษาเก็บตัวอย่าง

บริเวณพื้นที่ป่าภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

#### 2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินคือ Starch-Casein agar (SC agar) ที่มีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ soluble starch 10, casein 0.3,  $\text{KNO}_3$  2, NaCl 2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{CaCO}_3$  0.02,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 และ agar 15 สำหรับอาหารที่ใช้สำหรับทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์คือ Mueller Hinton Agar (MHA) ที่มีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ beef extract 300, casein hydro lysate 17.5, starch 1.5 และ agar 17 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดจะผ่านการทำปลอดเชื้อด้วยความร้อนขึ้นที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที เชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารจะนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ

## 2.2 สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่ใช้ในการทดลองเป็นสายพันธุ์ที่ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ประกอบไปด้วย *Staphylococcus aureus* TISTR1466, *Staphylococcus epidermidis* TISTR518, *Bacillus subtilis* TISTR008, *Bacillus cereus* TISTR687, *Escherichia coli* TISTR780, *Enterobacter aerogenes* TISTR1540, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR781, *Proteus mirabilis* TISTR100, *Serratia marcescens* TISTR1354, *Candida albicans* TISTR5779, *Candida tropicalis* TISTR5174 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5049

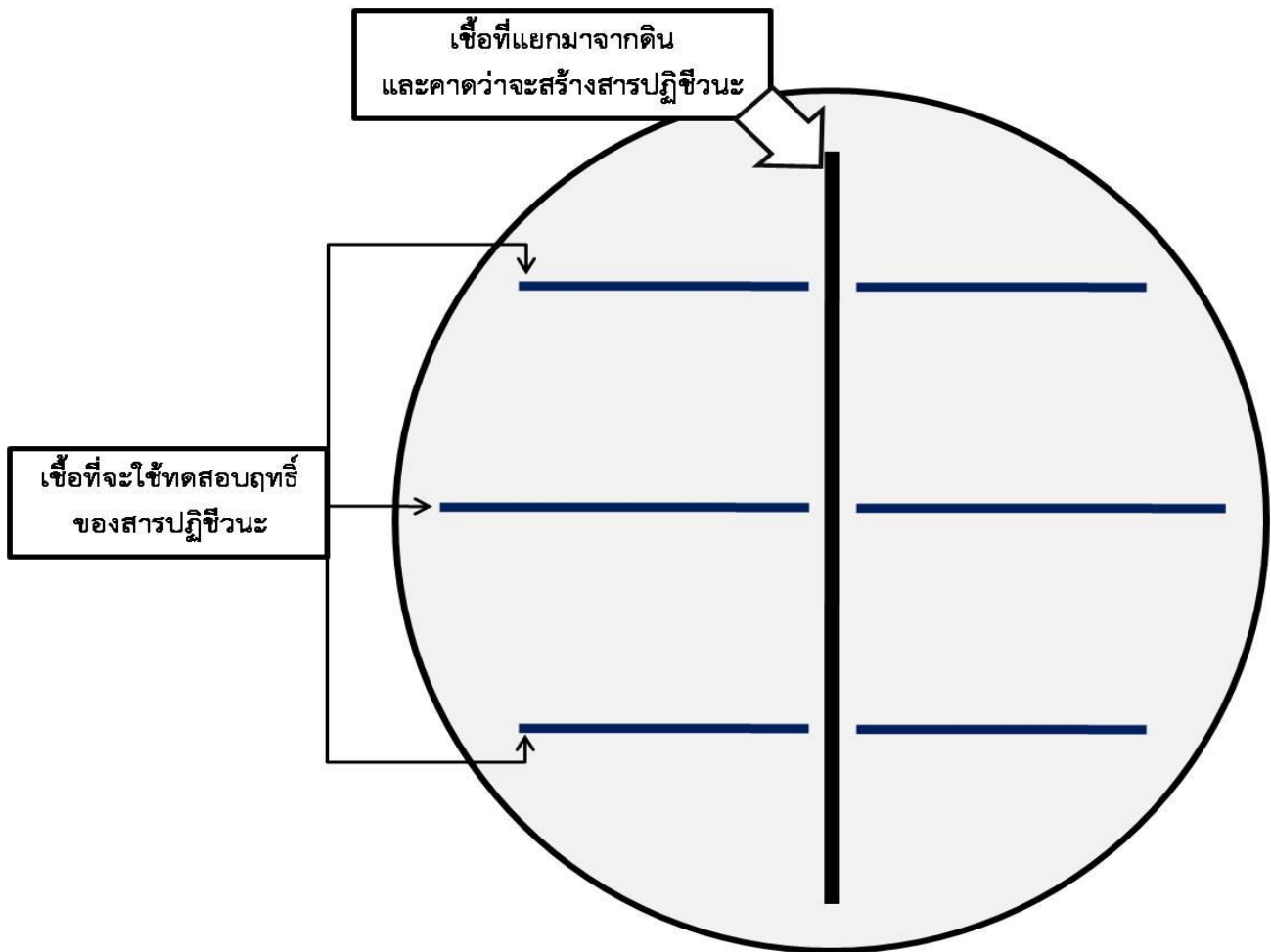
## 2.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

การแยกเชื้อจากตัวอย่างดินใช้วิธี dilution plating โดยนำดินตัวอย่างที่ต้องการแยกเชื้อมาจำนวน 10 กรัม ใส่ลงใน flask ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 มล. (ได้สารละลายดินที่ความเจือจาง 1:10) เขย่าสารละลายดินด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเขย่า นาน 30 นาที หลังจากนั้นให้ตั้ง flask ที่ไว้สักครู่จนสารแขวนลอยดินเริ่มตกตะกอนแล้วใช้ pipette ดูดสารละลายดินมา 10 มล. นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มล. (ได้สารละลายดินความเจือจาง 1:100) เขย่าให้เข้ากัน แล้วเจือจางต่อไปแบบเดิม จนได้สารละลายดินความเจือจาง  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  และ  $10^{-6}$  ตามลำดับ ใช้ pipette ดูดสารแขวนลอยดินที่ความเจือจาง  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  และ  $10^{-6}$  ปริมาตร 1 มล. ลงบนผิวหน้าอาหาร SC agar แล้วทำการ spread plate นำจานไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน หรือจนกว่าโคโลนีจะขึ้น แล้วจึงเลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่าง ๆ กันมาทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

## 2.4 ทดสอบฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้วิธี

### Perpendicular streak plate

นำเชื้อที่คาดว่าจะมีความสามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์มาเพาะลงบนจานอาหาร MHA โดยขีดลากเป็นเส้นตรงตามแนวกึ่งกลางจานอาหาร (ภาพที่ 2.1) นำจานไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนเชื้อเจริญ เพื่อให้เชื้อสร้างสารปฏิชีวนะซึมเข้าไปในเนื้อวุ้นโดยรอบโคโลนี ต่อมานำเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่จะใช้ทดสอบความไวไปเพาะบนจานเดียวกับเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะ โดยขีดลากเป็นแนวตั้งฉากกับเชื้อเดิมที่เจริญอยู่ก่อน (ภาพที่ 2.1) แล้วนำจานไปบ่มต่อประมาณ 24-48 ชั่วโมง โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในกรณีที่เชื้อก่อโรคเป็นยีสต์ แต่ถ้าเชื้อก่อโรคที่นำมาทดสอบเป็นแบคทีเรีย ให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การตรวจผลให้ตรวจดูการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบความไวโดยสังเกตว่า หากเชื้อทดสอบตัวใดไม่สามารถเจริญเข้ามาใกล้โคโลนีของเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ แสดงว่าสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างออกมานั้นมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อทดสอบ



ภาพที่ 2.1 การทดสอบฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรีย



## 2.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับวิธีทางอณูพันธุศาสตร์

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะทำได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การดูลักษณะรูปร่างของโคโลนีที่เห็นด้วยตาเปล่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะที่สังเกตเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคุณสมบัติการติดสีแกรม ร่วมกับวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ซึ่งการหาลำดับเบสทำได้โดย นำเซลล์แบคทีเรีย 0.5 มล. ที่เจริญในอาหาร Nutrient broth มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตัวเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ นำส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่มาทำให้แตกโดยเติม 50 mM NaOH 180  $\mu$ l ลงไปผสมกับเซลล์ นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ว neutralized โดยเติม 1 M Tris-HCl 20  $\mu$ l ลงไป ผสมให้เข้ากัน cell suspension ที่ได้จากขั้นตอนนี้ จะนำไปใช้เป็นแหล่งของ DNA template ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นของ 16S rDNA ด้วย universal primers ของแบคทีเรีย ได้แก่ 243F (5'-GGATGAGCCCGCGGCCTA-3') และ A3R (5'-CCAGCCCCACCTTCGAC-3') (Monciardini et al., 2002) ชิ้น 16S rDNA ที่ได้จากการทำ PCR จะนำไปใช้เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ด้วยเครื่อง Automated Sequencer โดยใช้ primers คู่เดิม คือ 243F และ A3R ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ จะนำไปวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ได้มานี้ตรงกับแบคทีเรียชนิดใด โดยนำไปเทียบหาในฐานข้อมูล GenBank NCBI

