



รายงานการวิจัย

ความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนมัยสิทที่หายากจากดิน
ในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ : เพื่อนำไปสู่การค้นหายาออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่

(Diversity of rare actinomycetes isolated from soils in Maewong
National Park: reach to the discovery of novel bioactive compound)

ดร. นารีสลักษณ์ นาแก้ว¹

ผศ.ดร. รักชิณา พลสีลา¹

ผศ.ดร. อภิชาติ วิทย์ตะ¹

นายสุรน เวียงดาว²

1 ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา / สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2 หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ปีที่พิมพ์ 2558



รายงานการวิจัย

ความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนมัยสิทที่หายากจากดิน
ในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ : เพื่อนำไปสู่การค้นหายาออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่

(Diversity of rare actinomycetes isolated from soils in Maewong
National Park: reach to the discovery of novel bioactive compound)

ดร. นารีสลักษณ์ นาแก้ว¹
ผศ.ดร. รักษิณา พลสีลา¹
ผศ.ดร. อภิชาติ วิทย์ตะ¹
นายสุธน เวียงดาว²

1 ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา / สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2 หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ปีที่พิมพ์ 2558



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จากทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้อง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2556 คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์แก่บุคลากรผู้สนใจด้านความหลากหลายทางชีวภาพของแคว้นโนมัยสัทที่หายาก และการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตลอดจนจะเป็นประโยชน์ในการสร้างองค์ความรู้ใหม่ทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพต่อไป

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สัญญาเลขที่ กบง./2556-33

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะกันอย่าง ทำให้เกิดปัญหาการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ จึงนำไปสู่การค้นหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ ซึ่งไม่เพียงแต่นำมาเพื่อแก้ปัญหาเรื่องการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะชนิดเดิมๆ แต่ยังสามารถนำไปใช้ในการแก้ปัญหาโรคอุบัติใหม่ได้อีกด้วย แอคติโนมัยสิทนับว่าเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ใหม่ๆ แหล่งที่มีเชื้อสายพันธุ์ใหม่น่าจะมาจากสถานที่ใหม่ๆ ที่ยังไม่เคยมีคนศึกษามาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายาก เพื่อคาดหวังว่าจะพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์หายากที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ จากดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งยังไม่พบรายงานการศึกษาแอคติโนมัยสิทที่หายากในบริเวณดังกล่าวมาก่อน

ผลการแยกเชื้อแอคติโนมัยสิทจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ทั้งหมด 15 จุด พบว่าได้เชื้อแอคติโนมัยสิททั้งหมด 166 ไอโซเลท ทำการจัดกลุ่มเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดโดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HT agar plate ได้จำนวน 11 กลุ่ม นำตัวแทนกลุ่มมาทำการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับลักษณะทางเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีน พบว่าจัดอยู่ใน 3 จีนัส คือ *Streptomyces* sp., *Microbispora* sp, *Micromonospora* sp จำนวน 54, 8 และ 100 ไอโซเลทตามลำดับ คิดเป็น 33% 5% และ 60% ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ไม่ทราบชนิดเนื่องจากไม่สามารถกระตุ้นให้เชื้อสร้างสปอร์บนอาหารได้ และไม่สามารถสกัด DNA เพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีน อีก 1 กลุ่ม คิดเป็น 2 % ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด จากการทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ เช่น สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antifungal, anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial) เอนไซม์ และ anticancer โดยทดสอบกับเชื้อจำนวน 38 ไอโซเลท พบว่ามีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จำนวน 21 ไอโซเลท คิดเป็น 55 % ของเชื้อที่นำมาทดสอบ และจากเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดพบว่าเป็นกลุ่มของ non-*Streptomycete* ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสิทที่หายากมากกว่า *Streptomyces* คิดเป็นร้อยละ 62 และ 38 ยิ่งไปกว่านี้ยังพบมีเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากที่มีความน่าสนใจ เช่น *Micromonospora* MW1103 มีความสามารถในการสร้างสารได้ 4 ชนิดคือ anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial, เอนไซม์โปรตีเอส และ เอนไซม์เซลลูเลส , *Microbispora* MW1102 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้ 3 ชนิด ทั้ง MW1103 และ MW1102 แยกได้จากดินบริเวณข้างเส้นทางจากที่ทำการอุทยานไปยังช่องเย็น และเชื้อไอโซเลท MW501 และ MW503 ซึ่งแยกได้จากบริเวณที่ทำการอุทยานจัดอยู่ในจีนัส *Micromonospora* sp. โดยไอโซเลท MW501 มีศักยภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยให้ขนาดของโซนยับยั้งมากถึง 40 มิลลิเมตร ส่วน MW503 สามารถยับยั้งเชื้อราได้

จากผลการวิจัยทำให้สรุปได้ว่าดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์เป็นแหล่งของแอคติโนมัยสิทที่หายากที่น่าจะมีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ซึ่งถ้าได้ทำการศึกษาต่อไปอาจสามารถพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่เพื่อใช้ในการแก้ปัญหาการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบันได้

คำสำคัญ

แอคติโนมัยสิทที่หายาก, ความหลากหลายทางชีวภาพ, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ



Abstract

It is conceivable that actinobacteria are a major source of bioactive compounds used currently in medical, pharmaceutical, agricultural and industrial applications. A discovery trend of novel bioactive compounds is believed to be in relation with the discovery rate of novel actinobacteria. Accordingly, most novel actinobacteria recently found are often isolated from unexplored or less known habitats. Maewong National Park that have yet been unexplored for their microbial resource, are an interesting habitat for this study. Thus, our work aims to study of generic diversity of rare actinomycete for discovery of novel bioactive compound.

A total 166 isolates of actinomycetes was isolated from 15 soil samples collected from various site in Maewong National Park. On the basis of morphology studies including colony and spore observations together with some analyses of cell wall compositions like diaminopimelic acid (DAP) and whole cell sugar, the actinomycetes were divided into 11 groups. These studies were done when the actinomycete isolates were grown on Hickey-Tresner agar. Later on, some actinomycetes (11 isolates) from each group were randomly selected for analysis of 16S rRNA gene sequence compared with database of National Center for Biotechnology Information (NCBI). With this classification, we assumed that all actinomycete isolates could belong to 3 genera of actinomycetes including *Micromonospora* (56%), *Microbispora* (5%), *Streptomyces* (33%) and 7 % of identified were found. For the diversity evaluation, the genus *Micromonospora* was found highly abundant followed by the genus *Streptomyces* and *Microbispora* respectively.

Based on evaluation of potential to produce bioactive compound, 55% of all actinomycete isolates (38 isolates) was able to produce bioactive compound. They belong to non streptomycete group than streptomycete (non streptomycete 62 %, streptomycete 38%). There were found four attractive isolates belonged to *Micromonospora*, *Microbispora* and unidentified. *Micromonospora* MW1103 and *Micromonospora* W1102 were isolated from soil collected on the way from Maewong National Park official to chong yen. *Micromonospora* MW1103 could produce 4 bioactive compounds (anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial, protease and cellulase). *Microbispora* MW1102 shows three enzyme activities (protease, amylase and cellulase). Moreover two isolated (MW501 and MW503) which belong to *Micromonospora* sp. also show antimicrobial activities. Isolate MW501 produce potential anti gram+ bacteria by give inhibition zone of 40 mm, while Isolate MW503 show antifungal activity.



We concluded that Maewong National Park is a valuable natural resource that can provide a unique habitat for diverse rare actinomycetes, which can be discovered for enormous applicable benefits.

Key words

Rare actinomycetes, Diversity, Bioactive compound



สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	6-1
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง	6-3
ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย	6-16
ผลการวิจัย	6-23
อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง	6-39
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	6-41
บรรณานุกรม	6-43
คณะผู้วิจัย	6-50

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 Example of new bioactive compounds derived from rare actinomycetes in 2003-2008	6-3
ตารางที่ 2 ชนิดผนังเซลล์แอกติโนมัยสิท	6-6
ตารางที่ 3 แบบแผนน้ำตาลของแอกติโนมัยสิท	6-6
ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนมัยสิท	6-7
ตารางที่ 5 ลักษณะของแอกติโนมัยสิททั้ง 7 กลุ่ม	6-10
ตารางที่ 6 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยสิทที่มีรายงานในช่วงปี ค.ศ. 2003-2005	6-12
ตารางที่ 7 จุดเก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์เพื่อแยกเชื้อแอกติโนมัยสิท	6-16
ตารางที่ 8 ผลการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์	6-24
ตารางที่ 9 การจัดกลุ่มแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ตามลักษณะการเจริญบนอาหาร HT agar plate	6-25
ตารางที่ 10 ชนิดของ DAP isomer และ น้ำตาลที่ผนังเซลล์ ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในแต่ละกลุ่ม	6-28
ตารางที่ 11 ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ของแอกติโนมัยสิทที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม	6-28
ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์ identity ของ ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีนของเชื้อที่แยกได้เมื่อเทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอกติโนมัยสิทในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI	6-32
ตารางที่ 13 ความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์	6-35
ตารางที่ 14 สรุปผลความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยสิทที่แยกได้	6-40

สารบัญญภาพ

	หน้า	
ภาพที่ 1	วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสิท	6-4
ภาพที่ 2	ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายของแอกติโนมัยสิท	6-5
ภาพที่ 3	โครงสร้างเปปติโดไกลแคนที่มี DAP ชนิด LL-isomer ของแอกติโนมัยสิทผนังเซลล์กลุ่มที่ I, M = NAM และ G = NAG	6-7
ภาพที่ 4	โครงสร้างเปปติโดไกลแคนที่มี DAP ชนิด meso-isomer ของแอกติโนมัยสิทผนังเซลล์กลุ่มที่	6-8
ภาพที่ 5	Mycostop	6-14
ภาพที่ 6	อุทยานแห่งชาติแม่वंงก์	6-15
ภาพที่ 7	ช่องเยื่อ	6-15
ภาพที่ 8	การเตรียมตัวอย่างดินเพื่อนำมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสิท	6-17
ภาพที่ 9	Restreak แอกติโนมัยสิทที่แยกได้บนอาหาร HT agar plate และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร HT agar slant	6-17
ภาพที่ 10	เทคนิคการปักสไลด์เพื่อศึกษาสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	6-18
ภาพที่ 11	การทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay	6-21
ภาพที่ 12	การวัดขนาดของโซนยับยั้ง (Inhibition Zone)	6-21
ภาพที่ 13	จุดเก็บตัวอย่างดินบางบริเวณ	6-23
ภาพที่ 14	ลักษณะการเจริญบนอาหาร HT agar plate ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในแต่ละกลุ่ม	6-26
ภาพที่ 15	ลักษณะการสร้างสปอร์เมื่อมีการเจริญบนอาหาร HT agar plate เป็นเวลา 15 วัน ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในแต่ละกลุ่ม	6-27
ภาพที่ 16	Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในกลุ่มจิ้นัส <i>Microbispora</i> เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ใช้ลำดับเบสของ <i>Streptomyces sporocinereus</i> เป็นกลุ่ม Outgroup สำหรับ rooting tree และจำนวนแสดงบนกิ่ง (%) มาจาก 1000 bootstrap tree Bar, 0.01 K_{nuc} .	6-33
ภาพที่ 17	Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในกลุ่มจิ้นัส <i>Streptomyces</i> เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ใช้ลำดับเบสของ <i>Microbispora rosea</i> เป็นกลุ่ม Outgroup สำหรับ rooting tree และจำนวนแสดงบนกิ่ง (%) มาจาก 1000 bootstrap tree Bar, 0.01 K_{nuc} .	6-33
ภาพที่ 18	Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในกลุ่มจิ้นัส <i>Micromonospora</i> เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ใช้ลำดับเบสของ <i>Acrocarpospora phusangensis</i> เป็นกลุ่ม Outgroup สำหรับ rooting tree และจำนวนแสดงบนกิ่ง (%) มาจาก 1000 bootstrap tree Bar, 0.01 K_{nuc} .	6-34
ภาพที่ 19	ความสามารถของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียทดสอบ	6-37
ภาพที่ 20	ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆของเชื้อแอกติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่वंงก์	6-38
ภาพที่ 21	กราฟแสดงจำนวนร้อยละของเชื้อที่แยกได้ในแต่ละจิ้นัส	6-39

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะกันอย่างแพร่หลายทั้งในการแพทย์ และการเกษตร ทำให้เกิดการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคเพื่อให้เกิดการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ ทำให้สารปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ไม่ได้ผล จึงนำไปสู่การค้นหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ ซึ่งไม่เพียงแต่นำมาเพื่อแก้ปัญหาเรื่องการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะชนิดเดิมๆ การค้นหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ ยังสามารถนำไปใช้ในการแก้ปัญหาโรคอุบัติใหม่ได้อีกด้วย นักวิทยาศาสตร์ และนักวิจัยทางการแพทย์ ได้ทำการพัฒนายาขึ้นมาใหม่ๆ อย่างต่อเนื่อง ในกระบวนการพัฒนายาดังกล่าว การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างพื้นฐานของยาเพื่อสร้างบทบาทหรือกลไกใหม่ๆ โดยใช้โครงสร้างพื้นฐานของยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมาเป็นสารตั้งต้นเพื่อดัดแปลงด้วยวิธีทางเอนไซม์เทคโนโลยี (enzyme technology) อย่างไรก็ตามยาปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมีความหลากหลายของโครงสร้างพื้นฐานที่จำกัด ดังนั้นการแสวงหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ ที่มีโครงสร้างพื้นฐานใหม่ๆ จึงมีความสำคัญและจำเป็นต้องศึกษาในจุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการค้นพบสารชนิดเดิมๆ จากเชื้อที่มีพันธุกรรมแบบเดิมที่มีการค้นพบและใช้มาก่อนแล้ว

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นบริเวณเส้นศูนย์สูตร (Equator) ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ความหลากหลายทางชีวภาพเกิดจากสิ่งมีชีวิตที่มีองค์ประกอบทางพันธุกรรมแตกต่างกัน เพื่ออำนวยความสะดวกในการดำรงชีวิตได้สอดคล้องและเหมาะสมกับสภาพแหล่งที่อยู่อาศัย จุลินทรีย์จัดเป็นอีกสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากวิวัฒนาการอันยาวนาน จุลินทรีย์ที่มีสปีชีส์เดียวกันอาจจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกันทุกประการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์มีความสำคัญอย่างยิ่งในการนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ

แอคติโนมัยสิทเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อในสกุล *Streptomycete* ซึ่งมีการศึกษากันมากทำให้ในระยะหลังๆ โอกาสที่จะได้สารใหม่จากเชื้อชนิดนี้ลดลง ในปัจจุบันนักวิจัยจึงมุ่งไปสู่อแอคติโนมัยสิทในสกุลอื่นๆ นอกเหนือจาก *Streptomycete* ที่จัดเป็นแอคติโนมัยสิทที่หายาก (rare actinomycetes) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ใหม่ๆ จึงกลายเป็นแหล่งที่น่าสนใจของการศึกษา เพื่อการค้นหายาชนิดใหม่ๆ ต่อไป หลายปีที่ผ่านมาความพยายามที่จะค้นหาสารชนิดใหม่จากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากในประเทศไทย ปัจจุบันสารหลายชนิดอยู่ในระหว่างการดำเนินการทำให้บริสุทธิ์และค้นหาโครงสร้าง มีรายงานเพียง micromonosporin A ที่สร้างโดย *Micromonospora* sp. ที่แยกได้จากป่าพลู (peat swamp forest) (Thawai *et al.*, 2004) เท่านั้น แหล่งที่มีเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากสายพันธุ์ใหม่น่าจะมาจากสถานที่ใหม่ๆ ที่ยังไม่เคยมีคนศึกษามาก่อน ดังนั้นจึงนำมาสู่งานวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ จากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากจากดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งยังไม่พบรายงานการศึกษาแอคติโนมัยสิทที่หายากในบริเวณดังกล่าวมาก่อน ซึ่งผลการวิจัยในครั้งนี้ น่าจะได้ข้อมูลที่จะนำไปสู่การจัดการคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพเพื่อเป็นประโยชน์ในการผลิตสารซึ่งมีผลต่อสุขภาพและอนามัยของประชาชน ลดการนำเข้าตัวยามีราคาแพงจากต่างประเทศเป็นการช่วยลดภาระค่าครองชีพของประชาชน ทั้งนี้ยังช่วยส่งเสริมศักยภาพของการพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์สูงสุด



วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ใหม่โดยการหาสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลของเชื้อแอคติโนมัยสิตที่หายากที่แยกได้จากดินในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
2. ศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิตสายพันธุ์ใหม่ที่ได้

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันเชื้อก่อโรคหลายชนิดได้มีการพัฒนาพัฒนาสายพันธุ์ให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้กันเป็นประจำ ทั้งในการเกษตรซึ่งเกิดจากการใช้สารเคมี และสารปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายทำให้แมลงและเชื้อก่อโรคพืชชนิดต่างๆ ทนต่อสารที่ใช้ทำให้ต้องเปลี่ยนสารที่ใช้ในการป้องกันกำจัดเสมอๆ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในทางการแพทย์ เชื้อดื้อยาหลายสายพันธุ์ เช่น *Staphylococcus aureus* ซึ่งพบว่าต้านทานต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด โดยสายพันธุ์ Mithicillin resistant *Staphylococcus aureus* ที่มักพบในโรงพยาบาล ซึ่งมีเพียงยา vancomycin เท่านั้นที่สามารถรักษาได้ แต่ปัจจุบันพบว่ามีการพัฒนาสายพันธุ์จนสามารถต้านทานต่อยา vancomycin ได้ (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*) (Ceylan *et al.*, 2008) Mycobacterium tuberculosis complex ก็เป็นเชื้ออีกกลุ่มหนึ่งที่พบว่ามี การต้านทานต่อยาหลายชนิด (Multidrug-resistant tuberculosis (MDR TB)) (Thomas *et al.*, 2007)

แอคติโนมัยสิทนับว่าเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อในสกุล Streptomyete โดยพบว่าสามในสี่ของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบันได้มาจากแอคติโนมัยสิทกลุ่มนี้ (Takizawa *et al.*, 1993) จากเหตุผลดังกล่าวในเวลา 50 ปีที่ผ่านมา ทำให้มีการศึกษางานสารปฏิชีวนะจาก Streptomyete กันอย่างกว้างขวาง จนกระทั่งปัจจุบันอัตราการค้นพบสารชนิดใหม่ที่สร้างโดยแอคติโนมัยสิทกลุ่มนี้มีจำนวนลดลง เพราะสารส่วนใหญ่ที่พบในระยะหลังเป็นสารชนิดเดิม เนื่องจากเชื้อที่แยกมาได้เป็นเชื้อกลุ่มเดิม ดังนั้นแอคติโนมัยสิทในสกุลอื่นๆ นอกเหนือจาก Streptomyete (rare actinomycetes) จึงกลายเป็นแหล่งที่น่าสนใจของการศึกษาเพื่อการค้นหายาชนิดใหม่ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอคติโนมัยสิทที่หายากสายพันธุ์ใหม่ๆ (Takahashi and Omura, 2003) ซึ่งปัจจุบันพบรายงานสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแอคติโนมัยสิทที่หายากเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (ตาราง 1)

ตาราง 1 Example of new bioactive compounds derived from rare actinomycetes in 2003-2008

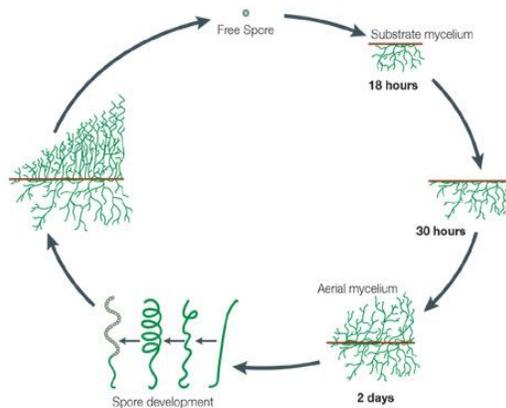
Producer	Bioactive compound	Activity	Reference
<i>Micromonospora</i> sp.	Kosinosporin	Antitumor	Furumai <i>et al.</i> , 2003
<i>Micromonospora</i> sp.	R176502	Antitumor	Laakso <i>et al.</i> , 2003
<i>Actinomadura</i> sp.	Chandrananimycin A, B,C	Antitumor	Maskey <i>et al.</i> , 2003
<i>Actinomadura</i> sp.	IB-00208	Antitumor	Malet <i>et al.</i> , 2003
<i>Nonomuraea</i> sp.	A40926, dechlorinated	Antibacteria	Beltrametti <i>et al.</i> , 2003
<i>Nonomuraea</i> sp.	A40926, monochlorinated	Antibacteria	Beltrametti <i>et al.</i> , 2003
<i>Kitasatospora cheerisanensis</i>	bafilomycin C1-amide	Antitumor	Moon <i>et al.</i> , 2003
<i>Kibdelosporangium</i> sp.	Kibdelones	anticancer	Ranjala <i>et al.</i> , 2007
<i>Verrucosispora</i> sp.	Proximicin A, B and C	Antibacterial and Antitumor	Fielder <i>et al.</i> , 2008

หลายปีที่ผ่านมา มีรายงานการค้นพบแอคติโนมัยสิทสายพันธุ์ใหม่ในประเทศไทย (Thawai *et al.*, 2004b; Thawai *et al.*, 2005a,b; Thawai *et al.*, 2008; Chomchoei *et al.*, 2011; Jongrungruangchok *et al.*, 2008) และมีความพยายามที่จะค้นหายาชนิดใหม่จากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากในประเทศไทย ปัจจุบันสารหลายชนิดอยู่ในระหว่างการดำเนินการทำให้บริสุทธิ์และค้นหาโครงสร้าง และมีรายงานเพียง

micromonosporin A ที่สร้างโดย *Micromonospora* sp. ที่แยกได้จาก peat swamp forest (Thawai *et al.*, 2004a) เท่านั้น

1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอกติโนมัยสิท

เชื้อแอกติโนมัยสิทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ใน order Actinomycetales ที่มีปริมาณ guanine และ cytosine ในเซลล์สูงกว่า 55 % จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ยกเว้นบางชนิดที่ไม่ต้องการหรือต้องการออกซิเจนเล็กน้อยในการเจริญ เชื้อแอกติโนมัยสิทเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายตั้งแต่ลักษณะทรงกลม ท่อน และเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา ที่มีการแตกแขนงและมีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศหรือการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในเชื้อแอกติโนมัยสิทส่วนใหญ่ สปอร์มีทั้งแบบที่ไม่มีถุงหุ้ม (conidia) เป็นเม็ดเดี่ยวๆ และเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย และแบบที่สร้างอยู่ในอับสปอร์ (sporangium) เชื้อแอกติโนมัยสิทแตกต่างจากเชื้อราตรงที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสและไมโทคอนเดรีย (Goodfellow and Brand, 1980) แอกติโนมัยสิทส่วนใหญ่จะพบทั่วไปในดินทั้งบนบกและในทะเล เนื่องจากคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์และมีหลายชนิดที่ทนต่อความเค็ม (Jensen *et al.*, 1991) อย่างไรก็ตามการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแอกติโนมัยสิทในระยะแรกๆ มักเป็นการศึกษาจากแหล่งที่อยู่บนบกเป็นส่วนใหญ่และวัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสิทแสดงดังภาพที่ 1 ซึ่งวัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสิทจะเริ่มต้นจากการสร้างเส้นใยใต้พื้นผิวอาหาร เพื่อใช้สารอาหารในการเจริญเติบโต และภายหลังจะมีการสร้างเส้นใยอากาศเพื่อใช้สืบพันธุ์ หรือในกรณีที่มีการขาดอาหาร การขาดน้ำ หรือการสะสมสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์



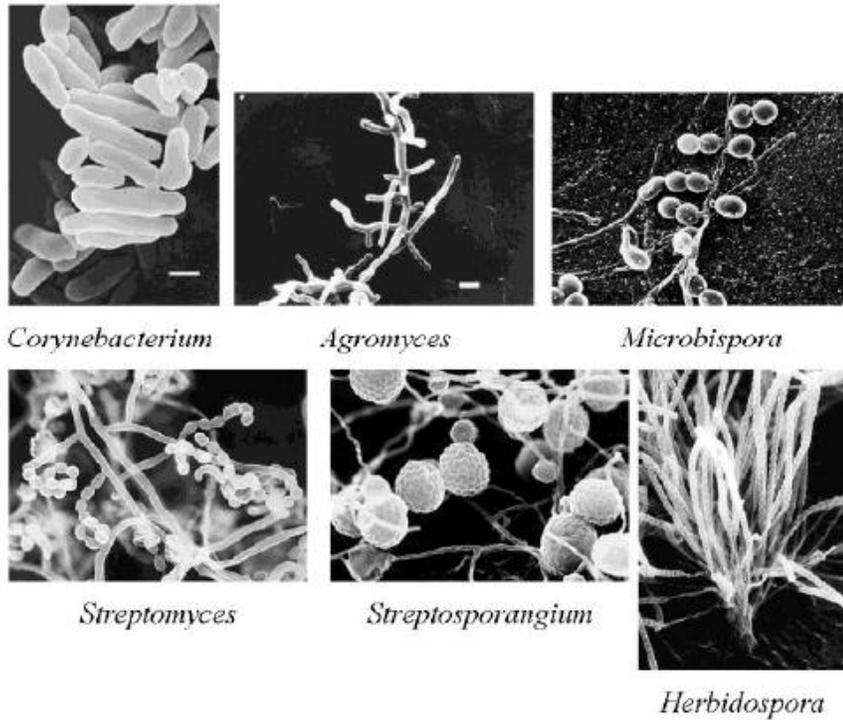
ภาพที่ 1 วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสิท

ที่มา : <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n3/images/nrmicro1096-f6.jpg>

แอกติโนมัยสิทมีการสร้างสปอร์ได้ทั้งบนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ หรือสร้างบนเส้นใยชนิดใดชนิดหนึ่ง บางชนิดมีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า โคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) หรือ (conidia) ไปจนถึงสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้และอยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ สามารถแบ่งกลุ่มแอกติโนมัยสิทตามรูปร่างและการเรียงตัวของสปอร์ได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ (Miyadoh, 1997) คือ

1. กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว หรือสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายสั้นๆ
2. กลุ่มที่สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว
3. กลุ่มที่สร้างสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์

4. กลุ่มที่สร้างสปอร์นอกเหนือจากที่ได้กล่าวมาแล้วทั้งหมด



ภาพที่ 2 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายของแอกติโนมัยสิท

ที่มา : Miyadoh (1997)

เส้นใยอาหารมีการเจริญแตกกิ่งก้านยึดเกาะกันไปมา ทำให้เห็นโคโลนีมีลักษณะคล้ายแผ่นหนังและเจริญฝังแน่นลงในเนื้อวุ้น ส่วนโคโลนีที่มีลักษณะอ่อนนุ่มและร่วนเกิดจากเส้นใยแตกหักเป็นรูปท่อนหรือทรงกลม โคโลนีของแอกติโนมัยสิทหลายสกุล เช่น *Streptomyces* จะปกคลุมไปด้วยเส้นใยอากาศที่ห่อหุ้มด้วยชั้นของผิวที่เป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) และเจริญขึ้นสู่ด้านบนในระยะเริ่มแรกเส้นใยอากาศมีสีขาวและจะเปลี่ยนเป็นสีต่างๆเมื่อเริ่มมีการสร้างสปอร์ ทำให้เห็นโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งหรือคล้ายกำมะหยี่ (Williams *et al.*, 1989) สีของเส้นใยอาหารและอากาศมีตั้งแต่สีขาว สีน้ำตาล สีเหลือง สีชมพู สีส้ม สีดำ สีเทา สีม่วง สีแดง เป็นต้น บางชนิดสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำแพร่ออกมาในอาหารและมีสีต่างๆกัน เช่น สีเหลือง สีส้ม สีเทา สีน้ำตาล สีชมพู เป็นต้น

เส้นใยที่แตกกิ่งก้านสามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากเลี้ยงผ่านไป 24 ชั่วโมง และจะเห็นเป็นโคโลนีในวันที่ 3-4 ของการเจริญ ในขณะที่เส้นใยอากาศจะใช้เวลา 7-14 วันจึงจะเจริญเต็มที่ และในบางชนิดอาจใช้เวลานานถึง 1 เดือน แอกติโนมัยสิทที่เลี้ยงในอาหารเหลวมีลักษณะการเจริญเป็นกลุ่มก้อน (pellet) เนื่องจากการงอกของสปอร์และการพันกันแน่นของเส้นใย (Williams *et al.*, 1989)

แอกติโนมัยสิทมีค่า generation time ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เจริญได้ในอาหารที่มีค่า a_w (water activity) เท่ากับ 1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ (W/W) และอาจมากถึง 3.0 เปอร์เซ็นต์ ในบางสกุล เจริญได้ดีในช่วง pH 6.5-8.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส (Williams *et al.*, 1989) แต่มีบางพวกที่เป็น thermophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 50-65 องศาเซลเซียส เช่น ในดินปุ๋ยคอกและปุ๋ยหมัก (Cross, 1968)

2. องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของแอกติโนมัยซีท โดยดูจากกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (Major wall amino acid) และชนิดของน้ำตาลในเซลล์ทั้งหมด (whole cell hydrolysate) สามารถจำแนกชนิดขององค์ประกอบของผนังเซลล์แอกติโนมัยซีทได้เป็น 4 ลักษณะดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 ชนิดผนังเซลล์แอกติโนมัยซีท

ที่มา :Bergey's Manual Systematic Bacteriology เล่ม 4 (Willam, 1989)

Type	Major amino acid	Distinguishing major constituent
I	LL-DAP	Glycine
II	Meso-DAP	Glycine
III	Meso-DAP or OH-DAP	None
IV	Meso-DAP	None

ตารางที่ 3 แบบแผนน้ำตาลของแอกติโนมัยซีท

ที่มา : Bergey's Manual Systematic Bacteriology เล่ม 4 (Willam, 1989)

Type	Diagnostic Sugar
A	Arabinose, Galactose
B	Madurose
C	None
D	Xylose, Arabinose

ในปี 1956 Cummins and Harris ได้แบ่งกลุ่มแอกติโนมัยซีทตามชนิดขององค์ประกอบทางเคมีที่ผนังเซลล์ไว้ทั้งหมด 8 กลุ่ม (ตารางที่ 3) โดยมีชนิดของ 2,6-diaminopimelic acid (DAP) เป็นส่วนประกอบของเปปติโดไกลแคน DAP มี 2 ชนิด คือ LL-DAP และ *meso*-DAP ซึ่งพบในกลุ่มผนังเซลล์ชนิดที่มี I และกลุ่มผนังเซลล์ชนิดที่ II-IV ตามลำดับ ไม่พบ DAP ในกลุ่มผนังเซลล์ชนิดที่ V-VI แต่พบกรดอะมิโน Lysine นอกจากนี้ยังมี Ornithine, Aspartic acid, Diaminobutylic acid (DAP) เป็นต้น

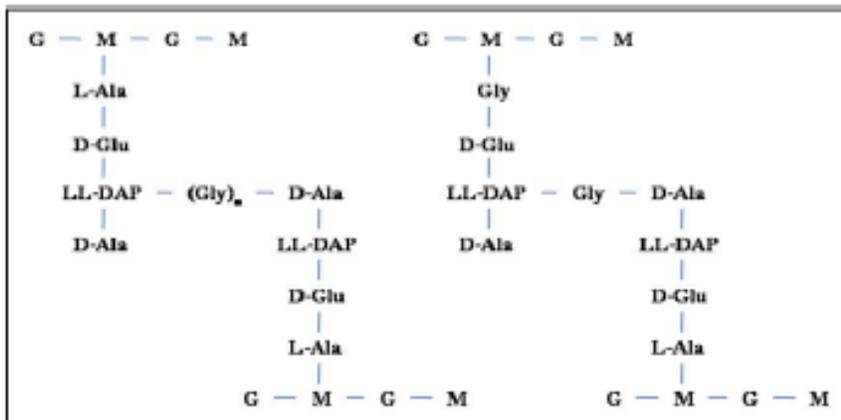
เปปติโดไกลแคนในแอกติโนมัยซีทประกอบด้วย N-acetyl glucosamine (NAG) เชื่อมกับ N-acetyl muramic acid (NAM) ด้วยพันธะ β -(1,4)-glycosidic ได้เป็นสาย glycantetrapeptide แต่ละสายจะมาเชื่อมกันด้วยพันธะเพปไทด์ที่เป็น interpeptide bridge ระหว่าง L-diamino acid กับ D-Ala ซึ่งความแตกต่างระหว่างแอกติโนมัยซีทที่มีผนังเซลล์จัดอยู่ในกลุ่มที่ I-IV พบว่าในกลุ่มที่ I มี glycine bridge เป็นตัวเชื่อมระหว่าง LI-DAP กับ D-Ala (ภาพที่ 3) กลุ่มที่ II-IV ไม่พบกรดอะมิโนใน interbridge ที่เชื่อมระหว่าง *meso*-DAP กับ D-

Ala โดยกลุ่มที่ II มี glycine เป็นตัวเชื่อมระหว่าง NAM กับ D-Glu ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มที่ I, III และ IV ที่มี L-Ala เป็นตัวเชื่อมระหว่าง NAM กับ D-Glu (ภาพที่ 4)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนมัยสิท
ที่มา : Goodfellow (1985)

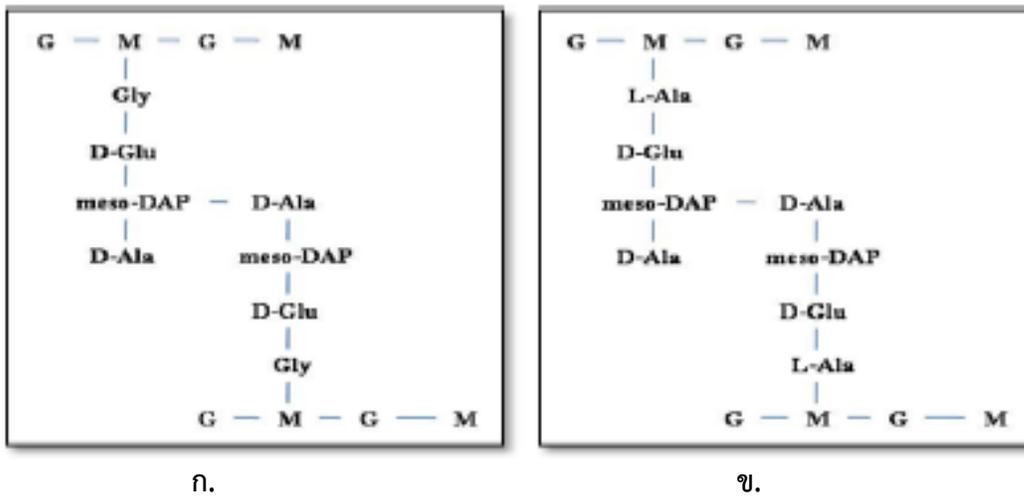
Major constituent	Chemotype							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
L-Diaminopimelic acid	+							
<i>meso</i> -Diaminopimelic acid		+	+	+				
Diaminobutyric acid							+	
Aspartic acid						v		
Glycine	+	+					+	
Lysine					+			
Ornithine					+			+
Arabinose				+				
Galactose				+		v		

หมายเหตุ v=variable



ภาพที่ 3 โครงสร้างเปปติโดไกลแคนที่มี DAP ชนิด LL-isomer ของแอกติโนมัยสิทผนังเซลล์กลุ่มที่ I, M = NAM และ G = NAG

ที่มา : Kudo (2008)



ภาพที่ 4 โครงสร้างเปปติโดไกลแคนที่มี DAP ชนิด *meso-isomer* ของแอคติโนมัยสิทผนังเซลล์กลุ่มที่ II (ก.) ผนังเซลล์กลุ่มที่ III และกลุ่มที่ IV (ข.) M = NAM และ G = NAG
ที่มา :Kudo (2008)

3. การจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสิท

Bergey's Manual Systematic Bacteriology เล่ม 4 (Willam *et al.*, 1989) ได้แบ่งประเภทของเชื้อแอคติโนมัยสิทโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์เป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ Nocaddioforms, Multilocular sporangia, Acinoplanetes, Streptomycete, Maduromycetes, Theromnbospora, Thermoactinomycete และกลุ่มที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มต่างๆข้างต้น

3.1 Nocardioforms

Nocardioforms เป็นกลุ่มที่เส้นใยมีการแตกหักเป็นแท่งหรือกลม บางชนิดสามารถสร้างโคนิเดีย แอคติโนมัยสิทกลุ่มนี้ทุกสกุลเป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ ยกเว้น *Oerskoviae* ซึ่งเป็นพวกที่ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ เชื้อในกลุ่มนี้มีผนังเซลล์เป็นแบบ I(LI-DAP และ glycine) ในสกุล *Nocardia* และ *Rhodococcus* ที่ผนังเซลล์จะมี mycolic acid และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type A (Arabinose และ Galactose)