## 2.6 การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อที่แยกได้จากดิน มาสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียที่ทราบชนิดแล้วจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0

### บทที่ 3

#### ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

##### 3.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะจากตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา แบบสุ่ม โดยออกเก็บตัวอย่างดินเฉลี่ยเดือนละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 1 ปี ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ขั้นตอนการเก็บทำโดย ใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บตัวอย่างดินที่อยู่ลึกลงไปจากหน้าดินประมาณ 5-10 ซม. ใส่ในภาชนะที่สะอาด แล้วนำมาแยกหาเชื้อในห้องปฏิบัติการ ตามวิธีที่บรรยายไว้ในบทที่ 2 หัวข้อ 2.3

จากการทดลอง พบเชื้อขึ้นบนอาหาร SC agar จากตัวอย่างดินที่เก็บในแต่ละครั้ง เฉลี่ยอยู่ที่ 5 โคโลนี (ตารางที่ 3.1) เชื้อทั้งหมดที่นำมาทดสอบการสร้างสารต้านจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินทั้ง 25 ตัวอย่าง มีจำนวน 123 isolates ซึ่งให้เลขรหัสเป็น PJ1 ถึง PJ123 ตามลำดับ โดยพบเชื้อ 22 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะออกมาด้านแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ดี (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 แสดงจำนวนเชื้อเป็นโคโลนีที่พบบนอาหาร SC agar และจำนวนเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะได้

| ครั้งที่เก็บ | จำนวนเชื้อที่แยกได้และนำมาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ | จำนวนเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ |
|--------------|----------------------------------------------------|----------------------------------|
| 1            | 7                                                  | 0                                |
| 2            | 5                                                  | 0                                |
| 3            | 4                                                  | 0                                |
| 4            | 5                                                  | 0                                |
| 5            | 4                                                  | 0                                |
| 6            | 3                                                  | 0                                |
| 7            | 5                                                  | 1                                |
| 8            | 3                                                  | 1                                |
| 9            | 3                                                  | 0                                |
| 10           | 4                                                  | 2                                |
| 11           | 5                                                  | 3                                |
| 12           | 7                                                  | 2                                |
| 13           | 3                                                  | 0                                |
| 14           | 10                                                 | 1                                |
| 15           | 5                                                  | 2                                |
| 16           | 3                                                  | 2                                |
| 17           | 8                                                  | 2                                |
| 18           | 4                                                  | 2                                |
| 19           | 3                                                  | 1                                |
| 20           | 6                                                  | 1                                |
| 21           | 3                                                  | 0                                |
| 22           | 6                                                  | 0                                |
| 23           | 4                                                  | 1                                |
| 24           | 8                                                  | 0                                |
| 25           | 5                                                  | 1                                |
| รวม          | 123                                                | 22                               |

การทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านแบคทีเรียอย่างคร่าว ๆ จากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินจำนวน 123 isolates ทำโดยใช้วิธี perpendicular streak plate ซึ่งเป็นการขีดเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะให้อยู่ในแนวตั้งฉากกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบ วิธีการโดยละเอียดได้อธิบายไว้ในบทที่ 2 หัวข้อ 2.4

แบคทีเรียกลุ่ม opportunistic pathogens ที่นำมาทดสอบในขั้นแรกมีทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* และ *Pseudomonas aeruginosa*

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสารต้านแบคทีเรียของเชื้อ PJ1 ถึง PJ123 แสดงไว้ในตารางที่ 3.2

จากตารางที่ 3.2 พบว่า มีเชื้อ 22 isolates จาก 123 isolates มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมาต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้ ซึ่งเชื้อทั้ง 22 isolates ประกอบไปด้วย PJ33 PJ36 PJ41 PJ43 PJ45 PJ46 PJ47 PJ51 PJ52 PJ67 PJ72 PJ73 PJ75 PJ76 PJ77 PJ78 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 PJ107 และ PJ121

ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพของเชื้อ PJ1 ถึง PJ23 ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบชนิดต่าง ๆ

| Isolate<br>name | เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่ใช้ทดสอบ |                  |                |                     |                      |
|-----------------|-----------------------------------|------------------|----------------|---------------------|----------------------|
|                 | <i>S. aureus</i>                  | <i>B. cereus</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. aerogenes</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| PJ1             | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ2             | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ3             | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ4             | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ5             | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ6             | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ7             | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ8             | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ9             | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ10            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ11            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ12            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ13            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ14            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ15            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ16            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ17            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ18            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ19            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ20            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ21            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ22            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ23            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |

| Isolate<br>name | เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่ใช้ทดสอบ |                  |                |                     |                      |
|-----------------|-----------------------------------|------------------|----------------|---------------------|----------------------|
|                 | <i>S. aureus</i>                  | <i>B. cereus</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. aerogenes</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| PJ24            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ25            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ26            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ27            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ28            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ29            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ30            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ31            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ32            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| <b>PJ33</b>     | -                                 | +                | -              | -                   | +                    |
| PJ34            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ35            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| <b>PJ36</b>     | +                                 | +                | +              | +                   | -                    |
| PJ37            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ38            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ39            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ40            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ41            | +                                 | +                | -              | -                   | +                    |
| PJ42            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| <b>PJ43</b>     | +                                 | +                | -              | -                   | -                    |
| PJ44            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ45            | +                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ46            | +                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ47            | +                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ48            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ49            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ50            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |

| Isolate<br>name | เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่ใช้ทดสอบ |                  |                |                     |                      |
|-----------------|-----------------------------------|------------------|----------------|---------------------|----------------------|
|                 | <i>S. aureus</i>                  | <i>B. cereus</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. aerogenes</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| PJ51            | -                                 | +                | -              | -                   | -                    |
| PJ52            | +                                 | +                | -              | -                   | -                    |
| PJ53            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ54            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ55            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ56            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ57            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ58            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ59            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ60            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ61            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ62            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ63            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ64            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ65            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ66            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ67            | +                                 | +                | +              | -                   | +                    |
| PJ68            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ69            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ70            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ71            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ72            | +                                 | +                | +              | -                   | +                    |
| PJ73            | +                                 | +                | +              | -                   | +                    |
| PJ74            | -                                 | +                | -              | -                   | -                    |
| PJ75            | +                                 | +                | -              | -                   | -                    |
| PJ76            | -                                 | +                | -              | -                   | -                    |
| PJ77            | +                                 | +                | -              | -                   | -                    |

| Isolate<br>name | เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่ใช้ทดสอบ |                  |                |                     |                      |
|-----------------|-----------------------------------|------------------|----------------|---------------------|----------------------|
|                 | <i>S. aureus</i>                  | <i>B. cereus</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. aerogenes</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| PJ78            | +                                 | +                | -              | -                   | -                    |
| PJ79            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ80            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ81            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ82            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ83            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ84            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| <b>PJ85</b>     | +                                 | +                | -              | -                   | ND                   |
| PJ86            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ87            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| <b>PJ88</b>     | +                                 | +                | -              | -                   | -                    |
| PJ89            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| <b>PJ90</b>     | +                                 | +                | -              | -                   | -                    |
| PJ91            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ92            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ93            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ94            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| <b>PJ95</b>     | +                                 | +                | +              | +                   | -                    |
| PJ96            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ97            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ98            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ99            | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ100           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ101           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ102           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ103           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ104           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |



| Isolate<br>name | เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่ใช้ทดสอบ |                  |                |                     |                      |
|-----------------|-----------------------------------|------------------|----------------|---------------------|----------------------|
|                 | <i>S. aureus</i>                  | <i>B. cereus</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. aerogenes</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| PJ105           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ106           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| <b>PJ107</b>    | <b>+</b>                          | <b>+</b>         | -              | -                   | -                    |
| PJ108           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ109           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ110           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ111           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ112           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ113           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ114           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ115           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ116           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ117           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ118           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ119           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ120           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ121           | <b>+</b>                          | -                | -              | <b>ND</b>           | -                    |
| PJ122           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |
| PJ123           | -                                 | -                | -              | -                   | -                    |

คำอธิบายสัญลักษณ์:

- +                    สร้างสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้  
 -                    ไม่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบ  
 ND                  ไม่ได้ทดสอบ (Not Determine)

ผลจากตารางที่ 3.2 สามารถสรุปได้ว่า มีเชื้อ 22 isolates ที่สร้างสารต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบได้ ซึ่งเชื้อแต่ละตัวจะออกฤทธิ์ต้านจุลชีพได้แตกต่างกันออกไป โดยเชื้อ 18 isolates จาก 22 isolates สามารถสร้างสารปฏิชีวนะมาด้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม *S. aureus* ได้ ยกเว้นสายพันธุ์ PJ33 PJ51 PJ74 และ PJ76 ที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อ *S. aureus* ส่วนเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง *B. cereus* ได้ ประกอบไปด้วย PJ33 PJ36 PJ41 PJ43 PJ51 PJ52 PJ67 PJ72-PJ78 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107

สำหรับการสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อ PJ จำนวน 22 isolates ต่อกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบพบว่า เชื้อ PJ36 PJ67 PJ72 PJ73 และ PJ95 สามารถสร้างสารต้านเชื้อ *E. coli* ได้ ส่วนเชื้อ *Enterobacter aerogenes* มีความไวต่อสารที่สร้างจากเชื้อ PJ36 และ PJ95 และสายพันธุ์ที่สร้างสารต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ มี 4 สายพันธุ์คือ PJ33 PJ41 PJ67 PJ72 และ PJ73