3.2 Actinomycetes with multilocular sporangium

เชื้อในกลุ่มนี้ใช้ลักษณะ multilocular sporangium เป็นหลักในการจำแนกประเภทแยกออกจากเชื้อแอคติโนมัยสิทกลุ่มอื่นๆ แอคติโนมัยสิทในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 สกุล ดังนี้ *Dermatophilus*, *Geodermatophilus* และ *Frankia* โดยมีลักษณะแตกต่างกันคือ เชื้อสกุล *Geodermatophilus* ซึ่งมีเส้นสายงายๆที่ยังไม่พัฒนามากนัก thullus ทั้งหมดสร้างเป็น sporangium ส่วนสกุล *Dermatophilus* เส้นสายจะมีการพัฒนามากขึ้นมีการสร้าง multilocular sporangium แบบยาวและสกุล *Frankia* มีการสร้าง sporangium และ filament ทั้งบริเวณ intercalary swelling ตอนปลายหรือบนกิ่ง lateral branches ทั้ง 3 สกุลจะไม่พบการสร้างเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศ (aerial mycelium)

3.3 Actinoplanetes

แอกติโนมัยสิทในกลุ่ม Actinoplanetes มีทั้งสิ้น 5 สกุล ดังนี้ *Actionplanes*, *Ampullariella*, *Pilimelia*, *Dactylosporangium* และ *Micromonospora* เชื้อในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่อยู่ในน้ำ เพราะเป็นกลุ่มที่มีสปอร์เคลื่อนที่ได้ในน้ำในช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตยกเว้น *Micromonospora* ลักษณะสำคัญของเชื้อกลุ่มนี้คือ เจริญโดยไม่มีการแตกหัก มีการแตกกิ่งก้านแล้วสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยที่มีผนังกัน เส้นใยมีการพัฒนาน้อยคือจะเห็นเพียงบางๆ เชื้อในกลุ่มนี้มี DAP ที่ผนังเซลล์แบบ III (Meso-DAP และ OH-DAP) และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type D (Xylose และ Arabinose)

Micromonospora สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ เกิดขึ้นเดี่ยวๆ ไม่มีก้านหรือมีเพียงสั้นๆ มักพบรวมเป็นกลุ่ม มีลักษณะกลม รูปไข่หรือวงรี ผนังหนาบางครั้งพบตุ่มหรือหนามที่ผนัง พวกที่สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ใน sporangia หรือ vesicles ซึ่งมีการพัฒนาให้ไปอยู่ที่ส่วนปลายของ sporangiophore มีทั้งขนาดสั้นและยาว สปอร์มักถูกสร้างอยู่ใน sporangium ที่ถูกปกคลุมไว้ด้วยกิ่งก้านที่แตกหัก หรือบางทีก็เป็นเส้นใยของ mutisporous sporangia มีหลายรูปร่าง

3.4 Streptomycetes และเชื้อใน genera ที่เกี่ยวข้อง

แอกติโนมัยสิทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล ดังนี้ *Streptomyces*, *Streptovercillium*, *Kineosporia* และ *Sporichthya* ลักษณะที่สำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือ เส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกันมีเส้นใยขึ้นมาในอากาศ และเมื่อเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์เป็นลูกโซ่ มีจำนวนสปอร์ตั้งแต่ 3 ขึ้นไป ผิวของโคโลนีลักษณะย่นๆ เมื่อมีอายุมาก ที่ผิวหน้าของเส้นใยมีลักษณะเป็นฝุ่นผง ซึ่งก็คือสปอร์ที่สร้างขึ้นนั่นเอง เชื้อในกลุ่มนี้มี DAP ที่ผนังเซลล์เป็นแบบ I (LI-DAP)

3.5 Maduromycetes

แอกติโนมัยสิทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 7 สกุล ดังนี้ *Actinomadura*, *Microbiospora*, *Microtetraspora*, *Planobispora*, *Planomospore*, *Spirillospora* และ *Streptosporangium* กลุ่มนี้เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ สร้างเส้นใยราบที่มีการแตกแขนงไม่มีสปอร์ แต่มีเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศซึ่งมีการสร้าง arthospore ที่มีลักษณะเป็นสายสั้นหรือใน sporangia ที่มี 1 ถึงหลายสปอร์ ผนังเซลล์เป็นแบบ III (Meso-DAP) น้ำตาลในเซลล์เป็นแบบ type B คือน้ำตาล 3-O-methyl-D-galactose (madurose)

3.6 Thermomonospora and Related Genera

แอกติโนมัยสิทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล ดังนี้ *Thermomonospora*, *Actinosynnema*, *Nocardioosis* และ *Streptoalloteichus* กลุ่มนี้เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญและสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยที่แตกกิ่งก้านชูในอากาศ ผนังเซลล์เป็นแบบ III (Meso-DAP) ไม่มี mycolic acid แต่มี menaquinone ที่มี isoprenoid จำนวน 9-10 หน่วย (MK-9, MK10) การเรียงตัวและลักษณะของสปอร์จะแตกต่างกันไปตามสกุล

3.7 Thermoactinomycetes

กลุ่มนี้มีเพียงสกุลเดียวคือ *Thermoactinomycetes* ซึ่งเป็นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงซึ่งในกลุ่มนี้จะมีเอ็นโดสปอร์อย่างแท้จริง ทนความร้อนได้ดี และมีคุณสมบัติของเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรียครบถ้วน มี G+C Content ต่ำกว่าพวกแอกติโนมัยสิททั่วไป แต่ไปมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพวก *Bacillus* และมีการพัฒนาสร้างเส้นใยอย่างดี และมีสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากพวก *Bacillus*

นอกจากนั้นกลุ่มนี้มีการสร้างเส้นใยสูงขึ้นในอากาศพวก *T. dichotomous* มีสีเหลืองส่วนพวกอื่นจะมีสีขาวทุกสปีชีส์เป็นพวกต้องการอากาศในการเจริญ และเป็นพวกที่ชอบย่อยสลายซากและเกือบทั้งหมดเป็นพวกที่ชอบเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูง เจริญได้ไม่ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียสผนังเซลล์กลุ่มนี้เป็นแบบที่ III แต่จะไม่มีลักษณะของน้ำตาลและ amino acid ส่วน menaquinone เป็นแบบไม่อิ่มตัวเช่น MK-7 หรือ MK-9 ในสปอร์ dipicolinic acid อยู่

3.8 กลุ่มอื่นๆ

แอคติโนมัยสิทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล ดังนี้ *Glycomyces*, *Kibdelosporangium*, *Kitasatosporia* และ *Saccharothrix* เป็นกลุ่มที่ยังหาความสัมพันธ์กับแอคติโนมัยสิทกลุ่มอื่นๆไม่ได้

ตารางที่ 5 ลักษณะของแอคติโนมัยสิททั้ง 7 กลุ่ม

ที่มา : Glszer และ Nikiado

Group	Cell wall type	Cell sugar patterns	Mol % G+C	Sporangia
Nocardioforms	I	A	59-79	-
Multilocular sporangia	III	B,C,D	57-75	+/-
Actinoplanetes	II	D	71-73	+
Streptomycetes	I	-	69-78	-
Maduromycetes	III	B,C	64-74	+/-
Thermomonospora	III	major C	64-73	-
Thermoactinomycetes	III	C	52-55	-

4. ประโยชน์ของแอคติโนมัยสิท

4.1 สร้างสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารปฏิชีวนะกว่า 10,000 ชนิดที่รู้จัก ผลิตโดยจุลินทรีย์ สัตว์ส่วน 2 ใน 3 ผลิตโดย จุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสิทและ 74 เปอร์เซ็นต์ มาจากแอคติโนมัยสิทในสกุล *Streptomyces* รองลงมาคือ สกุล *Actinomadura* และ *Micromonospora* (Miyadoh, 1993)

Castillo *et al.* (2003) รายงานว่าสารปฏิชีวนะ kakadumycins ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. NRRL 30566 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ส่วนสารปฏิชีวนะ meroparamycin ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. MAR01 สามารถยับยั้งได้ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และ *Candida albicans* (El-Naggaret *et al.*, 2006) หรือ *Streptomyces padanus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ fungichromin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctoniasolani* ได้ (Shih *et al.*, 2003)

แอคติโนมัยสิทหลายชนิด โดยเฉพาะจีนัส *Streptomyces* มีรายงานว่าสามารถสร้าง protease inhibitor ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง human immune-deficiency virus type 1 (Clercq, 2001),

cytomegalovirus (Shu *et al.*, 1997) และไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Lozitsky *et al.*, 2002; Angelova *et al.*, 2006) ได้ นอกจากนี้ Kim and Park (2008) รายงานว่า *Streptomyces clavuligerus* สามารถผลิต tacrolimus ซึ่งเป็นยาระงับภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant) ได้

สารปฏิชีวนะ ivermectin จาก *Streptomyces avermectinius* ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในปศุสัตว์ สามารถควบคุมโรคที่เกิดจากปรสิตทั้งที่อยู่บนผิวหนังและภายในร่างกายสัตว์ เช่น หนอนตัวกลม เห็บ พยาธิ ตัวไร นิยมนำมาใช้ในสัตว์จำพวกโค แกะ ม้า หมู เป็นต้น (Omura and Crump, 2004) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่ผลิตโดยแอคติโนมัยสิทแสดงไว้ในตารางที่ 5

4.2 ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer)

แอคติโนมัยสิทเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากในดิน สามารถผลิตเอนไซม์ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ที่ช่วยย่อยสลายสารต่างๆ เช่น ลิกนิน ไคติน เซลลูโลส เป็นต้น นอกจากนี้บางชนิดสามารถย่อยสลายยาปราบศัตรูพืช เช่น diuron (Castillo *et al.*, 2006) และ alachlor ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชที่มีพิษรุนแรง (Sette *et al.*, 2005) และย่อยสลายยาฆ่าแมลง lindane (γ - hexachloro cyclohexane) (Benimeli *et al.*, 2008)

แอคติโนมัยสิทสามารถย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น สารประกอบจากพวก chlorobenzene, dichlorobenzene และ phenol (Reh fuss and Urban, 2005) รวมทั้งของเสียที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น 1,4-dioxane (Parales *et al.*, 1994) และสามารถย่อยสลายพลาสติกชนิด Polytetramethylene succinate (PTMS) (Jarerat and Tokiwa, 2001)

แอคติโนมัยสิทหลายชนิดสามารถทนและดูดซับสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ เช่น Polti *et al.* (2007) รายงานว่าแอคติโนมัยสิทสกุล *Streptomyces* และ *Amycolatopsis* สามารถทนต่อสารประกอบโครเมียม (Cr (VI)) และสะสมสารดังกล่าวไว้ในเซลล์ ซึ่งสามารถนำมาใช้บำบัดการปนเปื้อนโครเมียมในสิ่งแวดล้อมได้ (Amoroso *et al.*, 2001)

ตารางที่ 6 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่เกิดโดยแอคติโนมัยซิสที่มีรายงานในช่วงปี ค.ศ. 2003-2005
ที่มา : Lam (2006)

สาร	แอคติโนมัยซิส	กิจกรรมการยับยั้ง
Abyssomicins	<i>Ferricosispora</i> sp.	Antibacterial
Aureoverticillactam	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	Anticancer
Bonactin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; antifungal
Caprolactones	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Chandrananimycins	<i>Actinomaadura</i> sp.	Antialgal; antibacterial; anticancer; antifungal
Chinikomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Chloro-dihydroquinones	Novel actinomycete	Antibacterial; anticancer
Diazepinomicin	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial; anticancer; anti-inflammatory
3,6-disubstituted indoles	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial
Gutingimycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Helquinoline	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacterial
Himalomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Komodoquinone A	<i>Streptomyces</i> sp.	Neuritogenic activity
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacterial
Marinomycins	' <i>Marinispora</i> '	Antibacterial; anticancer
Mechercharmycins	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer
Sporolides	<i>Salinispora tropica</i>	Unknown biological activity
Trioxacarcins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anticancer; antimalarial

4.3 ผลิตภัณฑ์เอนไซม์และวิตามิน

จุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซิสสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น เอนไซม์ transglutaminase ซึ่งผลิตโดย *Streptoverticillium* และ *Streptomyces* มีประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสิ่งทอ (Ando *et al.*, 1989; Cui *et al.*, 2008) เอนไซม์ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) หนร้อนซึ่งผลิตโดย *Streptosporangium* sp. ที่คัดแยกจากใบข้าวโพด ซึ่ง

อาจมีประโยชน์ต่อการนำมาประยุกต์เพื่อปรับปรุงอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง (Stamford *et al.*, 2002) เอนไซม์ไซลาเลส (xylanase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ ผลิตโดย *Thermomonosporafusca* BD25 และ *Streptomyces cyaneus* SN32 (Tuncer *et al.*, 1999; Ninawe *et al.*, 2008)

แอกติโนมัยสิทสามารถผลิตวิตามินได้หลายชนิด เช่น *Streptomyces olivaceus* ผลิตวิตามิน B12 (Maitra and Roy, 1960) Strzelczyk and Leniarska (1985) รายงานว่าแอกติโนมัยสิทที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบราก รากและดินอิสระสามารถผลิตกลุ่มของวิตามินบีได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตไทอะมีน (thiamine) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) วิตามินบี 12 และโคเอนไซม์ เอ (coenzyme A) (Santos *et al.*, 1976)

4.4 การประยุกต์ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol)

มีการศึกษาการใช้แอกติโนมัยสิทเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อควบคุมแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรคพืชหลายชนิด เช่นการคลุกดินด้วยสปอร์ของแอกติโนมัยสิทสกุล *Streptomyces* สามารถควบคุมโรครากเน่าและลดจำนวนพยาธิตัวกลม (nematode) ในถั่วอัลฟาลฟาได้ (Jones and Samac, 1996; Samac and Kinkel, 2001; Xiao *et al.*, 2002)

การเคลือบเมล็ดพันธุ์พืชด้วยสปอร์หรือน้ำเลี้ยงเซลล์แอกติโนมัยสิทสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ เช่น งานวิจัยของ Shih *et al.* (2003) เมื่อนำเมล็ดกะหล่ำมาเคลือบด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces padanus* พบว่าสามารถลดการเกิดโรค damping off ที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani* ได้ นอกจากนี้มีรายงานการใช้ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรค damping off และ root rot ที่เกิดจาก *R. solani* ในถั่วและมะเขือเทศด้วยเช่นกัน (Rothrock and Gottlieb, 1984; Sabaratnam and Traquair, 2002)

Singh and Mehrotra (1980) เคลือบเมล็ดถั่วเขียวด้วยสปอร์ของ *Streptomyces* sp. พบว่าสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของ *Rhizoctonia bataticola* และช่วยเพิ่มความยาวของราก นอกจากนี้ยังสามารถลดอาการใบร่วงที่เกิดจาก *Phomamedicaginis* ในถั่วอัลฟาลฟา (Samac *et al.*, 2003)

El-Abyad *et al.* (1993) เคลือบเมล็ดมะเขือด้วยสปอร์ของ *Streptomyces* sp. ก่อนนำไปปลูก พบว่าสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ดี นอกจากนี้ น้ำเลี้ยงเชื้อของ *S. pulcher* และ *Serratia canescens* เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์จาก *Fusarium oxysporum* sp. lycopersici, *Verticillium albo-atrum* และ *Alternaria solani* และยังมีการศึกษาการใช้สเตรปโตมัยสิทควบคุมเชื้อราที่รากและเชื้อราที่ใบในเมล็ด (Kortemaa *et al.*, 1994; Tahvonon *et al.*, 1995)

Mycostop เป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้ทางการค้าซึ่งมี *Streptomyces griseoviridis* เป็นองค์ประกอบ (ภาพ 5) นำมาประยุกต์ใช้กับระบบชลประทาน เพื่อควบคุมเชื้อจุลินทรีย์โรคพืชที่สำคัญหลายชนิด เช่น

Fusarium oxysporum, *Botrytis cinerea* และ *Alternaria brassicicola* (Tahvonen, 1982a, 1982b, 1993)



ภาพที่ 5 Mycostop

ที่มา <http://agrobio.hu/hu/termek/mycostop-biologiai-gombaolo-szer/>

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์เป็นหนึ่งในผืนป่าตะวันตกที่มีพื้นที่ป่าสมบูรณ์มากที่สุด มีพื้นที่ 894 ตร.กม. หรือ ประมาณ 558,750 ไร่ พื้นที่ครอบคลุม 2 จังหวัด คือ จังหวัดกำแพงเพชร และ จังหวัดนครสวรรค์ ครอบคลุมพื้นที่อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร และอำเภอแม่วงก์ และกิ่งอำเภอแม่เปิน จังหวัดนครสวรรค์ พื้นที่ทิศเหนือของอุทยานฯ ติดกับอุทยานแห่งชาติคลองลาน ทิศใต้ติดกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี และทิศตะวันตกติดกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าอุ้มผาง จังหวัดตาก ได้รับการประกาศเป็นอุทยานแห่งชาติ เมื่อวันที่ 14 กันยายน 2530 พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นแหล่งกำเนิดต้นน้ำลำธาร ประกอบไปด้วยป่าหลายชนิดเช่น ป่าดิบเขา ป่าดิบแล้ง ป่าดิบแล้งผสมป่าเบญจพรรณ ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง มีความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและสัตว์สูง สภาพภูมิประเทศเป็นเทือกเขาสูงสลับซับซ้อนเรียงรายกันอยู่ตามเทือกเขาถนนธงชัย ลดหลั่นลงมาจนถึงพื้นราบ ประมาณ 40 - 50 ลูก ยอดที่สูงที่สุดคือ “ยอดเขาโมโกจู” สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,964 เมตร เป็นแหล่งต้นน้ำลำธารต้นกำเนิดของลำน้ำแม่วงก์ส่วนพื้นที่ราบมีไม่มากส่วนใหญ่อยู่บริเวณริมแม่น้ำ และเป็นแหล่งแร่ธาตุสำคัญ เช่น แร่ไมก้า

สภาพภูมิอากาศของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในช่วงฤดูหนาวเริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน - เดือนกุมภาพันธ์ เป็นช่วงที่เหมาะสมแก่การไปท่องเที่ยวมากที่สุด เพราะอากาศค่อนข้างหนาวเย็น อันเนื่องมาจากลมความกดอากาศสูงมาจากประเทศจีนแผ่ลงมาทางตอนใต้เข้าสู่ประเทศไทยตอนบนและปกคลุมทั่วประเทศ ลมที่พัดสู่ประเทศไทยในฤดูนี้คือ ลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนช่วงฤดูร้อนเริ่มต้นจากเดือนมีนาคม - เดือนพฤษภาคม อากาศค่อนข้างร้อนจัดและมีฝนตกน้อย ทำให้สังคมพืชป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณผลัดใบ สำหรับฤดูฝนเริ่มตั้งแต่เดือนมิถุนายน - เดือนตุลาคม มีปริมาณน้ำฝนโดยเฉลี่ย 1,100 มิลลิเมตรต่อปี

ป่าส่วนใหญ่ของอุทยานฯ ประกอบด้วยป่าเบญจพรรณ ป่าดงดิบ และป่าเต็งรัง มีพันธุ์ไม้ที่สำคัญและมีความมากมาย เช่น สัก ประดู่ มะค่าโมง ยางแดง เต็ง รัง นอกจากนี้ ยังมีสัตว์ป่าที่หายาก เช่น ช้างป่า กระต๊อง กวางหมီး แมวลาย และนกมากกว่า 305 ชนิด จาก 53 วงศ์ซึ่งนกบางชนิดพบเพียงไม่กี่แห่งในประเทศไทยเช่น นกกระเต็นขาวดำใหญ่ นกเงือกคอแดง นกกางเขนดงนกอโพระดกหูเขียว นกพญาปากกว้างหางยาว เป็นต้น



ภาพที่ 6 อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ช่องเย็น กม.ที่ 93 อยู่ห่างจากที่ทำการอุทยานฯ 28 กิโลเมตร เป็นจุดสูงสุดของถนนคลองลาน-อุ้มผาง สูง 1,340 เมตรจากระดับน้ำทะเล มีสายลมพัดผ่านและหมอกปกคลุมอยู่เสมอ อากาศหนาวเย็นตลอดทั้งปี และเป็นที่ยูพระอาทิตย์ตกได้อย่างสวยงามอีกจุดหนึ่ง อุณหภูมิเฉลี่ยทั้งปีต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส เนื่องจากบริเวณนี้เป็นช่องเขาที่มีสายลมพัดผ่านตลอดเวลา จึงถูกขนานนามว่า “ช่องเย็น” ตามสภาพภูมิอากาศของพื้นที่แห่งนี้ เนื่องจากช่องเย็นมีสภาพอากาศที่เย็นและชื้น จึงพบพันธุ์ไม้ที่ชอบความชุ่มชื้นบริเวณนี้ ได้แก่ กัลวไม้เฟิร์น มหัสดำ (Treefern) นอกจากนี้ช่องเย็น ยังเป็นถิ่นอาศัยของนกหลากหลายชนิด



ภาพที่ 7 ช่องเย็น

บทที่ 3

วิธีการศึกษาโดยสังเขป

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยเริ่มเก็บตั้งแต่บริเวณทางเข้าอุทยานจนถึงบริเวณช่องเย็น รวมทั้งสิ้น 15 จุด ดังตารางที่ 7 การเก็บทำได้โดยขุดดินลึกลงไปจากผิวดินประมาณ 5-10 เซนติเมตร นำดินใส่ถุงพลาสติก จดบันทึกค่าความสูงจากระดับน้ำทะเล และพิกัดทางภูมิศาสตร์

ตารางที่ 7 จุดเก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์เพื่อแยกเชื้อแอคติโนมัยสิท

จุดเก็บตัวอย่างที่	บริเวณที่เก็บตัวอย่างดิน	จุดพิกัดภูมิศาสตร์
1	บริเวณที่ทำการอุทยาน	N16° 02' 23.4"
2	บริเวณที่ทำการอุทยาน	N16° 02' 20.5"
3	บริเวณที่ทำการอุทยาน	N16° 02' 21.1"
4	บริเวณที่ทำการอุทยาน	N16° 02' 19.5"
5	บริเวณที่ทำการอุทยาน	N16° 02' 24.1"
6	ทางเข้าอุทยานจนถึงที่ทำการอุทยาน	N16° 13' 43.9"
7	ทางเข้าอุทยานจนถึงที่ทำการอุทยาน	N16° 02' 26.8"
8	ทางเข้าอุทยานจนถึงที่ทำการอุทยาน	N16° 02' 16.7"
9	ทางเข้าอุทยานจนถึงที่ทำการอุทยาน	N16° 02' 41.3"
10	ทางเข้าอุทยานจนถึงที่ทำการอุทยาน	N16° 02' 54.1"
11	ช่วงระหว่างที่ทำการอุทยานไปช่องเย็น	N16° 03' 23.8"
12	ช่วงระหว่างที่ทำการอุทยานไปช่องเย็น	N16° 04' 25.1"
13	ช่วงระหว่างที่ทำการอุทยานไปช่องเย็น	N16° 04' 34.8"
14	บริเวณช่องเย็น	N16° 04' 41.8"
15	บริเวณช่องเย็น	N16° 04' 42"

2. การเตรียมตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินที่มาทำการเตรียมเพื่อทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสิท โดยนำตัวอย่างดินมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปลา์ เกลี่ยดินให้กระจายทั่วจานอาหาร ผึ่งให้แห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่ร่ม เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง แบ่งตัวอย่างดินที่แห้งแล้ว 1 กรัม ใส่ลงในสารละลาย phenol 1.5% ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลง เขย่าให้ดินกระจายตัว แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที (ทำใน Hood) เป็นระดับความเจือจางแรก (10^{-1}) เจือจางตัวอย่างดินในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เป็นระดับความเจือจาง 10^{-2} , 10^{-3} ตามลำดับ (ภาพที่ 8)

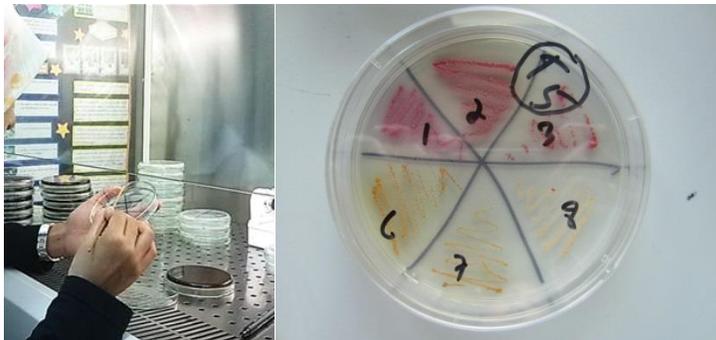


ภาพที่ 8 การเตรียมตัวอย่างดินเพื่อนำมาทำการแยกเชื้อแอสเพอริลลัส

3. การแยกเชื้อแอสเพอริลลัสที่หายากจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

3.1 นำสารละลายที่เตรียมในขั้นตอนมาปริมาณความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร มา spread plate เพื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร Starch casien agar ที่เติม Nalidixic acid ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มอื่นและเติม Cycloheximide ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งเชื้อราที่เจริญเร็วกว่าเชื้อแอสเพอริลลัส แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 15 วัน แล้วสังเกตโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เลือกเอาโคโลนีที่มีขนาดเล็ก และมีลักษณะยึดติดที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 ใช้ไม้เสียบลูกชิ้นปลายแหลมที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเปียโคโลนีที่มีลักษณะของแอสเพอริลลัสที่แยกได้จากข้อ 3.1 มาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร HT agar plate โดยใช้วิธี simple streak และเก็บรักษาในอาหาร HT agar slant เพื่อทำการทดสอบต่อไป (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 Restreak แอสเพอริลลัสที่แยกได้บนอาหาร HT agar plate และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร HT agar slant

4. การจัดกลุ่มและจัดจำแนกเชื้อแอสเพอริลลัสที่แยกได้

จัดกลุ่มเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดโดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HT agar plate โดยสังเกตจากลักษณะของ aerial mycelium, substrate mycelium และการสร้างสารสี จากนั้นนำตัวแทนของเชื้อในแต่ละกลุ่มมาทำการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางเคมีดังนี้

4.1 ศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทำได้โดยตรงจากโดยนำเชื้อที่เจริญในงานอาหารเลี้ยงเชื้อมาส่องดูสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และโดยอาศัยเทคนิคการปักสไลด์ โดยทำการปัก cover slip ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนอาหารที่มีการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยสิท (ภาพที่ 10) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อมีการสร้างสปอร์ จากนั้นนำ cover slip ไปทำการย้อมด้วยสี crystal violet แล้วทำการตรวจดูการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 10 เทคนิคการปักสไลด์เพื่อศึกษาสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.2 ศึกษาวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ (ชนิดของ DAP isomer และ น้ำตาลที่ผนังเซลล์) ตามวิธีของ Lechevalier และ Ruan (Lechevalier and Lechevalier, 1980; Ruan,1994) มีขั้นตอนดังนี้

การเตรียมเซลล์ของเชื้อแอสคิโนมัยสิทเพื่อนำไปวิเคราะห์

4.2.1 เพาะเลี้ยงปลูกเชื้อแอสคิโนมัยสิทในอาหาร HT agar จนเชื้อเจริญดี จากนั้นใช้ cock borer กดลงไปบริเวณที่มีเชื้อเจริญอยู่เพื่อตัดให้ได้ชิ้นวุ้น จากนั้นนำชิ้นอาหารวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ 5 ชิ้น มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Glucose Yeast Extract broth ปริมาณ 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเพื่อให้อากาศ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

4.2.2 เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาทีล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดิมอีกครั้ง นำเซลล์ที่ได้แช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้แห้งบนกระดาษกรอง (พยายามอย่าให้เซลล์แห้งติดกระดาษกรอง) จากนั้นนำเซลล์แห้งที่ได้ไปวิเคราะห์ไอโซเมอร์ ของ diaminopimelic acid (DAP) และน้ำตาลในเซลล์ทั้งหมดต่อไป

การวิเคราะห์ชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิก

4.2.3 นำเซลล์และเส้นใยที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 ปริมาณ 10 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) ใส่ในหลอดทดลอง มาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 6 N ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดฝาปิดสนิท นำมาอบที่อุณหภูมิ 100 °C 18 ชั่วโมง หรือนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที 2 ครั้ง แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองกากเซลล์ทิ้งไป

4.2.4 นำสารละลายที่กรองได้มาระเหยให้แห้ง ล้างตะกอนที่แห้งแล้วด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เพื่อล้างให้ความเป็นกรดหมดไป ครั้งละ 3-4 หยด โดยหลังจากหยดน้ำกลั่นทุกครั้งต้องระเหยให้แห้งบน แผ่นความร้อน (hot plate)

4.2.5 นำส่วนของตะกอนที่แห้งติดกันตลอด มาเติมด้วยน้ำกลั่น 0.3 มล. หรือประมาณ 3-4 หยด ขึ้นกับปริมาณสารที่ได้ ดูดสารประมาณ 20 ไมโครลิตรด้วย capillary tube (ถ้าสารเจือจางต้องใช้ปริมาณมากขึ้น) นำมาจุดลงบนกระดาษโครมาโทกราฟีหรือแผ่น silica gel โดยมีสาร meso- DAP (หรือ L-DAP) โกลซิน และไลซีน เป็นสารมาตรฐาน

4.2.6 เตรียมสารละลายชะ ซึ่งประกอบด้วย methanol: H₂O: 10N HCl: pyridine ในอัตราส่วน 80: 17.5: 2.5: 10 โดยปริมาตร โดยต้องทำการเตรียมในตู้ดูดควัน เทลงใน TLC tank ปิดฝา tank ให้สนิทโดยทาด้วยวาสลีน หรือ grease เพื่อไม่ให้สารละลายใน tank ระเหยไป ทิ้งไว้ให้สารละลายอิ่มตัวอย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำแผ่น TLC วางใน Tank ใช้เวลาชะประมาณ 2 ชั่วโมง

4.2.7 นำแผ่นโครมาโทแกรมออกมาผึ่งให้แห้งภายในตู้ดูดควัน ตรวจสอบตำแหน่งของสารโดย ฉีดพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน 0.2 % น้ำหนักต่อปริมาตรในสารละลายของบิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (water saturated n-butanol) ทิ้งให้แห้งสักครู่ จากนั้นจึงนำกระดาษไปอบที่ 100 °C 5 นาที หรือจนกว่าจะเห็น spot ของสาร ใช้ดินสอวงตำแหน่งของสารไว้ วิเคราะห์ว่าแบคทีเรียแต่ละตัวอย่างพบ meso- DAP หรือ L- DAP ถ้าเป็น meso- DAP ค่า R_f ของสารจะเท่ากับสารมาตรฐาน L- DAP จะถูกชะได้ไกลกว่าและให้ค่า R_f ที่มากกว่าเล็กน้อย

วิธีการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลในเซลล์ทั้งหมด

4.2.8 นำเซลล์และเส้นใยที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 ปริมาณ 50 มก. (น้ำหนักแห้ง) มาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N ปริมาตร 1 มล. ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที 2 ครั้ง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองกากเซลล์ทิ้งไป เก็บส่วนใส (filtrate) ไว้ทดสอบต่อไป

4.2.9 นำ filtrate ที่ได้จากข้อ 3.2.8 มาปรับ pH ด้วยสารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ ให้ได้เท่ากับ 5.0-5.5 ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนสีขาวของแบเรียมซัลเฟตตกตะกอน

4.2.10 นำส่วนใสที่ได้มาจุดลงบนแผ่น TLC (Silica gel 60) ในปริมาณ 20 ไมโครลิตร ใช้น้ำตาลกลาแลคโทส แมนโนส ซาโลส อะราบินอส มาดูโรส ฟิวโคส โรโบส และแรมโนส เป็นสารละลาย มาตรฐาน

4.2.11 เตรียมสารละลายชะ (ในตู้ดูดควัน) โดยประกอบด้วย n-butanol: pyridine: H₂O : toluene ในอัตราส่วน 5 : 3 : 3 : 4 โดยปริมาตร ใน TLC tank ปิดฝา tank ให้สนิทโดยทาด้วยวาสลีน หรือ grease เพื่อไม่ให้สารละลายใน tank ระเหยไป ทิ้งไว้ให้สารละลายอิ่มตัวอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

4.2.12 วางแผ่น silica gel 60 ที่มีสารแล้วลงไปยังอ่างระมัดระวัง โดยจับที่ขอบ ใช้เวลาในการชะประมาณ 2 ชั่วโมง นำแผ่นโครมาโทแกรมออกมาผึ่งให้แห้งภายในตู้ดูดควัน เมื่อแผ่นโครมาโทแกรมแห้งแล้วฉีดพ่นด้วยสารละลายกรดของ aniline phthalate (กรด phthalic 3.25 กรัม ในบิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ 100 มล. และเติม aniline 2 มล.) ทิ้งให้แห้งสักครู่ แล้วนำแผ่นโครมาโทแกรมไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารที่เกิดขึ้น ใช้ดินสอวงตำแหน่งของสารไว้ นำมาวิเคราะห์ว่าแอกติโนมัยสิท ชนิดนั้น ๆ พบน้ำตาลชนิดใดบ้าง

4.3 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณของแอกติโนมัยสิทครั้งนี้ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Phire Plant Direct PCR Kit โดยเริ่มจากคัดเลือกโคลนเดี่ยวของเชื้อแอกติโนมัยสิทไปเพาะเลี้ยงใน ISP2 broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บเซลล์ของแอกติโนมัยสิทโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบน (supernatant) ทิ้งไป เติม Dilution buffer ปริมาตรประมาณ 2 เท่าของเซลล์

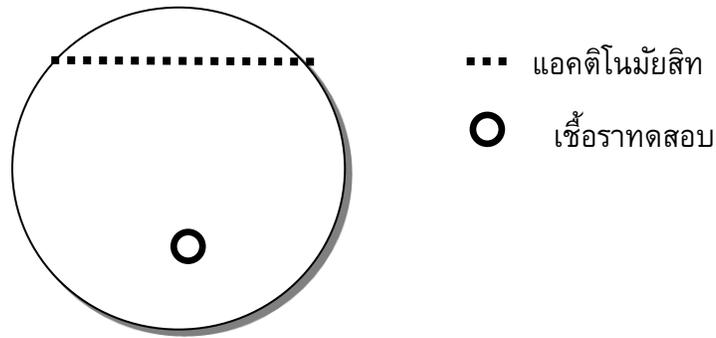
บดเซลล์ด้วยปลายปิเปตทิป ขนาด 100 ไมโครลิตร กับข้างหลอดเพื่อให้เซลล์แตก สังเกตจากสารละลายมีลักษณะขุ่นและข้นขึ้น นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใส ด้านบนไปเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณ 16S rRNA ยีน ด้วยเทคนิค PCR

4.3.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณ 16S rRNA ยีน ด้วยเทคนิค PCR ทำด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine) ใช้ส่วนใสจากข้อ 3.3.1 จะใช้ปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร องค์ประกอบของ PCR reagent จะประกอบด้วย 2x Phire[®] Plant PCR Buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร Phire[®] Hot Start II DNA Polymerase ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.3.1 ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร primer: ACT283F (5'-GGG TAG CCG GCC UGA GAG GG-3') และ 1360R (5'-CTG ATC TGC GAT TAC TAG CGA CTC C-3') (McVeigh et al., 1996) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 5.5 ไมโครลิตร การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแอกติโนมัยสิท มี Thermal Cycling ในช่วง Pre-denature ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีจำนวน 1 รอบ ในช่วง Denature จะใช้อุณหภูมิที่ 98 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วินาที , Annealing จะใช้อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาทีและช่วง Extension จะใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 40 รอบ และ Final extension อีก 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแอกติโนมัยสิทโดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่คือ ACT283F และ 1360R ให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1100 คู่เบส หลังจากที่ได้ผลผลิต PCR แล้วจะทำการตรวจสอบความยาวของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product โดยการใช้เทคนิค agarose gelelectrophoresis โดยเทียบกับเอ็นเอ ขนาดมาตรฐาน (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) โดยใช้ agarose gel 1.2 % จากนั้นย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ดูภายใต้ UV

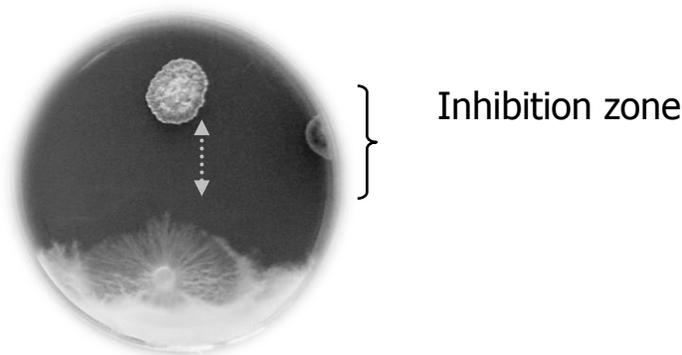
4.3.3 ส่วนการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ในแอกติโนมัยสิท จะดำเนินการส่งไปวิเคราะห์ยังบริษัท Macrogen Inc. Service ที่ประเทศเกาหลีใต้ ตรวจสอบความถูกต้องของ Chrommatograms ด้วยโปรแกรม Bioedit โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอกติโนมัยสิทในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ด้วยวิธี BLASTN search เพื่อตรวจสอบความเหมือนกัน (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของแอกติโนมัยสิทโดยการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.2 (Tamura et al., 2011) ดาวโหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ เพื่อนำมาเทียบเคียงกัน ด้วยวิธี multiple sequences alignment ด้วยการ ใช้โปรแกรม Clustal W version 5.2 (Higgins et al., 1994) แกะลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการตัดบางส่วนออก (Trim) จากนั้นใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนประมาณ 1000 เบส ของยีน 16S rRNA ในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วย Neighbor-Joining tree (Bootstrap 1,000 ครั้ง)

5. ทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.1 ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ ด้วยวิธี Dual culture bioassay (Bennett et al., 1996) ทำได้โดยเพาะเชื้อแอกติโนมัยสิท ลงบนด้านใดด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเพาะเชื้อราทดสอบลงไปในด้านตรงข้ามกับเชื้อแอกติโนมัยสิท ดังภาพที่ 11 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อราเจริญเต็มเพลท เทียบกับชุดควบคุมที่เป็นจานอาหารที่เลี้ยงแต่เชื้อราอย่างเดียว วัดขนาดของโซนการยับยั้ง (Inhibition zone) ดังภาพที่ 12 บันทึกในตารางบันทึกผล



ภาพที่ 11 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay



ภาพที่ 12 การวัดขนาดของโซนยับยั้ง (Inhibition Zone)

5.2 ทดสอบการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus*, *Staphylococcus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) ในชั้นปฐมภูมิ ด้วยวิธี Dual culture bioassay (Bennett *et al.*, 1996) ทำได้โดยการเพาะเชื้อแอคติโนมัยสิทไว้ด้านใดด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเพาะแบคทีเรียโดยใช้หว่งถ่ายเชื้อขีดเป็นแนวตั้งฉากกับเชื้อแอคติโนมัยสิท จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สังเกตดูโซนการยับยั้ง (Inhibition Zone) ที่เกิดขึ้น

5.3 ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์อะมัยเลส แมนนาเนส โปรตีเอส และเซลลูเลส โดย ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหารเหลว basal medium ที่เติมสับสเตรทของเอนไซม์แต่ละชนิด คือ Starch, (Locust bean gum) LBG, skim milk และ carboxymethylcellulose (CMC) ชนิดละ 1% ตามลำดับ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเพื่อให้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้นำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี gel diffusion assay (Downie *et al.*, 1994) ดังนี้

เอนไซม์เซลลูเลส

โดยเตรียม CMC ผสมกับ agar 1% เเทลงในจานอาหารในปริมาณที่เท่าๆ กัน เเจาะหลุมแล้วนำน้ำเลี้ยงมาหยอดลงในหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นเท



congo-red (1 % W/V) ลงบนจานทดสอบทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วย 1 M NaCl เป็นเวลา 15 okmu (Teather and Wood, 1982). ถ้ามีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จะให้สีเหลือง = + แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลาย cellulase จะให้สีแดง = -

เอนไซม์แมนนาเนส

โดยเตรียม LBG ผสมกับ agar 1% เทลงในจานอาหารในปริมาณที่เท่าๆ กัน เจาะหลุมแล้วนำน้ำเลี้ยงมาหยอดลงในหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นเท congo-red (1 % W/V) ลงบนจานทดสอบทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วย 1 M NaCl เป็นเวลา 15 okmu (Teather and Wood, 1982). ถ้ามีการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส จะให้สีเหลือง = + แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลาย cellulase จะให้สีแดง = -

เอนไซม์อะมัยเลส

โดยเตรียม soluble starch ผสมกับ agar 1% เทลงในจานอาหารในปริมาณที่เท่าๆ กัน เจาะหลุมแล้วนำน้ำเลี้ยงมาหยอดลงในหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลายไอโอดีนลงไปบนจานทดสอบ ถ้ามีการผลิตเอนไซม์อะมัยเลสจะเกิดโซนใส= + แต่ถ้าไม่มีการผลิตเอนไซม์อะมัยเลสจะไม่เกิดโซนใส= -

เอนไซม์โปรตีเอส

โดยเตรียม Skimmilk ผสมกับ agar 1% เทลงในจานอาหารในปริมาณที่เท่าๆ กัน เจาะหลุมแล้วนำน้ำเลี้ยงมาหยอดลงในหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตโซนใสรอบๆหลุม บนจานทดสอบ ถ้ามีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจะเกิดโซนใส= + แต่ถ้าไม่มีการผลิตเอนไซม์อะมัยเลสจะไม่เกิดโซนใส= -

5.4 ทดสอบความสามารถในการสร้างสาร anticancer และ ทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์คน และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยส่งไปวิเคราะห์ที่หน่วยปฏิบัติการกลางไปโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งตั้งอยู่ที่ตำแหน่งละติจูด $16^{\circ}33'29''$ เหนือ และลองจิจูด $99^{\circ}30'40''$ ตะวันออก โดยประมาณ โดยเริ่มเก็บตั้งแต่บริเวณทางเข้าอุทยานจนถึงบริเวณช่องเย็น ซึ่งมีความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1340 เมตร รวมทั้งสิ้น 15 จุด ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 จุดเก็บตัวอย่างดินบางบริเวณ

- | | | |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| A: จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 | B: จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 | C: จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 |
| D: จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 | E: จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 | F: จุดเก็บตัวอย่างที่ 6 |
| G: จุดเก็บตัวอย่างที่ 8 | H: จุดเก็บตัวอย่างที่ 10 | I: จุดเก็บตัวอย่างที่ 11 |



2. การแยกเชื้อแอสคิตินัมยีสที่หายากจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ผลการแยกเชื้อจากดินที่เก็บมาจากเขตอุทยานแม่วงก์ ทั้งหมด 15 จุด พบว่าได้เชื้อแอสคิตินัมยีสทั้งหมด 166 ไอโซเลท ดังตาราง 8

ตารางที่ 8 ผลการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

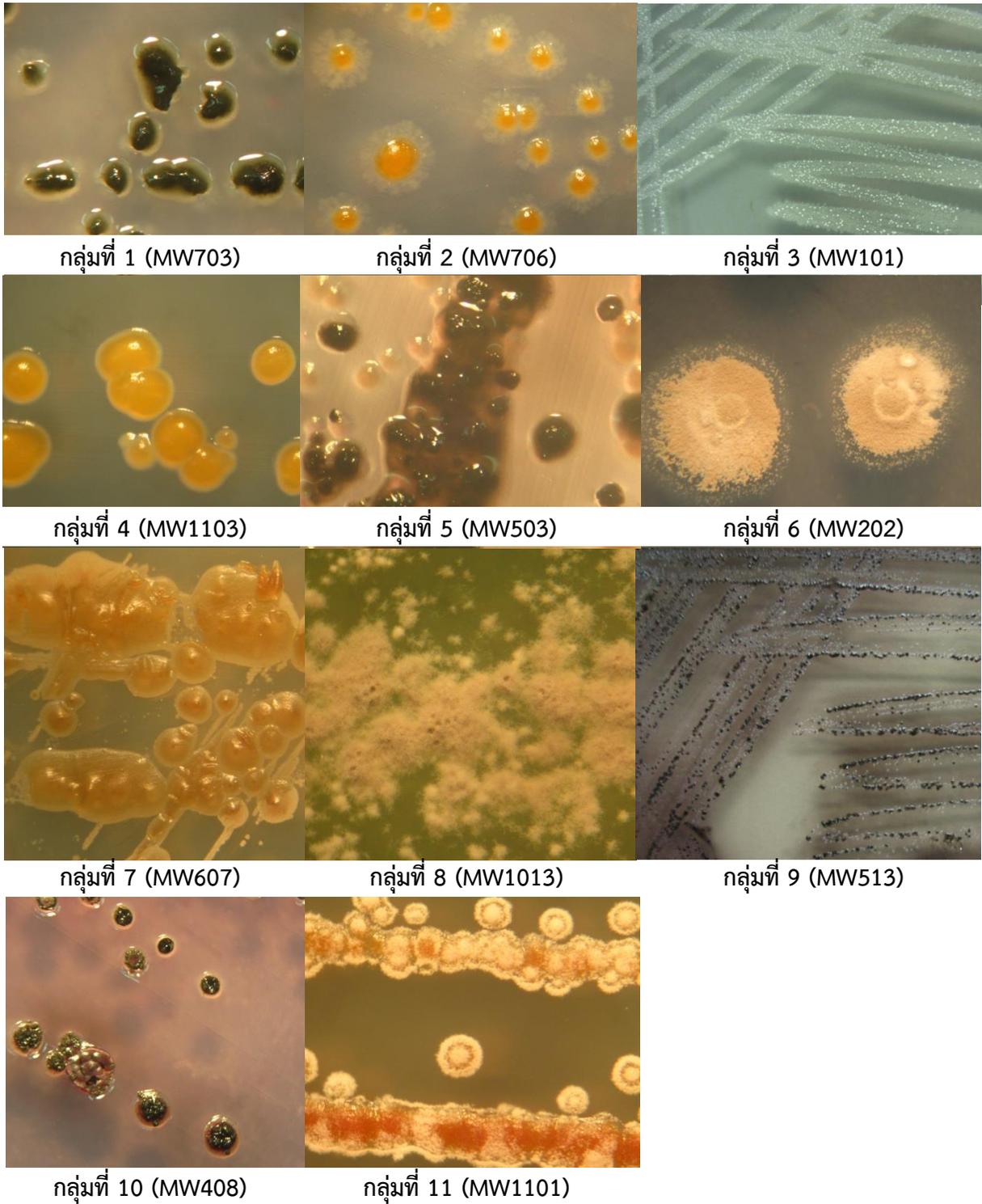
จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลท	จำนวน ไอโซเลท
1	MW101-110	10
2	MW201 - 225	25
3	MW301, MW302	2
4	MW401 -411	11
5	MW501 -515	15
6	MW601- 609	9
7	MW701,-720	20
8	MW801-827	27
9	MW901-904	4
10	MW1001 -1014	14
11	MW1101-1104	4
12	MW1201-1218	18
13	MW1301-1303	3
14	MW1401, MW1402	2
15	MW1501, MW1502	2
ทั้งหมด		166

3. การจัดกลุ่มและจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้

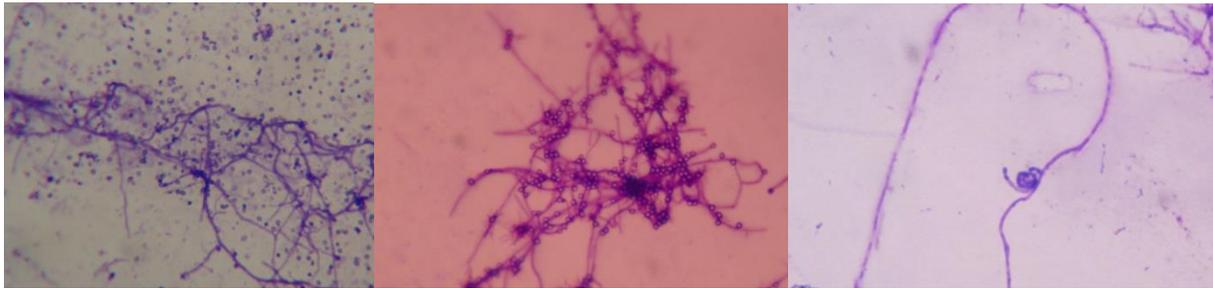
จัดกลุ่มเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดโดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HT agar plate โดยสังเกตจากลักษณะของ aerial mycelium, substrate mycelium และการสร้างสารสี พบว่าได้จำนวนทั้งหมด 11 กลุ่ม (ตารางที่ 9) และเมื่อนำตัวแทนของเชื้อในแต่ละกลุ่มมาทำการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยแต่ละกลุ่มมีลักษณะการเจริญบนอาหาร HT agar plate ดังภาพ 14 และมีการสร้างสปอร์ดังภาพ 15 และมีลักษณะทางเคมีได้ผลดังตาราง 10

ตารางที่ 9 การจัดกลุ่มแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ตามลักษณะการเจริญบนอาหาร HT agar plate

กลุ่ม ที่	ลักษณะเชื้อบนอาหาร HT			ไอโซเลท	จำนวน
	สีตัวเซลล์	สีสปอร์	สี pigment		
1	ส้ม	ดำ	-	MW110, MW410 - 411 , MW506 - 515 MW702 - 705, MW707 , MW1001 -1010	27
2	ส้ม	-	-	MW104 -108, MW701 MW706, MW806 - 819 MW901 - W904, MW1201 - 1218 MW1401 - 1402 , MW1501 - 1502	47
3	ขาวครีม	ขาว	-	MW101 - 103, MW217 - 220, MW401 - 407 MW603 - 606 , MW827	19
4	เหลืองสด	-	-	MW302, MW820 - 823 , MW1011 MW1103	7
5	แดงเข้ม	-	-	MW301 , MW501- 503, MW1301 - 1303	7
6	ครีม	น้ำตาลเทา	-	MW201 - 216, MW224 - 225, MW714 -720 MW824 - 826, MW1014	30
7	ครีม	น้ำตาล	-	MW607, MW221 - 223	4
8	ครีม	เทาขอบขาว	เหลือง	MW109, MW507, MW608 - 609, MW1013	5
9	ดำ	ดำ	น้ำตาลเข้ม	MW513	1
10	ม่วงแดง	ดำ	น้ำตาลดำ	MW408 - 409, MW504 - 505, MW601 - 602 MW801 - 805	11
11	ส้มอมชมพู	ขาวอมส้ม	ส้มอ่อน	MW708 - 713 MW1101 - 102	8
					166



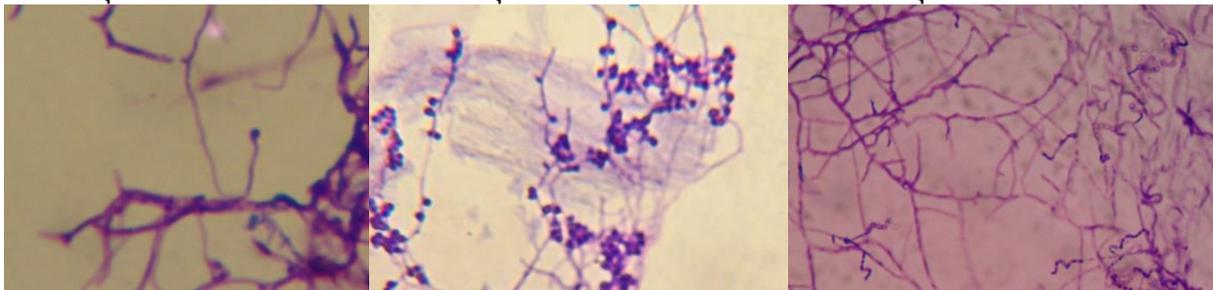
ภาพที่ 14 ลักษณะการเจริญบนอาหาร HT agar plate ของแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ในแต่ละกลุ่ม



กลุ่มที่ 1 (MW703)

กลุ่มที่ 2 (MW706)

กลุ่มที่ 3 (MW101)



กลุ่มที่ 4 (MW1103)

กลุ่มที่ 5 (MW503)

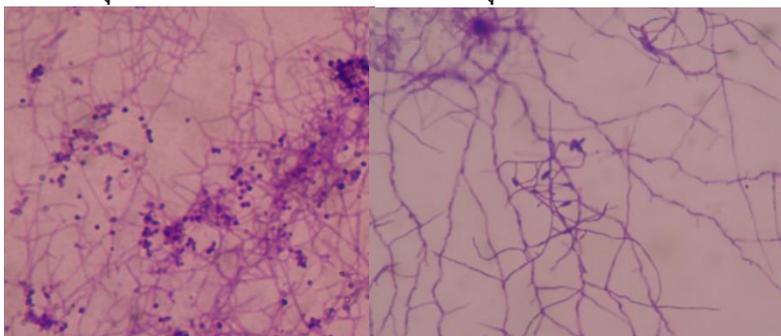
กลุ่มที่ 6 (MW202)



กลุ่มที่ 7 (MW607)

กลุ่มที่ 8 (MW1013)

กลุ่มที่ 9 (MW513)



กลุ่มที่ 10 (MW408)

กลุ่มที่ 11 (MW1102)

ภาพที่ 15 ลักษณะการสร้างสปอร์เมื่อมีการเจริญบนอาหาร HT agar plate เป็นเวลา 15 วัน ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในแต่ละกลุ่ม

ตาราง 10 ชนิดของ DAP isomer และ น้ำตาลที่ผนังเซลล์ ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มที่	ไอโซเลท	ชนิดของDAP isomer	ชนิดของน้ำตาลที่ผนังเซลล์
1	MW703	meso-DAP	xylose, Glucose and arabinose
2	MW706	meso-DAP	Xylose and glucose
3	MW101	LL-DAP	Glucose, galactose and xylose
4	MW1103	meso-DAP	Xylose and glucose
5	MW503	meso-DAP	madurose and glucose.
6	MW202	LL-DAP	Glucose, galactose and xylose
7	MW607	meso-DAP	Glucose and galactose
8	MW1013	LL-DAP	Glucose and galactose
9	MW513	meso-DAP	glucose, xylose, arabinose, mannose and ribose
10	MW408	meso-DAP	xylose, arabinose and glucose
11	MW1102	meso-DAP	mudrose and glucose

4. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีนของเชื้อที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มโดยการสกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณ 16S rRNA ยีน ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นส่งไปวิเคราะห์ยังบริษัท Macrogen Inc. Service ที่ประเทศเกาหลีใต้ พบว่าเชื้อที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มมีความยาวของลำดับในบริเวณ 16S rRNA ยีน ประมาณ 800- 1000 bp ดังตาราง 11 เมื่อนำลำดับเบสที่ได้มาเทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอกติโนมัยสิทในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ด้วยวิธี BLASTN search เพื่อตรวจสอบความเหมือนกัน (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเชื้อที่แยกได้มีความใกล้เคียงกับเชื้อแอกติโนมัยสิท 3 จินัส คือ *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora* และ ยังไม่ทราบชนิด อีก 1 กลุ่ม โดยมีเปอร์เซ็นต์ identity 99% ดังตาราง 12

ตารางที่ 11 ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ของแอกติโนมัยสิทที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	ไอโซเลท	ลำดับเบส
1	MW703	CCCATATCGGGCTCATATCGATCCTGACTGCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGG AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTCAGCAGGGACGA AGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGG GCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTCGACTGTGAAAAC CCGCAGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGACAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCT GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATACAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACT GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCTGTAACGGTTG GGCGCTAGGTGTGGGGGCGCTCTCCGGTTCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGA GTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTA TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGAAAACCTGTGAGAGATGGCAGGTCCTT CGGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA