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 22 isolates ที่แยกได้จากดินในแถบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มีความสามารถสร้างสารต้านแบคทีเรียทดสอบในกลุ่มแกรมบวกได้ดีกว่า แกรมลบ ทั้งนี้เชื้อที่แยกได้จากดินส่วนใหญ่จะสร้างสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์เฉพาะกลุ่มเชื้อ เช่น สายพันธุ์ที่ต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้จะต้านแบคทีเรียแกรมลบไม่ได้ และสายพันธุ์ที่ต้านแบคทีเรียแกรมลบได้จะต้านแบคทีเรียแกรมบวกไม่ได้ อย่างไรก็ตามมีเชื้อ 7 isolates คือ PJ33 PJ36 PJ41 PJ67 PJ72 PJ73 และ PJ95 ที่สร้างสารปฏิชีวนะออกมาต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง แกรมบวกและแกรมลบ

### 3.2 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

ในเบื้องต้น เชื้อที่แยกได้ทั้ง 22 isolates มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาตรงกับเชื้อในกลุ่ม Actinomycetes เนื่องจากโคโลนีของเชื้อส่วนใหญ่มีการสร้างเม็ดสี ขอบโคโลนีหยาบ-แข็ง คล้ายโคโลนีของเชื้อรามากกว่าแบคทีเรีย และเมื่อนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ก็พบเซลล์มีลักษณะเป็นเส้นใย ติดสีแกรมบวก โดยลักษณะที่กล่าวมานี้จะตรงกับเชื้อใน genus *Streptomyces* มากที่สุด (Whitman et al., 2012)

การยืนยันว่าเชื้อทั้ง 22 isolates นี้ เป็นเชื้อใน Family Actinomycetes จริง จะใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ซึ่งวิธีการนี้จะสามารถจำแนกเชื้อในระดับ genus และ species ได้อย่างแม่นยำ วิธีการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rRNA อธิบายไว้ในบทที่ 2 หัวข้อ 2.5

ผลการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ของเชื้อทั้ง 22 isolates พบว่า มีเพียง 12 isolates ได้แก่ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107 ที่สามารถจับกับ universal primers ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียได้ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทั้ง 12 isolates มาวิเคราะห์ ก็พบว่าเชื้อเหล่านี้เป็นแบคทีเรียใน Family Actinomycetes ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อจากดินทั้ง 12 isolates แสดงไว้ใน ภาคผนวก ก.

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยนำไปเทียบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น  
 ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า เชื้อที่แยกได้จำนวน 11 isolates คือ PJ33 PJ36 PJ43 PJ75 PJ76  
 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในยีนัส *Streptomyces* มีเชื้อ  
 เพียง 1 isolate คือ PJ51 ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในยีนัส *Nonomuraea* ผลการเทียบลำดับนิวคลีโอ  
 ไทด์ของเชื้อทั้ง 12 isolates กับฐานข้อมูล GenBank แสดงไว้ในตารางที่ 3.3

**ตารางที่ 3.3** ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 16S rRNA ของเชื้อ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51  
 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107 กับเชื้อในฐานข้อมูล GenBank

| Isolate<br>name | ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 16S rRNA |              |
|-----------------|-------------------------------------------------|--------------|
|                 | สายพันธุ์                                       | % ความเหมือน |
| PJ33            | <i>Streptomyces alboniger</i>                   | 99           |
| PJ36            | <i>Streptomyces chrestomyceticus</i>            | 99           |
| PJ43            | <i>Streptomyces cinereospinus</i>               | 99           |
| PJ51            | <i>Nonomuraea jabiensis</i>                     | 99           |
| PJ75            | <i>Streptomyces cyaneus</i>                     | 99           |
| PJ76            | <i>Streptomyces iakyrus</i>                     | 100          |
| PJ77            | <i>Streptomyces celluloflavus</i>               | 99           |
| PJ85            | <i>Streptomyces durhamensis</i>                 | 98           |
| PJ88            | <i>Streptomyces griseocarnus</i>                | 99           |
| PJ90            | <i>Streptomyces filipinensis</i>                | 99           |
| PJ95            | <i>Streptomyces luteosporus</i>                 | 100          |
| PJ107           | <i>Streptomyces filipinensis</i>                | 99           |

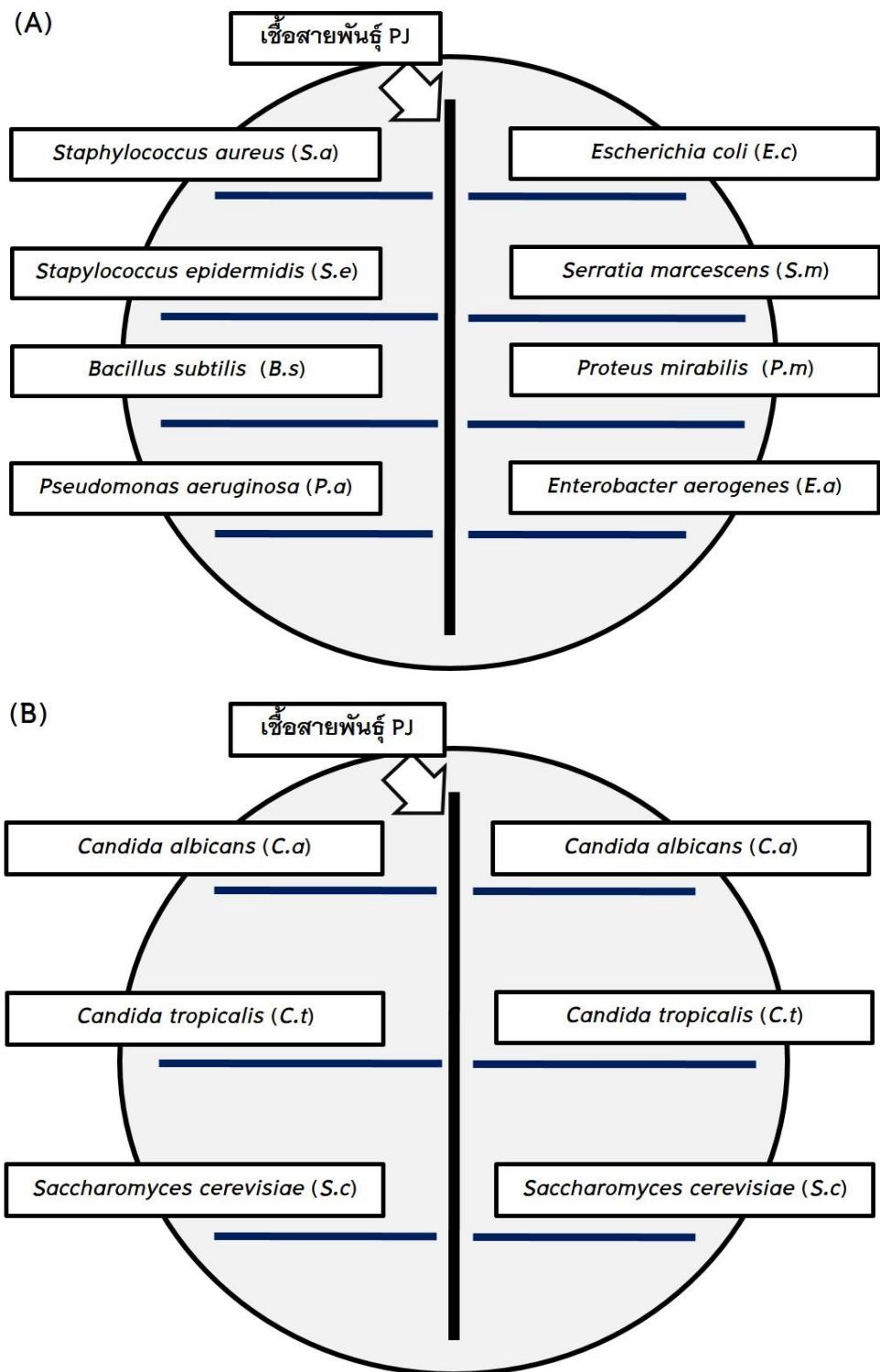
### 3.3 ประสิทธิภาพการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ Actinomycetes สายพันธุ์ PJ33 PJ36

PJ43 PJ51 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107

เพื่อให้ผลการทดลองการสร้างสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อ Actinomycetes ทั้ง 12 isolates คลอบคลุมกลุ่มเชื้อ opportunistic pathogens ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ให้มากที่สุด นักวิจัยจึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติม โดยแบ่งกลุ่มเชื้อที่ใช้ทดสอบดังนี้