ตารางที่ 11 ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ของแอกติโนมัยสิทที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	ไอโซเลท	ลำดับเบส
		CGAGCGCAACCCTCGTTTCGATGTTGCCAGCGCTTATGGCGGGACTCATCGAAGACTGCCGGGTCAAC TCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATG GCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCCGGTCTCAGTTCGGATCGG GGGTCTGCCAGCTCCCACCCCTGAAGTCCGAG
2	MW706	CTGGGACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGC CTGATGACGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCG AGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAAGACGTAGGGTGC GAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGGGGGCGGCTTGTGCGCTCGACCGTGAAAATTGG GGCTCAACCCCAAGCCTGCGGTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTG TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGGCG CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCG CTAGGTGTGGGGACCTCTCCGGTTTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTAC GGCCGAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGCGGGCATGCGGATTAATTTCG ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGGCCGAAAACCTCGCAGAGATGTGAGGTCTTCGGG GGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG CGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGCTTATGGCGGGGACTCGTGAAGACTGCCGGGTCAACTCGG AGGAAGGTGGGGATAACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGTACAATGGCCG GTACAATGGGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGTCT GCAACTCGACCCCGTGAAGTGGAGTCTGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCC GGCCTTGTACACCCG
3	MW101	ACCACTTCGGTGGGATTAGTGCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC CTGATGACGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCG CAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAACGTAGGGCGC AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGGATGTGAAAGCCCG GGCTTAACCCCGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTG TAGCGGTGAAATGCGCAGCTATCAGGAGGAACCCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACG CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGTTGGGCA CTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCTGGGGAGTAC GGCCGAAGGCTAAAACGGAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCG ACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCGGAAACGCTGAGAGACAGCCCGCCCTTGTG GTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA GCGCAACCCCTTGTCCGTGAGGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCCTGGGGTGC AACTCGGAGGAAGGTGGGGACCACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGTACA ATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATT GGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCCGAGTCTGCTAGTAATCGCAGATCAGCAGTGTGCAAGCCGGT GGCCCAACC
4	MW1103	TGATCCTGGCTCAGGACGCGGCCAGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGAT GCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGT GACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAAGACGTAGGGTGCAGCG TTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGCTTGTGCGCTCGACTGTGAAAACCCGAGCTC AACTCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCG GTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAG GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTNGTCAACGCTGTAACGTTGGGCGTAGG TGTGGGGGGCTCTCCGGTCCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAACCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCG CAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCA

ตารางที่ 11 ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ของแอกติโนมัยสิทที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	ไอโซเลท	ลำดับเบส
		ACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGCAAAACCTGCAGAGAAGTGGGGTCCTTCGGGGGCGG TCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGACCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAA CCCTCGTTTCGATGTTGCCAGCGGGTTATGGCGGGGACTCATCGAAGACGGCCGGGTCAACTCGGAGGAA GGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTATGTCAGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACA ATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAAC TCGACCCCGTAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTCGGGTGAATACAACAAGGTAGC CG
5	MW503	AGGCGGACGTCTGGCTGGGTGCGGCACAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG CGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAGGGA CGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGT AGGGCGCGAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCCGCTGACTGTGAA AACCCGCAGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATT CCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGAT ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAACG TTGGGCGCTAGGTGTGGGGGCTCTCCGGTTCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGG GGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGAT TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGCAAACTCGCAGAGATGTGAGGTC CTTCGGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGACCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCTCGTTTCGATGTTGCCAGCGCTTATGGCGGGGACTCATCGAAGACTGCCGGGGTC AACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTATGTCAGGGGCTTACGCATGCTACA ATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGTTTCTAGTTCGGAT
6	MW202	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGCGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAACAGTGGGGAATATTGCACAAT GGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAG GGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGACCCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTAGGGTGCAAGCGTTGTCGGAAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGATGT GAAAGCCCGGGCTTAACCCGGGTCTGCATTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGAAGATCGGA ATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCCCGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCC GATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAA ACGTTGGGAAGTAGGTGTGGGCGACATCCACGTCGTCGTCGCGCAGCTAACGCATTAAGTCCCGGCC TGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTG GCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCACCGCTTGACATACCCGAAACGCTCTGGAGACAGGCG CCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTAAGATGTTGGGTTAAGT CCCGAACGAGCGCAACCTTTATTTCTGTGTTGCCAGCACGCCCTTCGGGGTGGTGGGACTCACAGGAG ACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTATGCTTGGGCTGC ACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTC TCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTG CTGCGGTGAATACAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT
7	MW607	ไม่สามารถสกัด DNA และ เพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA
8	MW1013	CAGGACGCGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGC AGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGA CGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTT GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGATTGTGAAAGCCCGAGGCTTAA CCTCGGGTCTGCAGTCGATACCCGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGT GAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGA

ตารางที่ 11 ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ของแอกติโนมัยสิทธิ์ที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	ไอโซเลท	ลำดับเบส
		GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGAACTAGGTG TTGGCGACATTCCACGTCGTCGAAACGCAGCTAACGCATTAAGTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA AGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAAC GCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGAAACGTCTGGAGACAGGGCCCCCTTGTGGTGGTG TACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGGGCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC CCTTGTC-CCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCGGGGTCAACTCG- GAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGTGCACACGTGCTACAATGGCC GGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTC TGCAACTCGACCCCATG-AAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATAC
9	MW513	CACACTGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGG AAGCCTGATGCACGACGCAAGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGA AGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGG GTGCGAGCGTTGTCGGATTTATTGGCGTAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTGACCGTGAAAAC TTGGGGCTCAACTCAAAGCCTGCGGTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCT GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGGTCTCTGGCCGATACT GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTG AAGCGCTAGGTGTGGGGGCTCTCCGGTTCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGG AGTACGGCCGAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGCGGAGCATGCGGATTA ATTGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGCAAAACCTCCAGAGATGGGGGGTCT TCGGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTGAGCTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGGTTATGGCGGGGACTCATCGAAGACTGCCGGGGCAA CTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAAT GGCCGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCAATGCCAAATTAGCCGGTCTCAGTTCGGATCG GGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTACTAATCCCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATAC GTTCCCGGCCTTG
10	MW408	CGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGAGACGACCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG GGGAATATTGCACAATGGGCGGACCCCTGATGCACGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT AAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCAACTACGTGCC AGCAGCCGCGTAAGACGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGCGTAAGAGCTCGTAGGCGGC TTGTGCGCTGACTGTGAAAACCCGCGCTCAACTGCGGGCTGCACTGCATGACGGGCAGGCTAGAGTTC GGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTATTGGTGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAA GGCGGGTCTCTGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTG GTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGTGGCCTCTCCGGTCTCTGTGCCGAGCTAACG CATTAAAGCGCCCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAA GCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCACCTGGGTTTGACATGGCCGAAAAC CTGCAGAGATGTAGGGTCTTCGGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTGAGCTGTCTGTGAG ATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGGTTATGGCGGAACTCA TCGAAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAG GGCTTACGCATGCTACAATGGCCGTACAATGGGCTGCGATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAG CCGGTCTCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCA GCAACGCTGCGG
11	MW1102	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGCGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAAT GGGCGGAAGCCTGACGACGCGACCGCGTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAG GGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTA GGGCGGAGCGTTGTCCGAATTATTGGCGTAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCTGCTGCCGTGAAA

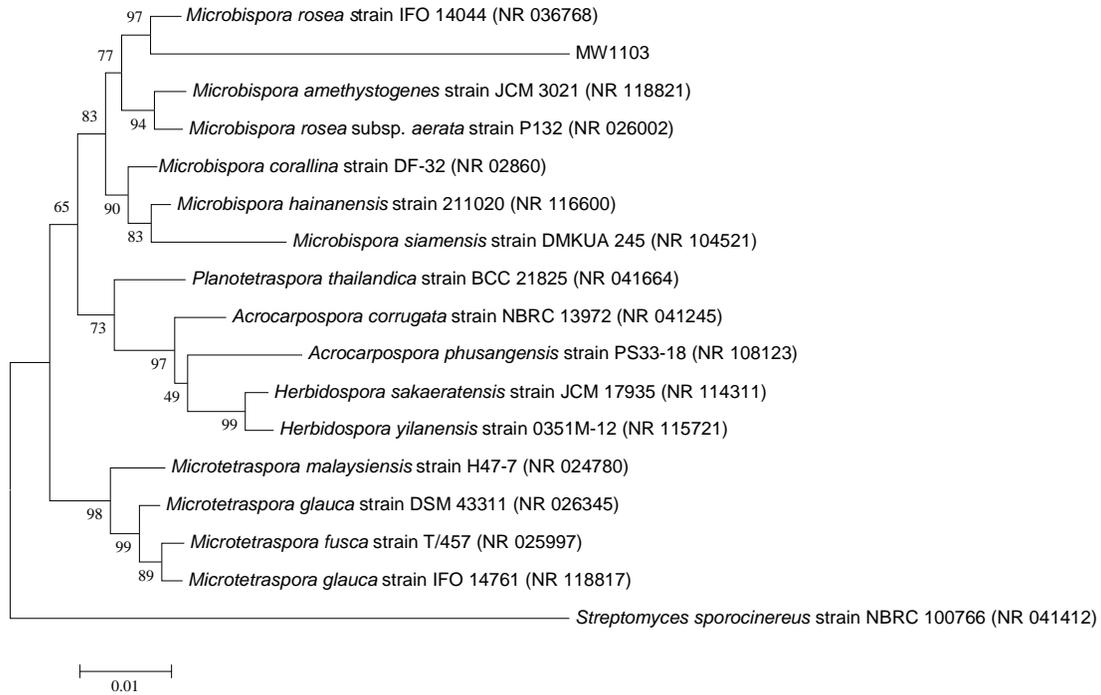
ตารางที่ 11 ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ของแอกติโนมัยสิทที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	ไอโซเลท	ลำดับเบส
		GCCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGGCAAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTC CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCCAGTT CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGCGGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACCGT TGGGGCGCTAGGTGTGGGGGTCTTCCACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGG AGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGGGAGCATGTTGCTTA ATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACCCGGAACACTCAGAGATGGGTGCCTCC TTTGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATAACTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCA ACGAGCGCAACCCTTGTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCG GGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAACATG CTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGACGCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTC GGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAATTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGT GAATACAACAAGGTAGCCGTACCGGAGGGTGGGCTGGATCACCTCT

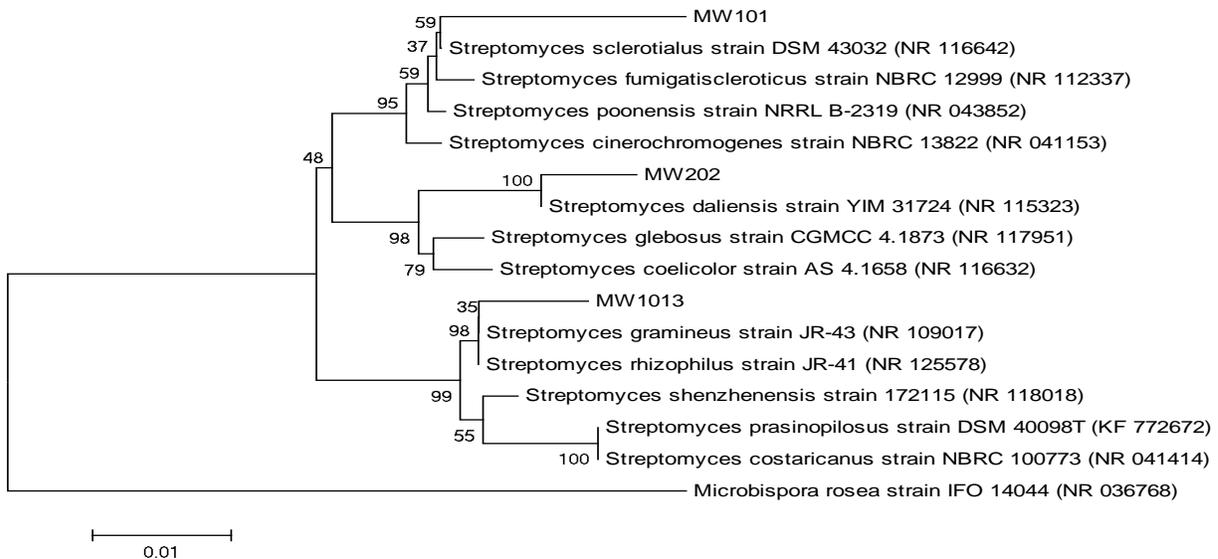
ตารางที่ 12 เปอร์เซนต์ identity ของ ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีนของเชื้อที่แยกได้เมื่อเทียบเคียงกันกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอกติโนมัยสิทในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI

กลุ่มที่	ไอโซเลท	สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด	Identities
1	MW703	<i>Micromonospora tulbaghia</i> strain TVU1 (NR 116241)	979/989 (99%)
2	MW706	<i>Micromonospora jinlongensis</i> strain NEAU-GRX11 (NR125650)	1063/1067(99%)
3	MW101	<i>Streptomyces sclerotialis</i> strain DSM 43032 (NR116642)	1013/1019(99%)
4	MW1103	<i>Micromonospora echinofusca</i> strain DSM 43913 ^T (X92625)	1010/1014(99%)
5	MW503	<i>Micromonospora chayaphumensis</i> strain MC5-1(NR 041265)	956/959 (99%)
6	MW202	<i>Streptomyces daliensis</i> strain YIM 31724 (NR115323)	1036/1043(99%)
8	MW1013	<i>Streptomyces rhizophilus</i> strain JR-41 (NR125578)	1033/1041(99%)
9	MW513	<i>Micromonospora tulbaghia</i> strain TVU1 (NR116241)	944/950 (99%)
10	MW408	<i>Micromonospora haikouensis</i> strain 232617 ^T (GU130129)	1024/1034(99%)
11	MW1102	<i>Microbispora rosea</i> IFO 14044 (NR 036768)	1022/1037(99%)

ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของแอกติโนมัยสิทโดยการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) ดาา โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ เพื่อนำมาเทียบเคียงกัน ด้วยวิธี multiple sequences alignment ด้วยการ ใช้โปรแกรม Clustal W version 5.2 (Higgins *et al.*, 1994) แก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการตัดบางส่วนออก (Trim) จากนั้นใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนประมาณ 1000 เบส ของยีน 16S rRNA ในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วย Neighbor-Joining tree (Bootstrap 1,000 ครั้ง) พบว่าเชื้อที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มมีความสัมพันธ์กับเชื้อที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI ในแต่ละจีนัสดังภาพที่ 16-18

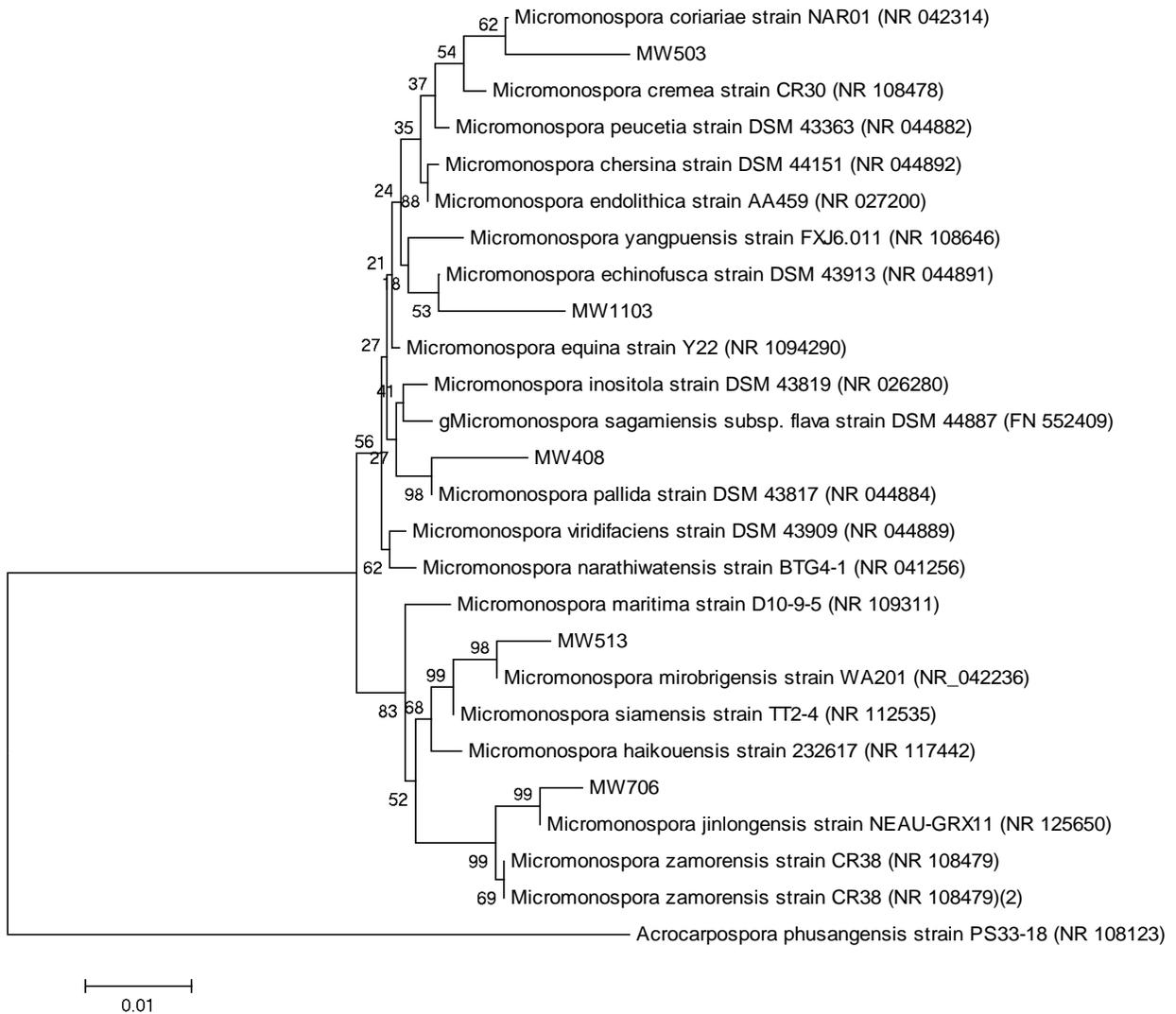


ภาพที่ 16 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในกลุ่มจิ้งนัส *Microbispora* เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ใช้ลำดับเบสของ *Streptomyces sporocinereus* เป็นกลุ่ม Outgroup สำหรับ rooting tree และจำนวนแสดงบนกิ่ง (%) มาจาก 1000 bootstrap tree Bar, 0.01 K_{nuc} .



ภาพที่ 17 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในกลุ่มจิ้งนัส *Streptomyces* เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ใช้ลำดับเบสของ *Microbispora rosea* เป็น

กลุ่ม Outgroup สำหรับ rooting tree และจำนวนแสดงบนกิ่ง (%) มาจาก 1000 bootstrap tree Bar, 0.01 K_{nuc} .



ภาพที่ 18 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในกลุ่มจีนัส *Micromonospora* เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ใช้ลำดับเบสของ *Acrocarpospora phusangensis* เป็นกลุ่ม Outgroup สำหรับ rooting tree และจำนวนแสดงบนกิ่ง (%) มาจาก 1000 bootstrap tree Bar, 0.01 K_{nuc} .

1. ทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

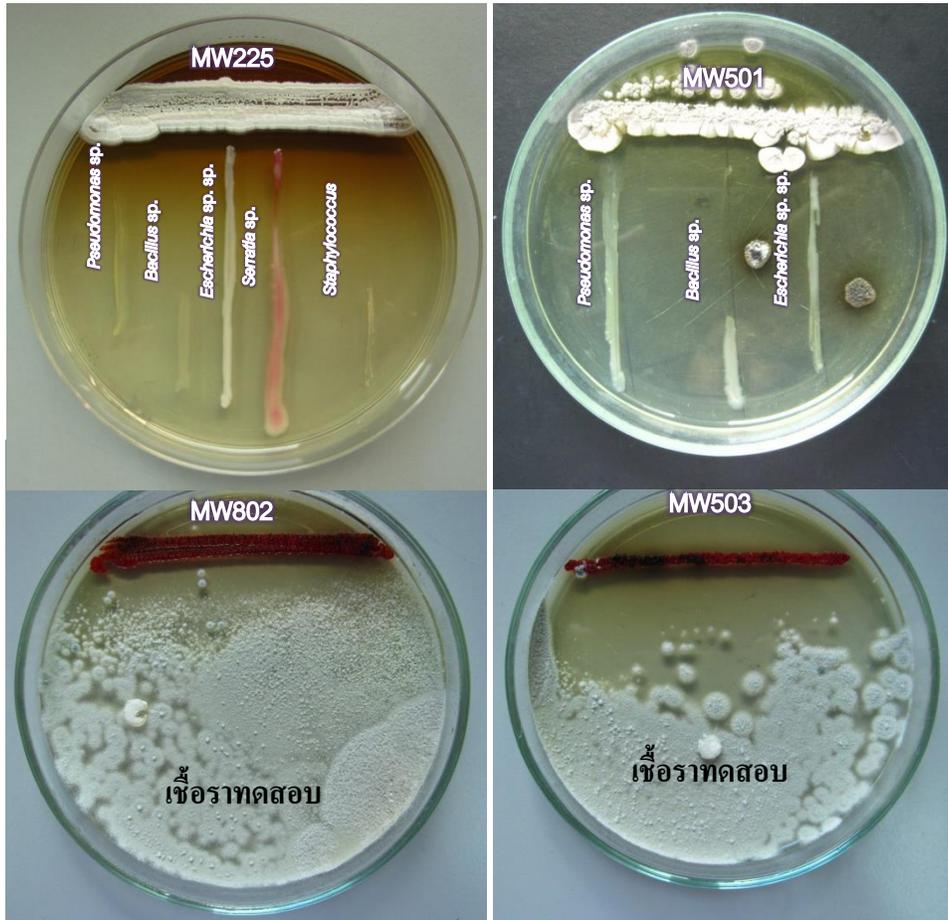
จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antifungal, anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial) เอนไซม์ anticancer โดยการทดสอบกับเชื้อจำนวน 38 ไอโซเลท จาก 166 ไอโซเลท พบว่ามีความสามารถในการสร้างสารได้ 4 ชนิด คือ anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial, เอนไซม์โปรตีเอส และ เอนไซม์เซลลูเลส มี จำนวน 1 ไอโซเลท คือ MW1103 ความสามารถในการสร้างสารได้ 3 ชนิด มี 4 ไอโซเลท คือ MW203 MW206 MW225 และ MW1102 ดังตาราง 13 และ ภาพที่ 19-20

ตารางที่ 13 ความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

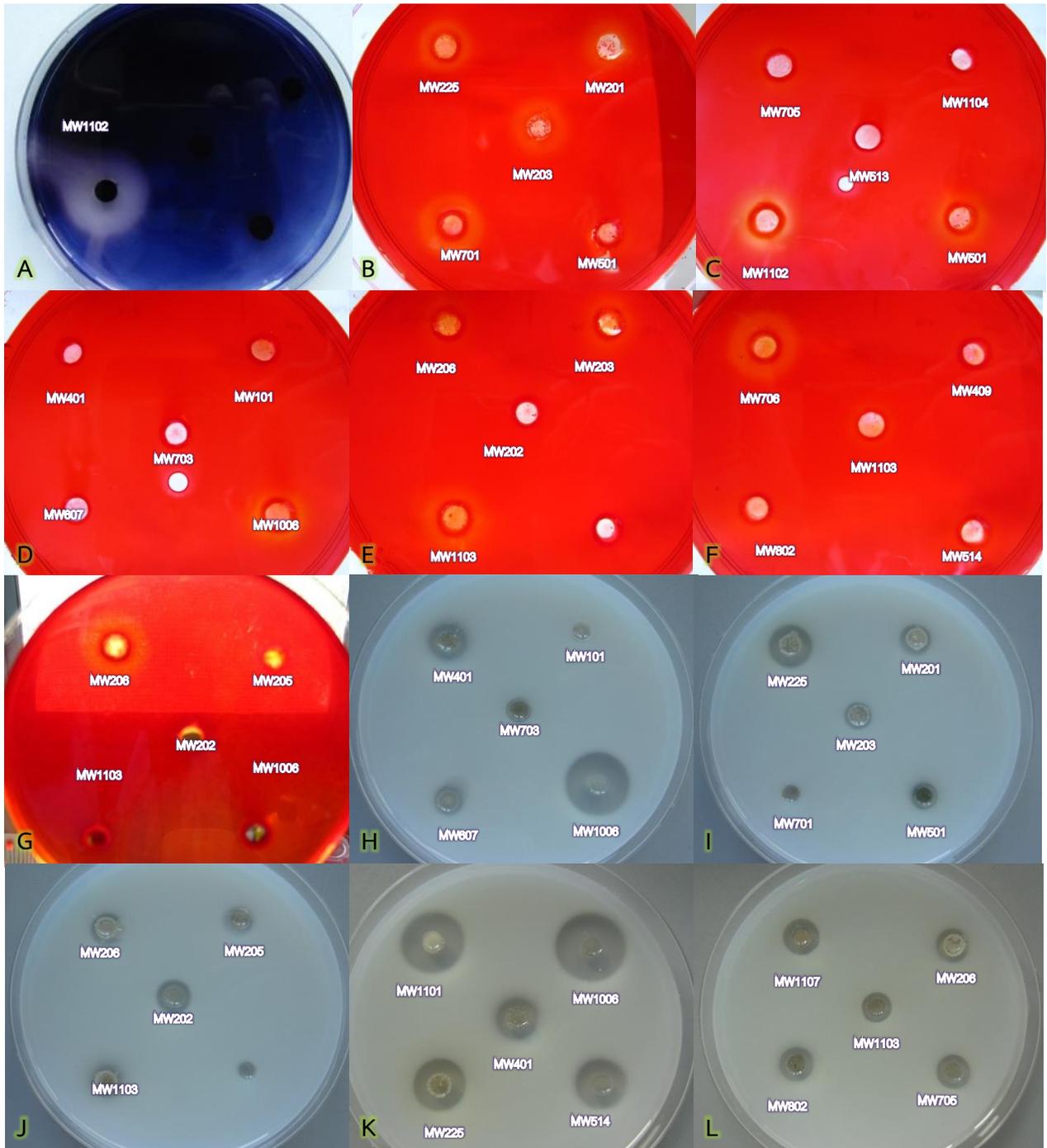
ลำดับที่	isolate	Inhibition zone/clear zone (mm.)							anticancer	ความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์
		antifungal	Anti-G+ bacteria	Anti-G- bacteria	protease	cellulase	mannase	amylase		
1	MW101	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	MW201	0	0	0	8	9	0	0	ND	ND
3	MW 202	0	0	0	9	0	0	0	ND	ND
5	MW 203	0	0	0	7	12	12	0	0	0
6	MW 205	0	0	0	8	11	0	0	0	0
7	MW 206	0	0	0	9	8	13	0	0	0
8	MW 225	0	38	0	14	10	0	0	0	0
9	MW 401	0	8	0	13	0	0	0	0	0
10	MW 408	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
11	MW 409	0	0	0	6	0	0	0	ND	ND
12	MW 410	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
13	MW 411	0	0	40	0	0	0	0	ND	ND
14	MW 501	0	40	0	8	0	0	0	ND	ND
15	MW 503	11	0	0	0	0	0	0	ND	ND
16	MW 513	0	0	0	8	0	0	0	ND	ND
17	MW 514	0	0	0	14	0	12	0	0	0
18	MW 607	0	0	0	8	0	0	0	0	0
20	MW 701	0	0	0	0	15	0	0	0	0

ลำดับที่	isolate	Inhibition zone/clear zone (mm.)							anticancer	ความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์
		antifungal	Anti-G+ bacteria	Anti-G- bacteria	protease	cellulase	mannase	amylase		
22	MW 703	0	0	0	7	0	0	0	ND	ND
23	MW 705	0	0	0	9	0	0	0	ND	ND
24	MW 706	0	0	0	0	15	0	0	ND	ND
25	MW 802	12	0	0	9	0	0	0	ND	ND
26	MW 1006	0	0	0	18	10	0	0	ND	ND
27	MW 1102	0	0	0	10	14	0	21	0	0
28	MW 1013	0	0	0	9	13	0	0	ND	ND
29	MW 1011	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
30	MW 1103	0	20	20	8	8	0	0	0	0
31	MW 1104	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
32	MW 1201	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
33	MW 1202	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
34	MW 1203	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
35	MW 1204	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
36	MW 1505	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
37	MW 1506	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
38	MW 1507	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND

หมายเหตุ: ND คือ ไม่ได้ทดสอบ เนื่องจากการทำการทดสอบ anticancer และ ความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ ต้องใช้งบประมาณค่อนข้างสูง ด้วยงบประมาณที่มีจำกัดจึงได้ทำการทดสอบในเชื้อบางสายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ที่คัดเลือกไปทำการทดสอบเป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างดีมากกว่า 3 ชนิด



ภาพที่ 19 ความสามารถของแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียทดสอบ



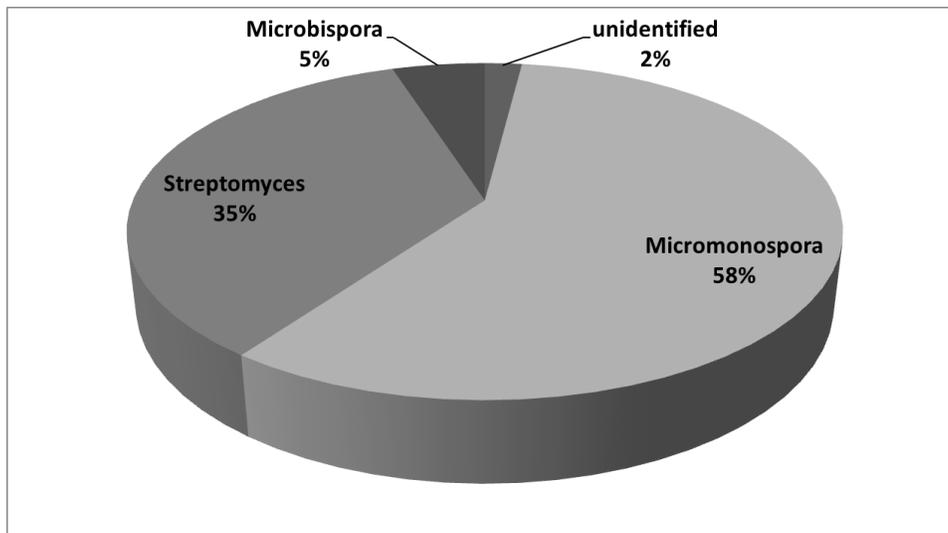
ภาพที่ 20 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ของเชื้อแอดติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
A: amylase; B-F: cellulose; G: mannase; H-L: protease

บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง

ความหลากหลายของเชื้อแอกติโนมัยสิทที่หายากที่แยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ผลการแยกเชื้อจากดินที่เก็บมาจากเขตอุทยานแม่วงก์ ทั้งหมด 15 จุด พบว่าได้เชื้อแอกติโนมัยสิททั้งหมด 166 ไอโซเลท ทำการจัดกลุ่มเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดโดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HT agar plate โดยสังเกตจากลักษณะของ aerial mycelium, substrate mycelium และการสร้างสารสี พบว่าได้จำนวนทั้งหมด 11 กลุ่มและเมื่อนำตัวแทนของเชื้อในแต่ละกลุ่มมาทำการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับลักษณะทางเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีน พบว่าจัดอยู่ใน 3 จีแนส คือ *Streptomyces* sp., *Microbispora* sp, *Micromonospora* sp จำนวน 54, 8 และ 100 ไอโซเลทตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 33, 5 และ 60 ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด โดยมีเปอร์เซ็นต์ identity 99% นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ยังไม่ทราบชนิดเนื่องจากยังมาพบการสร้างสปอร์บนอาหาร HT และยังไม่สามารถสกัด DNA เพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีน อีก 1 กลุ่ม คิดเป็น 2 % ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 กราฟแสดงจำนวนร้อยละของเชื้อที่แยกได้ในแต่ละจีแนส

ความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยสิทที่หายากที่แยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antifungal, anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial) เอนไซม์ และ anticancer โดยทดสอบกับเชื้อจำนวน 38 ไอโซเลท จาก 166 ไอโซเลท และจากเชื้อ 38 ไอโซเลท พบว่ามีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จำนวน 21

ไอโซเลท คิดเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่นำมาทดสอบ และจากเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดพบว่าเป็น *Streptomyces* 8 ไอโซเลท และ non-*Streptomyces* (แอกติโนมัยสิตที่หายาก) 13 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 38 และ 62 ตามลำดับ สรุปได้ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 สรุปผลความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยสิตที่แยกได้

จำนวนชนิดของ สารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพที่สร้างได้	isolate				รวม
	<i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Microbispora</i>	Unidentified	
4		MW1103			1
3	MW203 MW206 MW225		MW1102		4
2	MW201 MW401 MW1013	MW205 MW514 MW501	MW1006 MW503		7
1	MW202	MW802 MW705 MW513 MW411	MW703 MW706 MW409		9
รวม	8	12	1	0	21

จากตารางที่ 15 มีเชื้อแอกติโนมัยสิตที่หายากที่มีความน่าสนใจดังนี้

- เชื้อไอโซเลท MW1103 ซึ่งจัดอยู่ในจีนัส *Micromonospora* ซึ่งเป็นแอกติโนมัยสิตที่หายาก มีความสามารถในการสร้างสารได้ 4 ชนิดคือ anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial, เอนไซม์โปรตีเอส และ เอนไซม์เซลลูเลส
- เชื้อไอโซเลท MW1102 ซึ่งอยู่ในจีนัส *Microbispora* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้ 3 ชนิดคือ เซลลูเลส อะมัยเลส โปรตีเอส ทั้ง MW1103 และ MW1102 แยกได้จากดินบริเวณข้างถนนเส้นทางจากการอุทยานไปยังช่องเย็น
- เชื้อไอโซเลท MW501 ซึ่งแยกได้จากบริเวณที่ทำการอุทยานจัดอยู่ในจีนัส *Micromonospora* sp. ซึ่งเป็นแอกติโนมัยสิตที่หายาก ซึ่งไอโซเลท MW501 มีศักยภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยให้ขนาดของโซนยับยั้งมากถึง 40 มิลลิเมตร
- MW503 และ MW802 จัดอยู่ในจีนัส *Micromonospora* เป็นเพียง 2 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะจากผลการศึกษา

ความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากที่แยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ผลการแยกเชื้อจากดินที่เก็บมาจากเขตอุทยานแม่วงก์ ทั้งหมด 15 จุด พบว่าได้เชื้อแอคติโนมัยสิททั้งหมด 166 ไอโซเลท เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลักษณะทางเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีน พบว่าจัดอยู่ใน 3 จินัส คือ *Streptomyces* sp., *Microbispora* sp, *Micromonospora* sp จำนวน 54 8 และ 100 ไอโซเลทตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 33 5 และ 60 ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ยังไม่ทราบชนิด อีก 1 กลุ่ม คิดเป็น 2 % ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด

ความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากที่แยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antifungal, anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial) เอนไซม์ และ anticancer โดยทดสอบกับเชื้อจำนวน 38 ไอโซเลท จาก 166 ไอโซเลท และจากเชื้อ 38 ไอโซเลท พบว่ามีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จำนวน 21 ไอโซเลท คิดเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่นำมาทดสอบ และจากเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดพบว่าเป็น *Streptomyces* 8 ไอโซเลท และ non-*Streptomyces* (แอคติโนมัยสิทที่หายาก) 13 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 38 และ 62 ตามลำดับ โดยมีเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากที่มีความน่าสนใจ เช่น เชื้อไอโซเลท MW1103 ซึ่งจัดอยู่ในจินัส *Micromonospora* มีความสามารถในการสร้างสารได้ 4 ชนิดคือ anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial, เอนไซม์โปรตีเอส และ เอนไซม์เซลลูเลส เชื้อไอโซเลท MW1102 ซึ่งอยู่ในจินัส *Microbispora* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้ 3 ชนิดคือ เซลลูเลส อะมัยเลส โปรตีเอส และยังไม่ได้ทำการทดสอบความสามารถในการสร้างสาร anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial และ anticancer ทั้ง MW1103 และ MW1102 แยกได้จากดินบริเวณข้างถนนเส้นทางจากที่ทำการอุทยานไปยังช่องเขย่นบริเวณข้างป่าอมยาม ที่พิกัดภูมิศาสตร์ N16° 03' 23.8' เชื้อไอโซเลท MW501 และ MW503 ซึ่งแยกได้จากบริเวณที่ทำการอุทยานเป็นแอคติโนมัยสิทที่หายากจัดอยู่ในจินัส *Micromonospora* sp. โดยไอโซเลท MW501 มีศักยภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยให้ขนาดของโซนยับยั้งมากถึง 40 มิลลิเมตร ส่วน MW503 ได้ทำการทดสอบเพียงการสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เท่านั้นซึ่งไอโซเลทนี้ก็สามารถยับยั้งเชื้อราได้

ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์มีความน่าสนใจมาก ทั้งในเรื่องของชนิดที่พบ และความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยพบว่าส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของแอคติโนมัยสิทที่หายาก และมีจำนวน 4 ไอโซเลทที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ ซึ่งอาจจะเป็นแอคติโนมัยสิทชนิด



ใหม่ที่ยังไม่เคยมีใครค้นพบมาก่อน ในด้านความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการนาเชื้อที่แยกได้จำนวน 22 % มาทดสอบ พบว่ามีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพคิดเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่นำมาทดสอบ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบเชื้อไอโซเลท MW1103 ซึ่งพบในจุดเก็บตัวอย่างที่ 11 บริเวณเส้นทางจากที่ทำการอุทยานไปยังช่องเย็นบริเวณป่าอมยาม ที่พิกัดภูมิศาสตร์ N16° 03' 23.8' ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (broad spectrum antibiotics) และยังสามารถสร้างเอนไซม์ได้อีก 2 ชนิด ซึ่งอาจจะต้องทำการศึกษานิดของสารออกฤทธิ์ต่อไปว่าเป็นชนิดใหม่หรือไม่ ซึ่งถ้าเป็นชนิดใหม่ก็จะเป็นประโยชน์ทางการแพทย์ เนื่องจากสามารถนำไปแก้ปัญหาคำการดื้อต่อยาของเชื้อแบคทีเรียในปัจจุบันได้ ถ้าได้ดำเนินการทดสอบในเชื้อทั้งหมดอาจพบเชื้อที่มีความสามารถที่หลากหลายกว่านี้ จะเห็นได้ว่าดินในบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์มีความอุดมสมบูรณ์ มีความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีความสามารถในการสร้างออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ดังนั้นจึงควรอนุรักษ์ลักษณะของป่าให้คงความเป็นธรรมชาติไว้ เพื่อเป็นแหล่งของความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะแอคติโนมัยสิท ซึ่งมีคุณค่าในการเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ต่อไป



บทที่ 7

บรรณานุกรม

- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K. Matsuura, A. Nonaka, M. Uchio, R. Tanaka, H. and Motoki. M. 1989. Purification and characterization of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**. 53: 2613-2617.
- Bais, H.P., Weir, T.L. Perry, L.G. Gilroy, S. and Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**. 57: 233-266.
- Beltrametti, F., Lazzarini A., Brunati, C., Marazzi, A., Jovetic, S., Selva, E. And Marinelli, F. 2003. Production and characterization of monochlorinated and dechlorinated A40926 derivatives. **The Journal of Antibiotics**. 56(9): 773-782.
- BeomSeok, K., SurkSik, M. and ByungKook, H. 1999. Isolation, antifungal activity, and structure elucidation of the glutarimide antibiotic, streptimidone, produced by *Micromonospora coerulea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47:3372–3380.
- Benimeli, C.S., Fuentes, M.S., Abate, C.M. and Amoroso, M.J. 2008. Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 61: 233-239.
- Bertin, C., Yang, H.W. and Weston, L.A. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. **Plant and Soil**. 256: 67-83.
- Carlsohn, M.R., Groth, I., Tan, G.Y.A., Schütze, B., Saluz, H.P., Munder, T., Yang, J., Wink, J. and Goodfellow, M. 2007. *Amycolatopsis saalfeldensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a medieval alum slate mine. **International Journal of Systematic and Evolution Bacteriology**. 57: 1640-1646.
- Castillo, U.F., Strobel, G.A., Ford, E.J., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Albert, H. Robinson, R., Condrón, M.A., Teplow, M.D.B., Stevens, D. and Yaver, D. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigrisca*. **Microbiology**. 148: 2675-2685.
- Castillo, U., Harper, J.K., Strobel, G.A., Sears, J., Alesi, K., Ford, E. Lin, J., Hunter, M., Maranta, M., Ge, H., Yaver, D., Jensen, J.B., Porter, H., Robinson, R., Millar, D., Hess, W.M., Condrón, M. and Teplow, D. 2003. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**. 224: 183-190.
- Ceylan, O., Okmen, G. and Ugur, A. 2008. Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **EurAsia Journal of BioSciences**. 2: 73-82.
- Cheeptham, N., Sadoway, T., Rule, D., Watson, K., Moote, P., Soliman, L.C., Azad, N., Donkor,



- K.K. and Horne, D. 2013. Cure from the cave: volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. **International Journal of Speleology**. 42 (1), 35-47.
- Cheng, J., Zhang, Y.G., Chen, W., Li, L., Zhang, D.F., Wang, H.F. Lu, X.H., Duan, Y.Q., Li, W.J. 2013. *Saccharopolyspora cavernae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Swallow Cave in Yunnan, south-west China. **Antonie van Leeuwenhoek** DOI 10.1007/s10482-013-9996-z
- Chomchoei, A., Pathom-aree, W., Yokota, A., Kanongnuch, C., Lumyong, S. 2011. *Amycolatopsis thailandensis* sp. nov., a poly(l-lactic acid)-degrading actinomycete, isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**. 61:839–843.
- Clercq, E.D. 2001. New developments in anti-HIV chemotherapy. **Current Medical Chemistry**. 8: 1543-1572.
- Cross, T. 1968. Thermophilic actinomycetes. **Journal of Applied Bacteriology**. 31: 369-353.
- Colquhoun, J.A., Mexson, J., Goodfellow, M., Ward, A.C., Horikoshi, K. and Bull, A.T. 1998. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. **Antonie van Leeuwenhoek**. 74: 27-40.
- Cui, L., Du, G., Zhan, D. and Chen, J. 2008. Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. **Bioresource Technology**. 99: 3794-3800.
- Duangmal, K., Mingma, R., Pathom-aree, W., Niyomvong, N., Inahashi, Y., Matsumoto, A., Thamchaipenet, A., and Takahashi, Y. 2012. *Microbispora thailandensis* sp. nov., an actinomycete isolated from cave soil. **Journal of Antibiotics**. 65: 491–494.
- Fiedler, H.P., Bruntner, C., Riedinger J., Bull, A.T., Knutsen, G., Goodfellow, M., Jones, A., Maldonado, L., Pathom-aree, W., Beil, W., Schneider, K., Keller, S. and Sussmuth, R.D. 2008. Proximicin A, B and C, Novel Aminofuran Antibiotic and Anticancer Compounds Isolated from Marine Strains of the Actinomycete *Verrucosipora*. **Journal of Antibiotics**. 61(3): 158-163.
- Furumai, T., Igarashi, Y., Higuchi, H., Saito, N. and Oki, T. 2003. Kosinostatin, a quinocycline antibiotic with antitumor activity from *Micromonospora* sp. TP-A0468. **Journal of Antibiotics**. 55(2): 128-133.
- Goodfellow, M. 1985. The actinomycetes, pp. 211-231. In N. A. Logan, ed. **Bacterial Systematics**. Blackwell Scientific Publications, London.
- Groth, I. and Saiz-Jimenez, C. 1999. Actinomycetes in hypogean environments. **Geomicrobiology Journal**. 16: 1-8.



- Guerrieri, E., Poppy, G.M., Powell, W., Rao, R. and Pennacchio, F. 2002. Plant-to-plant communication mediating in-flight orientation of *Aphidiuservi*. **Journal of Chemical Ecology**. 28: 1703-1715.
- Hasegawa, T., Takizawa, M. and Tanida, S. 1983. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. **The Journal of General and Applied Microbiology**. 29: 319–322.
- Hayakawa, M. and Nonomura, H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. **Journal of Fermentation Technology**. 65: 501-509.
- In Stackebrandt E. and Goodfellow, M. eds. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Wiley, London. Lazzarini, A., L. Cavaletti, G. Toppo and F. Marinelli. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie van Leeuwenhoek** 78: 399-405.
- Jarerat, A. and Tokiwa, Y. 2001. Degradation of poly (tetramethylene succinate) by thermophilic actinomycetes. **Biotechnology Letters**. 23: 647-651.
- Jensen, P.R., Dwight, R. and Fenical, W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1102–1108.
- Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. and Kudo, T. 2008a. *Micromonospora chaiyaphumensis* sp. nov., isolated from Thai soils. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**. 58: 924–928.
- Jurado, V., Groth, I., Gonzalez, J.M., Laiz, L. and Saiz-Jimenez, C. 2005b. *Agromyces subbeticus* sp. nov., isolated from a cave in southern Spain. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**. 55:1897-1901.
- Kortemaa, H., Rita, H., Haahtela, K. and Smolander, A. 1994. Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. **Plant and Soil**. 163: 77-83.
- Laakso, J.A., Mocek U.M., Van Dum, J., Wouters, W. and Janicot, M. 2003. R176502, a New bafilolide metabolite with potent antiproliferative activity from a novel *Micromonospora* species. **Journal of Antibiotics**. 56: 909-916.
- Lam, K.S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Current Opinion in Microbiology**. 9: 245-251.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175.
- Lee, S.D. 2006a. *Actinocorallia cavernae* sp. nov., isolated from a natural cave in Jeju, Korea. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**. 56: 1085–1088.
- Lee, S.D. 2006b. *Amycolatopsis jejuensis* sp. nov. and *Amycolatopsis halotolerans* sp. nov.,

- novel actinomycetes isolated from a natural cave. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**. 56: 549-553.
- Lee, S.D. 2006c. *Nocardia jejuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a natural cave on Jeju Island, Republic of Korea. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**. 56: 559-562.
- Lee, S.D., Kang, S.O. and Hah, Y.C. 2000b. *Catellatospora koreensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a gold-mine cave. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**. 50: 1103-1111.
- Lee, S. D., Kang, S. O. and Hah, Y. C. 2000d. *Hongia* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**. 50: 191-199.
- Lee, S.D., Kim, E.S. and Hah, Y.C. (2000c). Phylogenetic analysis of the genera *Pseudonocardia* and *Actinobispora* based on the 16S rDNA sequence studies. **FEMS Microbiology Letters**. 182: 125-129.
- Lee, S.D., Kim, E.S., Roe, J.-H., Kim, J., Kang, S.-O. and Hah, C. 2000a. *Saccharothrix violacea* sp. nov., isolated from a gold mine cave, and *Saccharothrix albidocapillata* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**. 50:1315-1323.
- Lozitsky, V.I., Kashkin, A.P., Shneider, M.A., Fedchuk, A.S., Puzis, E. and Alexander, N.G. 2002. Antiviral action of proteolysis inhibitor from *Streptomyces* species, pp. A75. In Abstracts 15th International Conference on Antiviral Research. 17-21 March 2002.
- Maitra, P.K. and Roy, S.C. 1960. Trace elements and the synthesis of vitamin B12 by *Streptomyces olivaceus*. **Biochemical Journal**. 75: 483-487.
- Malet-Cascón, L., Romero, F., Espliego-Vázquez, F., Grávalos, D. and Fernández- Puentes, J.L. 2003. IB-00208, a new cytotoxic polycyclic xanthone produced by a marine-derived *Actinomadura*. I. Isolation of the strain, taxonomy and biological activities. **Journal of Antibiotics**. 56(3): 219-225.
- Maskey, R.P., Li, F., Qin, S., Fiebig, H.H, Laatsch, H. 2003. Chandrananimycins A approximately C: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. **Journal of Antibiotics**. 56(7): 622-629.
- Miyadoh, S. 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. **Actinomycetological**. 7: 100-106.
- Moon, S.S., Hwang, W.H., Chung, Y.R. and Shin, J. 2003. New cytotoxic bafilomycin C1-amide produced by *Kitasatospora cheerisanensis*. **Journal of Antibiotics** 56(10): 856-861.
- Morris, P.F., Bone, E. and Tyler, B.M. 1998. Chemotropic and contact responses of *Phytophthora sojae*

- hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates. **Plant Physiology**. 117: 1171-1178.
- Nakaew, N., Sungthong, R., Yokota, A. and Lumyong, S. 2012. *Nonomuraea monospora* sp. nov., an antimicrobial and anticancer compound-producing actinomycete isolated from Thai cave soil and emended description of the genus *Nonomuraea*. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology**. 62:3007-3012.
- Nakaew, N., Lumyong, S. and Pathom-aree, W. 2009. First record on isolation, identification and biological activities of new strain of *Spirillospora albida* from Thai Cave Soil. **Actinomycetologica**. 23(1):1-7.
- Nakaew, N., Lumyong, S. and Pathom-aree, W. (2009). Generic Diversity of Rare Actinomycetes from Thai Cave Soils and Possible Use as New Bioactive Compound Resources **Actinomycetologica**. 23(2): 1-6.
- Ninawe, S., Kapoor, M. and Kuhad, R.C. 2008. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. **Bioresource Technology**. 99: 1252-1258.
- Omura, S. and A. Crump. 2004. The life and times of ivermectin - a success story. **Nature Reviews Microbiology**. 2: 984-989.
- Pathom-aree, W., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. and Goodfellow, M. 2006. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. **Extremophiles** 10: 181-189.
- Parales, R.E., J.E. Adamus, N. White and H.D. May. 1994. Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture. **Applied and Environmental Microbiology**. 60: 4527-4530.
- Perry, L.G, Johnson, C., Alford, E.R., Vivanco, J.M. and Paschke, M.W. 2006. Screening of grassland plants for restoration after spotted knapweed invasion. **Restoration Ecology**. 13: 725-735.
- Polti, M.A., Amoroso, M.J. and Abate, C.M. 2007. Chromium (VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments. **Chemosphere**. 67: 660-667.
- Quintana, E., Maldonado, L. and Goodfellow, M. 2003. *Nonomuraea terrinata* sp. nov., a novel soil actinomycete. **Antonie van Leeuwenhoek**. 84: 1-6.
- Ranjala, R., Lacey, E., Tennant, S., Jennifer H.G. and Robert, J.C. 2007. Kibdelones: Novel Anticancer Polyketides from a Rare Australian Actinomycete **Chemistry: A European Journal**. 13: 1610-1619.
- Reh fuss, M. and Urban, J. 2005. *Rhodococcus phenolicus* sp. nov., a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources. **Systematic and Applied Microbiology**. 28: 695-701.
- Rothrock, C.S. and Gottlieb, D. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces*



- hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. **Canadian Journal Microbiology**. 30: 1440-1447.
- Sabaratnam, S. and Traquair, J.A. 2002. A formulation of *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplant. **Biological Control**. 23: 245-253.
- Samac, D.A., Willert, A.M., McBride, M.J. and Kinkel, L.L. 2003. Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa. **Applied Soil Ecology**. 22: 55-66.
- Santos, P.S., Abad, E.J., Pagua, A.G., and Lat, B.S. 1976. Vitamin B12 and antibiotics of actinomycetes isolated by a selective method from soil samples. **Philips Journal of Research**. 103: 208-220.
- Shih, H., Y. Liu, F. Hsu, V. Mulabagal, R. Dodda and J. Huang. 2003. Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51: 95-99.
- Sette, L.D., Oliveira de, V.M. and Manfio, G.P. 2005. Isolation and characterization of alachlor-degrading actinomycetes from soil. **Antonie van Leeuwenhoek**. 87: 81-89.
- Shu, Y.Z., Ye, Q., Kolb, J.M., Huang, S., Veitch, J.A., Lowe, S.E. and Manly, S.P. 1997. Bripiodionen, a new inhibitor of human cytomegalovirus protease from *Streptomyces* sp. WC76599. **Journal of Natural Product**. 60: 529-532.
- Stamford, T.L.M., Stamford, N.P., Coelho, L.C.B.B., and Araújo, J.M. 2002. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**. 83: 105-109.
- Steenhoudt, O. and Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Review**. 24: 487-506.
- Tahvonen, R. 1982a. Preliminary experiments into the use of *Streptomyces* spp. isolated from peat in the biological control of soil and seed-borne diseases in peat culture. **Journal of the Scientific Agricultural Society Finland**. 54: 357-369.
- Takahashi, Y. and Omura, S. 2003. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. **Journal of General Applied Microbiology**. 49: 141-154.
- Takizawa, M., Colwell, R.R. and Hill, R.T. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake bay. **Applied and Environmental Microbiology**. 59(4): 997-1002.
- Thaiwai, C., Kittakoop, P., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Sriklung, K. and Thebtaranonth, Y. 2004. Micromonosporin A, a novel 24-membered polyene lactam macrolide from *Micromonospora* sp. isolated from peat swamp forest. **Chemistry & Biodiversity**. 1: 640-645.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Itoh, T. and Kudo, T. 2007. *Micromonospora*



- narathiwatensis* sp. nov., from Thai peat swamp forest soils. **The Journal of General and Applied Microbiology**.53:287–293.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K. and Kudo, T. 2005a. *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. **International Journal of Systematic and Evolution Microbiology** 55:417–422.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. and Kudo, T. 2005b. *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. **The Journal of General and Applied Microbiology**. 51, 229–234.
- Thomas, A., Rajeswari, R., F.R., Jaggarajamma, T.S., Selvakumar, N., Nalini K., Nalini, S., Sundaram V., Fraser, W. and Narayanan P.R. 2007. Management of multi drug resistance tuberculosis in the field: tuberculosis research centre experience. **Indian Journal of Tuberculosis**. 117-124.
- Torres-Bacete, J., Arroyo, M., Torres-Guzman, R., Mata, I.D.L., Acebal, C. and Castillon. M.P. 2005. Opimization of culture medium and conditions for penicillin acylase production by *Streptomyces lavendulae* ATCC 13664. **Applied Biochemistry Biotechnology**. 126: 119-131.
- Tuncer, M., Ball, A.S., Rob, A. and Wilson, M.T. 1999. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. **Enzyme and Microbial Technology**. 25: 38-47.
- Wang, L., Huang, Y., Liu, Z., Goodfellow, M. and Rodriguez, C. 2006. *Streptacidiphilus oryzae* sp. nov., an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolution Bacteriology**. 56: 1257-1261.
- Wardle, D.A., Nicholson, K.S., Ahmed, M. and Rahman, A. 1994. Interference effects of the invasive plant *Carduus nutans* L. against the nitrogen fixation ability of *Trifolium repens* L. **Plant and soil**. 163: 287-297.
- Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, G. 1989. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 4. Baltimore: Williams & Wilkins.



คณะผู้วิจัย

1. ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว (Dr. Nareeluk Nakaew)

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
และ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ : 055964622 โทรสาร 055964770

E-mail address: nnakaew@hotmail.com

2. ดร. รักษิณา พลสีลา (Dr. Raxina Polseela)

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
และ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์: 0-5596-4610 โทรสาร: 0-5596-4770

E-mail: polseela@hotmail.com

3. ดร. อภิชาติ วิทย์ตะ (Dr. Apichat Vitta)

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
และ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์: 0-5596-4653 โทรสาร: 0-5596-4770

E-mail: pexvitta@hotmail.com

4. นายสุธน เวียงดาว

หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์