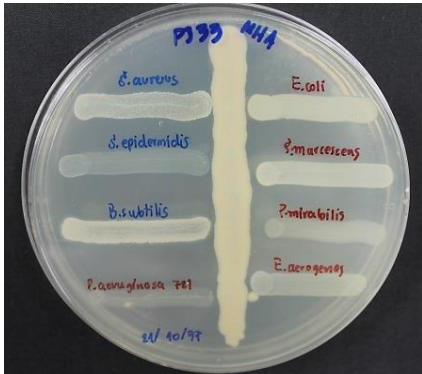
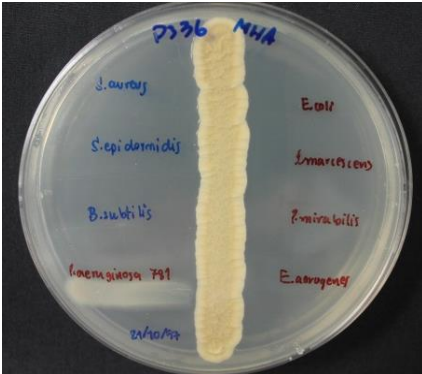
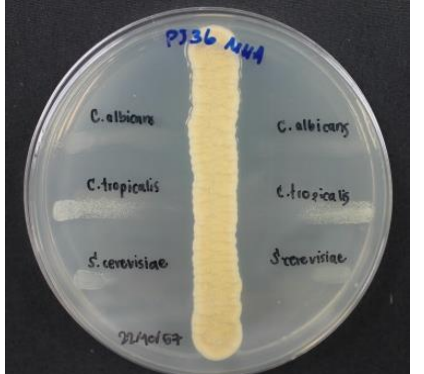
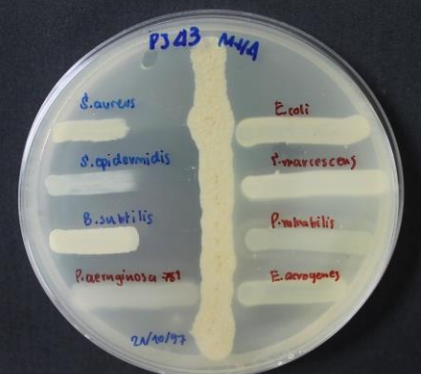
แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Bacillus subtilis* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* และ *Enterobacter aerogenes* ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans*, *Candida tropicalis* และ *Saccharomyces cerevisiae*

การทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อสายพันธุ์ PJ ทำโดยใช้วิธีการ perpendicular streak plate ซึ่งจะเพาะเชื้อสายพันธุ์ PJ ที่สร้างสารปฏิชีวนะไว้ในแนวกึ่งกลางของจานอาหาร แล้วนำไปบ่มประมาณ 3 ถึง 5 วัน เพื่อที่เชื้อจะได้สร้างสารต้านจุลินทรีย์และปล่อย แพร่ออกมาในวัน หลังจากนั้นจึงเพาะเชื้อในกลุ่ม opportunistic pathogens ให้อยู่ในแนวตั้งฉากกับเชื้อที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ นำไปบ่มต่อประมาณ 24 ถึง 48 ชั่วโมง แล้วมาตรวจผลโดยดูว่าเชื้อก่อโรคสามารถเจริญเข้ามาใกล้แนวการเจริญของเชื้อ PJ ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ได้หรือไม่ ผลการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ PJ ทั้ง 12 isolates แสดงในตารางที่ 3.4 และ แผนผังการเพาะเชื้อสำหรับทดสอบแสดงในภาพที่

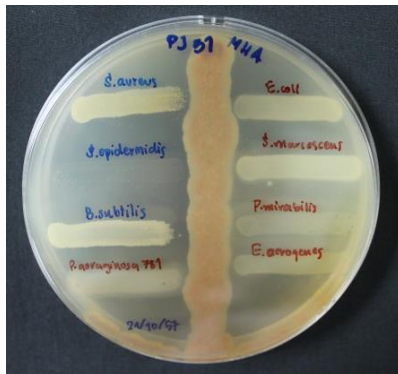
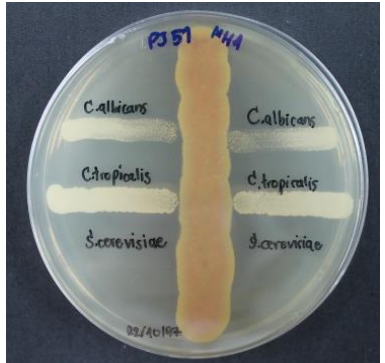
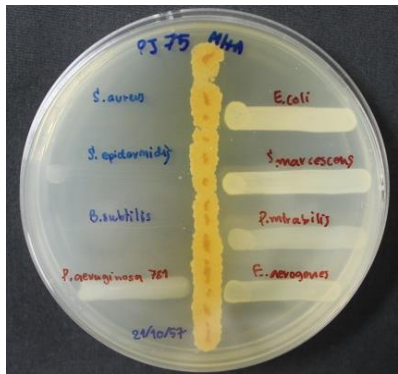
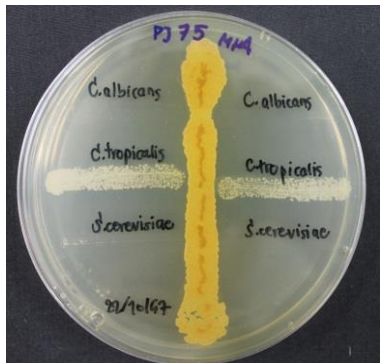
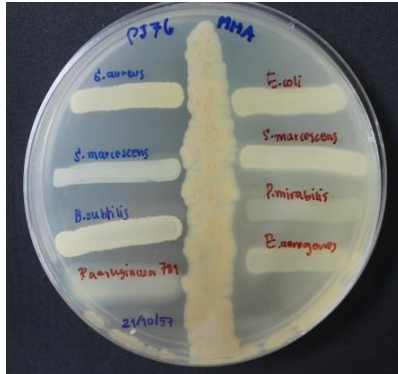


ภาพที่ 3.1 แนวการเพาะเชื้อ PJ และ เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาส เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ (A) ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแบบฉวยโอกาส (B) ทดสอบกับเชื้อยีสต์ก่อโรคแบบฉวยโอกาส

ตารางที่ 3.4 การสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ

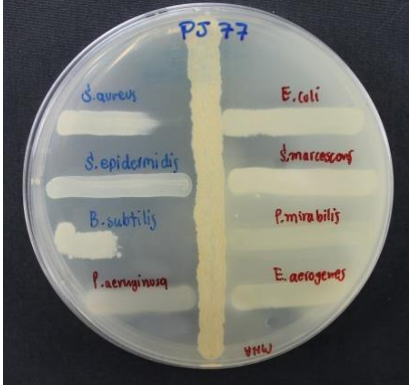
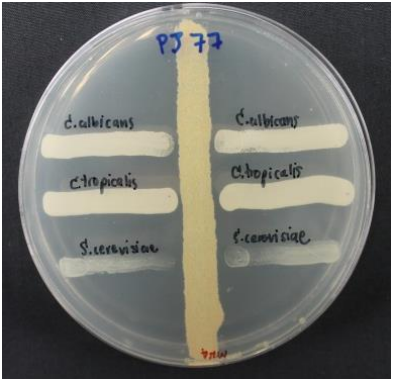
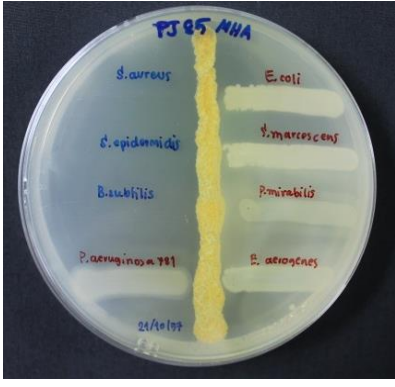
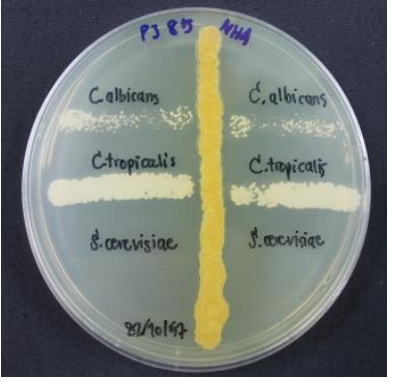
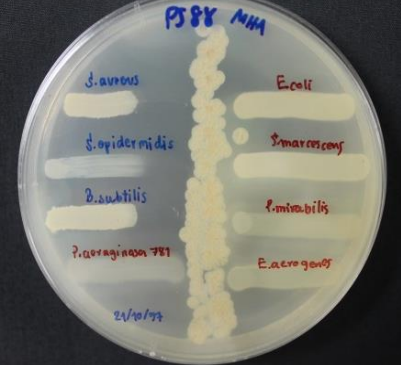
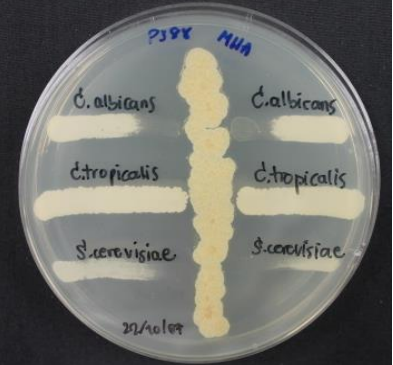
| สายพันธุ์ PJ                                                                       | เชื้อก่อโรคฉวยโอกาส                                                                 |            |            |                 |            |            |            |            |                                                                                       |            |            |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|
|                                                                                    | แบคทีเรียแกรมบวก                                                                    |            |            | แบคทีเรียแกรมลบ |            |            |            |            | ยีสต์                                                                                 |            |            |
|                                                                                    | <i>S.a</i>                                                                          | <i>S.e</i> | <i>B.s</i> | <i>P. a</i>     | <i>E.c</i> | <i>S.m</i> | <i>P.m</i> | <i>E.a</i> | <i>C.a</i>                                                                            | <i>C.t</i> | <i>S.c</i> |
| PJ33                                                                               | -                                                                                   | -          | -          | +               | -          | -          | -          | -          | -                                                                                     | -          | -          |
|    |    |            |            |                 |            |            |            |            |    |            |            |
| PJ36                                                                               | +++                                                                                 | +++        | +++        | -               | +++        | +++        | +++        | +++        | +++                                                                                   | ++         | +++        |
|  |   |            |            |                 |            |            |            |            |   |            |            |
| PJ43                                                                               | ++                                                                                  | ++         | ++         | -               | -          | -          | -          | -          | ++                                                                                    | -          | ++         |
|  |  |            |            |                 |            |            |            |            |  |            |            |

ตารางที่ 3.4 การสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ (ต่อ)

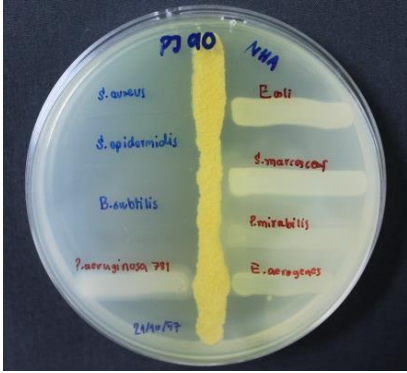
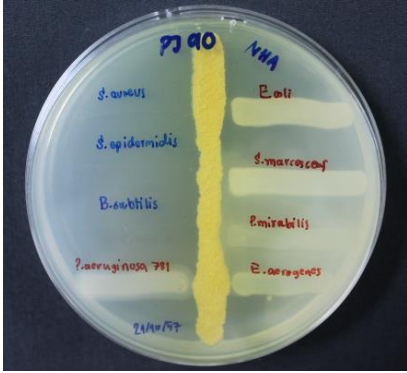
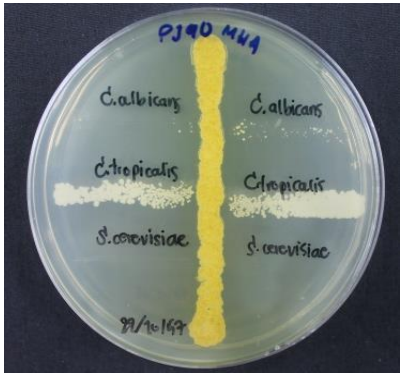
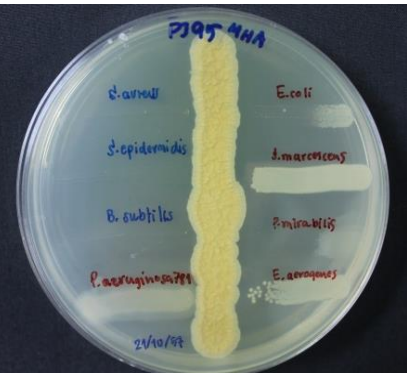
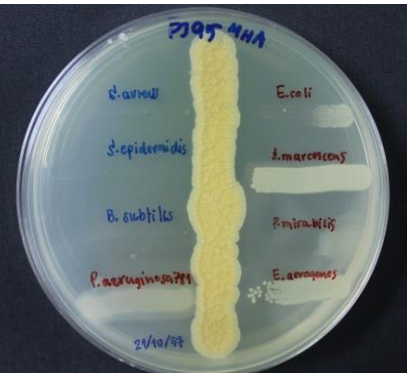
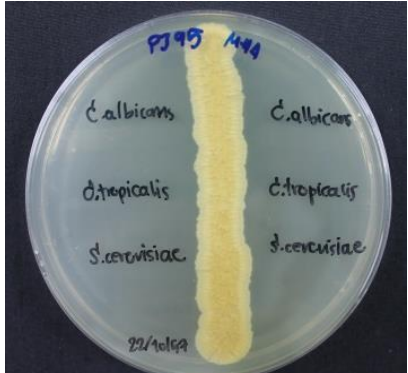
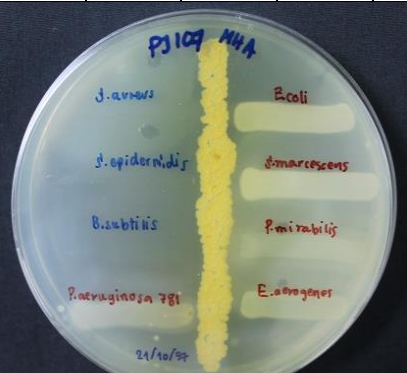
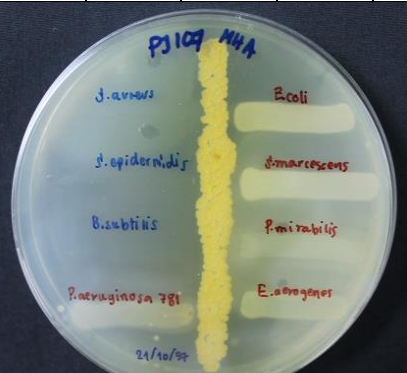
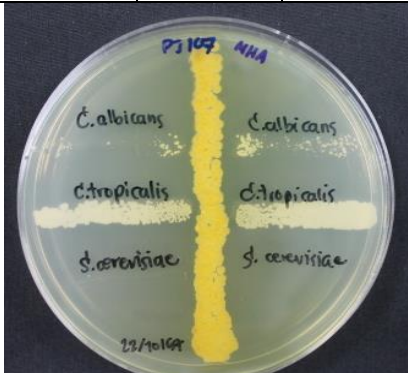
| สายพันธุ์ PJ                                                                       | เชื้อก่อโรคฉวยโอกาส                                                                 |            |            |                 |            |            |            |            |                                                                                       |            |            |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|
|                                                                                    | แบคทีเรียแกรมบวก                                                                    |            |            | แบคทีเรียแกรมลบ |            |            |            |            | ยีสต์                                                                                 |            |            |
|                                                                                    | <i>S.a</i>                                                                          | <i>S.e</i> | <i>B.s</i> | <i>P. a</i>     | <i>E.c</i> | <i>S.m</i> | <i>P.m</i> | <i>E.a</i> | <i>C.a</i>                                                                            | <i>C.t</i> | <i>S.c</i> |
| PJ51                                                                               | -                                                                                   | +++        | -          | -               | -          | -          | -          | -          | -                                                                                     | -          | +++        |
|    |    |            |            |                 |            |            |            |            |    |            |            |
| PJ75                                                                               | +++                                                                                 | +++        | +++        | -               | -          | -          | -          | -          | +++                                                                                   | -          | +++        |
|  |  |            |            |                 |            |            |            |            |  |            |            |
| PJ76                                                                               | -                                                                                   | -          | -          | -               | -          | -          | -          | -          | +++                                                                                   | +          | +++        |
|  |  |            |            |                 |            |            |            |            |  |            |            |



ตารางที่ 3.4 การสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ (ต่อ)

| สายพันธุ์ PJ                                                                       | เชื้อก่อโรคฉวยโอกาส |            |            |                                                                                     |            |            |            |            |                                                                                       |            |            |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|
|                                                                                    | แบคทีเรียแกรมบวก    |            |            | แบคทีเรียแกรมลบ                                                                     |            |            |            |            | ยีสต์                                                                                 |            |            |
|                                                                                    | <i>S.a</i>          | <i>S.e</i> | <i>B.s</i> | <i>P.a</i>                                                                          | <i>E.c</i> | <i>S.m</i> | <i>P.m</i> | <i>E.a</i> | <i>C.a</i>                                                                            | <i>C.t</i> | <i>S.c</i> |
| PJ77                                                                               | +                   | -          | ++         | -                                                                                   | -          | -          | -          | -          | -                                                                                     | -          | -          |
|    |                     |            |            |    |            |            |            |            |    |            |            |
| PJ85                                                                               | +++                 | +++        | +++        | -                                                                                   | -          | -          | -          | -          | +                                                                                     | -          | +++        |
|  |                     |            |            |  |            |            |            |            |  |            |            |
| PJ88                                                                               | +                   | +          | +          | -                                                                                   | -          | -          | -          | -          | +                                                                                     | -          | +          |
|  |                     |            |            |  |            |            |            |            |  |            |            |

ตารางที่ 3.4 การสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ (ต่อ)

| สายพันธุ์ PJ                                                                        | เชื้อก่อโรคฉวยโอกาส                                                                 |            |            |                                                                                     |            |            |            |            |                                                                                       |            |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|
|                                                                                     | แบคทีเรียแกรมบวก                                                                    |            |            | แบคทีเรียแกรมลบ                                                                     |            |            |            |            | ยีสต์                                                                                 |            |            |
|                                                                                     | <i>S.a</i>                                                                          | <i>S.e</i> | <i>B.s</i> | <i>P. a</i>                                                                         | <i>E.c</i> | <i>S.m</i> | <i>P.m</i> | <i>E.a</i> | <i>C.a</i>                                                                            | <i>C.t</i> | <i>S.c</i> |
| PJ90                                                                                | +++                                                                                 | +++        | +++        | -                                                                                   | -          | -          | -          | -          | +++                                                                                   | -          | +++        |
|    |    |            |            |    |            |            |            |            |    |            |            |
| PJ95                                                                                | +++                                                                                 | +++        | +++        | -                                                                                   | +++        | -          | +++        | +          | +++                                                                                   | +++        | +++        |
|  |  |            |            |  |            |            |            |            |  |            |            |
| PJ107                                                                               | +++                                                                                 | +++        | +++        | -                                                                                   | -          | -          | -          | -          | +++                                                                                   | -          | +++        |
|  |  |            |            |  |            |            |            |            |  |            |            |

ผลการทดลองในตารางที่ 3.4 แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 12 isolates สามารถสร้างสารต้านจุลชีพก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่นำมาทดสอบได้ อย่างไรก็ตามก็ตีสารปฏิชีวนะที่เชื้อแต่ละตัวสร้างออกมานั้นมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อต่างกันออกไป โดยจะเห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ PJ ส่วนใหญ่ได้แก่ เชื้อ PJ43 PJ51 PJ75 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 และ PJ107 มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ทดสอบ แต่ไม่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนเชื้อ PJ33 ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ทดสอบในตารางที่ 3.4 ตัวใดเลย สำหรับเชื้อ PJ76 นั้น พบว่าไม่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ใช้ในการทดสอบเลย มีเพียงเชื้อ PJ36 และ PJ95 ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งฤทธิ์การต้านเชื้อก่อโรคที่ใช้ทดสอบของสายพันธุ์ PJ36 และ PJ95 นี้ จัดว่าอยู่ในระดับที่ดีมาก

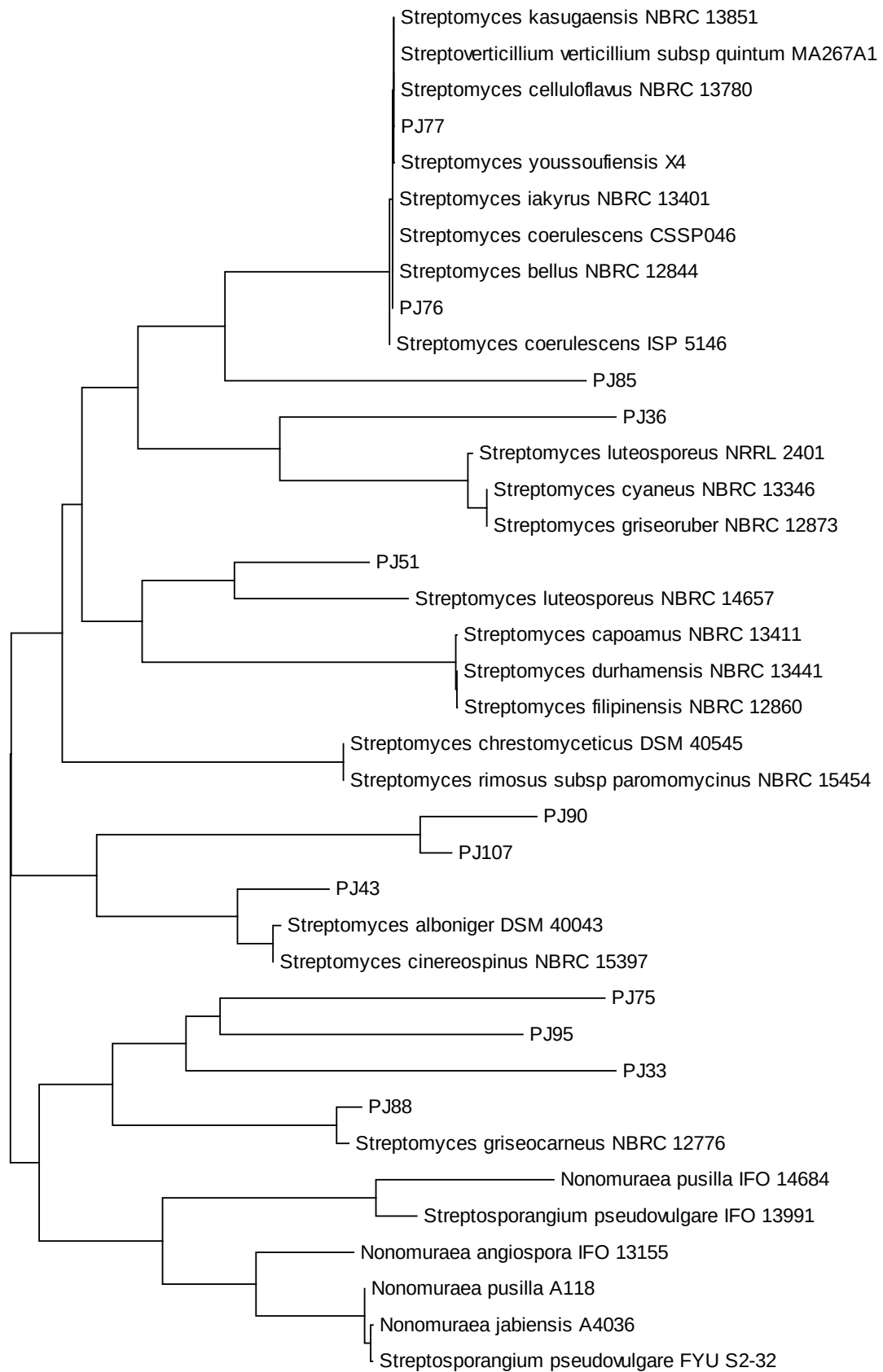
สำหรับผลการต้านเชื้อยีสต์ของเชื้อทั้ง 12 isolates พบว่า ส่วนใหญ่จะสามารถสร้างสารมาด้านการเจริญของยีสต์ได้ ได้แก่ PJ36 PJ43 PJ 51 PJ75 PJ76 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107 มีเพียงเชื้อ PJ33 และ PJ77 ที่ไม่มีความสามารถในการต้านเชื้อยีสต์ที่ใช้ทดสอบสายพันธุ์ใดได้เลย

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.4 จะเห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ PJ36 และ PJ95 มีคุณสมบัติเป็น broad spectrum antibiotic ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่ใช้ในการทดสอบได้ทุกกลุ่ม ตั้งแต่แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และ ยีสต์

### 3.4 การศึกษาความสัมพันธ์และสายวิวัฒนาการของเชื้อ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107 โดยใช้ยีน 16S rRNA

การศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของเชื้อสายพันธุ์ PJ กับเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ ใน Family Actinomycetes ทำได้โดยสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงในภาพที่ 3.2

เมื่อนำผลจากตารางที่ 3.3 มาเทียบกับแผนภูมิวิวัฒนาการในภาพที่ 3.2 จะสังเกตเห็นว่า แม้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสบนยีน 16S rRNA ของเชื้อกลุ่ม PJ กับเชื้อสายพันธุ์อื่นในกลุ่ม Actinomycetes ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 3.3) จะสูงมาก อยู่ในช่วง 98 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ PJ ส่วนใหญ่ ก็ยังมีสายวิวัฒนาการแยกออกไป อยู่ต่าง cluster กับเชื้อที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ยกตัวอย่างเช่น เชื้อ PJ33 มีลำดับเบสบนยีน 16S rRNA เหมือนกับเชื้อ *Streptomyces alboniger* อยู่สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางวิวัฒนาการแล้วกลับพบว่า เชื้อ PJ33 กับ เชื้อ *Streptomyces alboniger* มีบรรพบุรุษร่วม ที่ใกล้ที่สุดในสายวิวัฒนาการเป็นคนละตัวกัน ซึ่งลักษณะแบบนี้ ยังพบได้ในเชื้อ PJ36 กับเชื้อ *Streptomyces chrestomyceticus* เชื้อ PJ43 กับ *Streptomyces cinereospinus* เชื้อ PJ51 กับ *Nonomuraea jabiensis* เชื้อ PJ75 กับ *Streptomyces cyaneus* เชื้อ PJ85 กับ *Streptomyces durhamensis* เชื้อ PJ88 กับ *Streptomyces griseocarneus* เชื้อ PJ90 และ PJ107 กับ *Streptomyces filipinensis* และเชื้อ PJ95 กับ *Streptomyces luteosporus* นอกจากนี้ เชื้อบาง isolates ยังแสดงสายวิวัฒนาการใหม่ แยกออกไปจากเชื้อ Actinomycetes ในฐานข้อมูล GenBank อย่างชัดเจน ได้แก่ เชื้อ PJ33 PJ75 PJ90 PJ95 และ PJ107 จึงมีความเป็นไปได้ว่า เชื้อ PJ กลุ่มนี้ อาจเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ที่ยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank



0.5

ภาพที่ 3.2 แผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Neighbor-joining ของเชื้อสายพันธุ์ PJ กับเชื้อใน Family Actinomycetes สายพันธุ์ต่าง ๆ

## บทที่ 4

### สรุปการวิจัย

#### สรุปผลการวิจัย

ผลจากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากบริเวณพื้นที่ป่าในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา พบว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่แยกได้ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียใน Family Actinomycetes และอยู่ในยีนัส *Streptomyces* เป็นหลัก ซึ่งเชื้อบาง isolates ได้แก่ สายพันธุ์ PJ36 และ PJ95 ก็มีคุณสมบัติเป็น broad spectrum สามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิด

เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์ PJ ที่แยกได้ มาศึกษาความสัมพันธ์ในลำดับวิวัฒนาการกับเชื้อ Actinomycetes ชนิดอื่น ๆ พบว่า เชื้อ PJ33 PJ75 PJ90 PJ95 และ PJ107 อาจจะเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ที่ยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้ อาจสร้างสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติใหม่ ๆ แตกต่างไปจากสารที่มีรายงานในปัจจุบัน

คุณลักษณะเด่นของเชื้อที่แยกได้จากดินในแถบนี้ คือ สามารถเจริญและสร้างสารปฏิชีวนะได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าเชื้อส่วนใหญ่ในกลุ่ม Actinomycetes ที่เคยมีการรายงานไว้ เชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ส่วนใหญ่ จะสร้างสารเหล่านี้ออกมาต้านเชื้อได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 28 ถึง 30 องศาเซลเซียส เป็นผลให้การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ในการที่จะรักษาระดับอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการผลิต ส่งผลให้สารปฏิชีวนะมีราคาสูงตามไปด้วย อีกทั้งสารปฏิชีวนะที่ได้มาจากเชื้อกลุ่มที่เจริญและสร้างสารเหล่านี้ได้ดีที่อุณหภูมิสูงน่าจะเก็บรักษาได้ง่ายและมีอายุการใช้งานยาวนานขึ้น เพราะสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่มักจะเสื่อมสภาพได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง

ดังนั้นการนำเชื้อกลุ่มนี้ไปศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนายาต้านจุลชีพ จึงเป็นหนทางหนึ่งที่น่าจะ  
ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการพัฒนายาเพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อต่อไป

## บรรณานุกรม

- สุบัณฑิต นิมรรัตน์. (2549) จุลชีววิทยาทางดิน. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ โอ.เอส. พรีนติ้ง เฮาส์. 280 หน้า
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Dean D.H. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 62:807–813.
- Feitelson, J.S., Payne, J. and Kim, L. (1992) *Bacillus thuringiensis*: insect and beyond. Biol Technol. 10:271–275.
- Gill, S.S., Cowles, E.A. and Pietrantonio, P.V. (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu Rev Entomol. 37:615–636.
- Hassink, J., Lebbink, G. and Van Veen J.A. (1991) Microbial biomass and activity of a reclaimed-polder soil under a conventional or a reduced-input farming system. Soil Biol Biochem. 23:507–513.
- Hume, D.J. and Blair, D.H. (1992) Effect of numbers of *Bradyrhizobium japonicum* applied in commercial inoculants on soybean yield in Ontario. Can J Microbiol. 38:588–593.
- Knowles, B.H. (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* insecticidal delta-endotoxins. Adv Insect Physiol. 24:276–307.
- Monciardini, P., Sosio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C. and Donadio, S. (2002) New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. FEMS Microbiology Ecology. 42: 419–429.



- Schnepf, E., Crickmore, N., Rie, J.V., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:775–806.
- Thompson, M.A., Schnepf, H.E. and Feitelson, J.S. (1995) Structure, function, and engineering of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: Setlow JK, editor. *Genetic engineering: principles and methods*. New York: Plenum Press. p. 99–117.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. and Bhole, B.D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Arch Microbiol.* 176:386–90.
- Whitman, W.B.; Goodfellow, M.; Kämpfer, P.; Busse, H.–J.; Trujillo, M.E.; Ludwig, W.; Suzuki, K.–i.; Parte, A. Eds. (2012) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 5, 2d ed. New York, Springer.
- Williams, S.T. and Vickers, J.C. (1986) The ecology of antibiotic production. *Microb Ecol.* 12:43–52.

ภาคผนวก

**ภาพผนวก ก.**

ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88

PJ90 PJ95 และ PJ107

**>PJ33**

ATGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCAA  
CTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACAGGCTTTTTGAGATTGCTCCACC  
TCGCGGTATCGTGCTCATTGTACCTGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCGATGATGA  
CTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTTCTGTGAGTCCCATCACCCGAAGGG  
CATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG  
ACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGGCACCATCTCTGATGCTTTCGGTGTATGT  
CAAGCCTTGGAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGT  
CAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACCTAATGCGTTAGCTGCGGCACC  
GACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTAGTTCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG  
TTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCT  
CCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCCTGCCCCGTA  
TCGACTGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTA  
CGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCG  
CTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCC  
CTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT  
CTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCC

**>PJ36**

TGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGG  
 CTTTTTGAGATTCGCTCCACCTCGCGGTATCGCAGCTCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCC  
 AAGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTGTG  
 AGTCCCCATCACCCCNAAAGGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC  
 CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGACCCTGT  
 CTCCAGGGTTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTC  
 CGCCGCTTGTCGGGGCCCCGTCAATTCCTTTAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGGGAAC  
 TTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACGACGTGGAATGTCGCCCACACCTAGTTCCCAACGTTTACGGCGTG  
 GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGAT  
 CCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCT  
 ACCGAACTCTAGCCTGCCCCTATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGTGA  
 CAAGCCGCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTG  
 CTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTGCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTT  
 ACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAATATTCCC  
 CACTG

**>PJ43**

GGCGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC  
 ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC  
 AGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGGT  
 CGGTTGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGNTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGG  
 AGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGAT  
 CTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  
 CACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAA  
 GTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAKCGG  
 CGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACMCTY  
 MGAGAYMGGTKCCCCCTTGTGGTCGGWGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATG  
 TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGTTGGGACT  
 CACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCT  
 TGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAA

AGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT  
CAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA

**>PJ51**

GCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAGTGGG  
CGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGA  
CGAAGTTGACGTGTACCTGCACAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
GCGCCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGASCTCGTAGGTGSCTGGTCGCGTCTGCCGKGAAGC  
CCTGCAGCTTAAGTGCAGGTCYGC GGKGGATACGGSCCGGSTWGAGGTMKGYAGGGGSARGTGGAARTTC  
CTGGTGTAGCGKYGAMATGCGCASRKAKSTTAGGARGAAMACMRGTGGCSMAGGYGGSYKGCCTGSCG  
CCTTACCTGWYGCTTACGAGGAGCGAWRGMKKRGGRMKCRMCTACAGSAYYMSMCTASSMWGSWMG  
TCCWYSCTGYWRRCTGTWSGRCSCWASSWGATSKGAGATCWTCCACGATCTCCGTGCMKSAGCYAACG  
CAWTAAGCGCAGCCCKCATGCTGRSRWGWMCRGAGCCGMWMSCTMWWGGACTSMMMKGMMKYG  
ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTT  
GACATCACCCGAAAGCTCTGGAGACAGGGCCCTCTTCGGAAGTGGTGACAGGTGGTGATGGCTGTCGT  
CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCATGTTGCCAGCACGC  
CCTTCGGGGTGGTGGGGACTCATGGGGGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA  
GTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTG  
AGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGG  
AGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC

**>PJ75**

TTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGA  
TCTGCGATTACTAGCAACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAAGTGCAGACAGGCTTT  
TTGAGATTCGCTCCACCTCACGGTTTCGCAGCTCATTGTACCTGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGA  
CATAAGGGGCATGATGACTTGACGTGTCCTCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTCCTGTGAGTC  
CCCATCACCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAWC  
ATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGACCATCTCT  
GGCCGTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCAATTAAGCCACATGCTCCGCT  
GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACCTAA  
TGCGTTAGCTGCGGCACCGACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTAGTTCCCACCGTTTACGGCGTGGACT  
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGC  
CTTCGCCACCGGTGTTCTCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCA

CACTCTAGCTAGCCCGTATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACACCCGACGTGACAAG  
CCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGG  
CACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAA  
CCCGAAGGCCGTATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTG  
CTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCG

**>PJ76**

CCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT  
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC  
GGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAG  
TTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC  
GAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC  
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCT  
AACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCC  
GCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACC  
GGAAACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG  
TCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGT  
GCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC  
CCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGC  
GAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAG  
TAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGA

A

**>PJ77**

CCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT  
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC  
GGCTTGTTCGTCGGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAG  
TTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC  
GAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC  
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCT  
AACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCC  
GCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACC  
GGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG  
TCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGG  
TGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATG  
CCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAG  
CGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTA  
GTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACG

**>PJ85**

TTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATT  
ACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGAGATT  
GCTCCACCTCACGGTATCGCAGCTCTTTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGG  
GCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTCCTGTGAGTCCCCATCAC  
CCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA  
CACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGCCTGTCTCCAGACGTTTCC  
GGTGTATGTCAAGCCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGMATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCG  
GGCCCCCGTCAATTCCTYTGAGTTTTAGCCTTGMGKCCGTACTCCCCMGGCGGSGAACTTAAYGCGTTAG  
CTGCGGCACCGRYGAMGTGGAATGTCGCCAACACMTAGTTCACCGTYTACGGCGTGGACTACCAGGG  
TATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCC  
ACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTA  
GCTAGCCCGTATCGACTGCAGACCCGAGGTAAAGCCTCGGGCTTTCACAATCGACGTGACAAGCCGCCTA  
CGAGCTCTTTACGCCC

**>PJ88**

TCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG  
CGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGC  
TCGGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTYTGATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGG  
AGATCGNAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGAT  
CTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC  
CACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAA  
GTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAG  
CGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCGCT  
AGAGATAGTGCCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTKCATGGCTGNTCGNCAGCTCGTGTCTGTGAGATG  
TTGGGTAAAGTNCCCCGAACGAGCGCAACCCTTGTTCTGTGTTGCNAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGA  
CTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCACGCCCTTATGT  
CTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGGGA

**>PJ90**

ACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGC  
GACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCA  
CCTCACGGTATCGCAGCTCTTTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGAT  
GACTTGACGTCTGTCCTCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTCCTGTGAGTCCCCATCACCCNGAA  
GGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG  
CTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGCCTGTCTCCAGACGTTTCCGGTGTA  
TGTAAGCCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCC  
CGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACCTAATGCGTTAGCTGCGGC  
ACCGACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTAGTTCCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT  
CCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGT  
TCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCTAGCC  
CGTATCGACTGCAGACCCGAGGTTAAGCCTCGGGCTTTCACAATCGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTC  
TTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCG  
GCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTC  
ATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG  
GAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCC



**>PJ95**

GTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACT  
 AGCAACTCCAACCTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAAGTGAAGACCGGCTTTTTGAGATTGCT  
 CCACCTCGCGGTATCGCAGCTCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCA  
 TGATGACTTGACGTGTCCTCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTGTGAGTCCCATCACCCC  
 GAAGGGCATGCTGGCAACACAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC  
 GAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGGCACCATCTCTGATGCTTTCCGGT  
 GTATGTCAAGCCTTGGAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGC  
 CCGGTCAATTCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGC  
 GGCACGGACCACGTGGAATGTGGCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  
 AATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGG  
 TGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTG  
 CCCGTATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGCGACAAGCCGCCTACGAGC  
 TCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGC  
 CGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCTCGTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCG  
 TCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGT  
 AGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGC

**>PJ107**

ACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGC  
 GACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAAGTGAAGACCGGCTTTTTGAGATTGCTCCA  
 CCTCACGGTATCGCAGCTCTTTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGAT  
 GACTTGACGTGTCCTCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTCCTGTGAGTCCCATCACCCGAAG  
 GGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC  
 TGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGCCTGTCTCCAGACGTTTCCGGTGTAT  
 GTCAAGCCTTGGAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCC  
 GTCAATTCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGCTGCGGCA  
 CCGACGACGTGGAATGTCGCAACACCTAGTTCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC  
 CTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTT  
 CCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCTAGCCC  
 GTATCGACTGCAGACCCGAGGTTAAGCCTCGGGCTTTCACAATCGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTCT  
 TTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGG

CGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCA  
TCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGG  
AGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGC

**ภาพผนวก ข.**

งานวิจัยจากโครงการนี้ที่มีการเผยแพร่ในงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ



# The 10<sup>th</sup> Young Scientist Seminar

*Establishment of International Research Network  
for Tropical Bioresources and Their Utilization*



NOVEMBER 16<sup>th</sup>-17<sup>th</sup>, 2014  
SEMINAR PARK, YAMAGUCHI, JAPAN



SUPPORTED BY  
YAMAGUCHI UNIVERSITY



|                                                                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Minimum Inhibitory Concentration of Galangal Rhizome Mixed with Straw Ash on Comparative with Fluconazole and Itraconazole on Growth of <i>Pityrosporum ovale</i></b> | <b>34</b> |
| <u>Permara Ayu Kamila</u> , Erna Sulistyowati, Novi Arfarita                                                                                                             |           |
| <b>Investigation of cell motility by flagellum of <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI</b>                                                                          | <b>35</b> |
| <u>Mutsumi Goda</u> , Manami Inoue, Tomoyuki Kosaka and Mamoru Yamada                                                                                                    |           |
| <b>Induced Mutation of <i>Zymomonas mobilis</i> by Ethyl Methane Sulfonate (EMS)</b>                                                                                     | <b>36</b> |
| <u>Jatupat Samappito</u> and Pornthap Thanonkeo                                                                                                                          |           |
| <b>Relation between thermal adaptation and reactive oxygen species generation in <i>Corynebacterium glutamicum</i></b>                                                   | <b>37</b> |
| Ryutaro Murata, Yasutaka Ohnishi, Nawarat Nantapong, Minenosuke Matsutani, Naoya Kataoka, Toshiharu Yakushi and Kazunobu Mutsushita                                      |           |
| <b>Comprehensive identification of human N-myristoylated proteins using Swiss-Prot protein database and cell-free protein synthesis system</b>                           | <b>38</b> |
| <u>Haruna Iwata</u>                                                                                                                                                      |           |
| <b>Group 3</b>                                                                                                                                                           |           |
| <b>Isolation of pathogenicity-related genes in <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i></b>                                                                          | <b>39</b> |
| <u>Mitsunori Kodama</u> , Kazunori Sasaki, Asako Yamada and Shin-ichi Ito                                                                                                |           |
| <b>Effect of modified atmosphere packaging and oxygen absorber used on storage time of Khanom Jaak</b>                                                                   | <b>40</b> |
| Boondarika Sumana, Wannasiri Hirunkerd, Arnon Aemrod, Nucharin Khomsri and <u>Patwinan Suwasri</u>                                                                       |           |
| <b>Studies on dihydroxyacetone kinase of <i>Gluconobacter</i> spp.</b>                                                                                                   | <b>41</b> |
| <u>Kaori Hirata</u> , Minenosuke Matsutani, Naoya Kataoka, Toshiharu Yakushi, Kazunobu Matsushita                                                                        |           |
| <b>Genetic analysis of canine enteric viruses from dogs with diarrhea in Vietnam</b>                                                                                     | <b>42</b> |
| <u>Nguyen Van Dung</u> , Junko Suzuki, Yutaka Terada, Keita Noguchi, Hiroshi Shimoda, Masami Mochizuki, Ken Maeda                                                        |           |
| <b>Production of L-lactic acid by metabolic engineering in thermotolerant <i>Zymomonas mobilis</i></b>                                                                   | <b>43</b> |
| <u>Katsuaki Emoto</u> , Ui Kamatsu, Akira Irie, Yasuyuki Nakajima, Naoko Fujimoto, Masayuki Murata, Tomoyuki Kosaka, and Mamoru Yamada                                   |           |
| <b>Evaluation of antimicrobial activity of Actinomycetes isolated from soil against opportunistic pathogens</b>                                                          | <b>44</b> |
| <u>Panjamaphon Chanthasena</u> and Nawarat Nantapong                                                                                                                     |           |
| <b>Characteristics of a GASP-acquiring mutant and visualization of cell population shifts in long-term stationary phase</b>                                              | <b>45</b> |
| <u>Tomomi Masuda</u> , Junpei Kawaguchi, Tomoyuki Kosaka and Mamoru Yamada                                                                                               |           |

## Evaluation of antimicrobial activity of Actinomycetes isolated from soil against opportunistic pathogens

**Panjamaphon Chanthasena<sup>1</sup> and Nawarat Nantapong<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pharmacology, Faculty of Science, Suranaree University of Technology

<sup>2</sup>Microbiology, Faculty of Science, Suranaree University of Technology

Actinomycetes are filamentous bacteria which play a relevant role in soil ecology. They produce several useful secondary metabolites for example herbicides, pesticides and anti-tumor agents. Almost 80% of commercially and medically useful antibiotics are produced from the genera *Streptomyces* and *Micromonospora*. The majority type of antibiotics such as aminoglycoside, anthracyclins, glycopeptides,  $\beta$ -lactams, macrolides, nucleosides, peptides, polyenes, polyethers, and tetracyclines are produced by these actinomycetes. Nowadays, antimicrobial resistant bacteria have been reaching to a critical level, invalidating antibiotic drugs that are currently used in clinic. The opportunistic pathogen infections are also a serious public health problem in the area where large numbers of people are in close localization. Thus, there is the need for new potent antibiotic agents, particularly against multidrug resistant pathogens and opportunistic pathogens. According to a World Bank report published in 2012, tropical forests cover approximately one third of Thailand's total land area. However, there have been a few studies on actinomycetes in Thai forest soils. The present study attempts to isolate the high potential antibiotics producing actinomycetes from soil that have an activity against opportunistic pathogens.

*Streptomyces rimosus* PJ36 and *Streptomyces luteosporus* PJ95 have been isolated from soil in Nakhon Ratchasima, Thailand. They exhibited antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* TISTR1466, *Staphylococcus epidermidis* TISTR518, *Bacillus subtilis* TISTR008, *Bacillus cereus* TISTR687, *Escherichia coli* TISTR780, *Proteus mirabilis* TISTR100, *Proteus vulgaris*, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5049, *Candida albicans* TISTR5779, and *Candida tropicalis* TISTR5174. However, only *Streptomyces rimosus* PJ36 showed broader antimicrobial spectra against *Enterobacter aerogenes* TISTR1540, *Serratia marcescens* TISTR1354 and *Salmonella typhi* TISTR292. Interestingly, the isolated strains could produce antimicrobial activity at 37°C which was not commonly found in others *Streptomyces* spp. Thus, this finding might be important to give direction for future treatment of opportunistic infections.