รหัสโครงการ SUT1-104-55-12-22

รายงานการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้จากตัวอย่างดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี-มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (อพ.สธ.-มทส.)

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

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-55-12-22

รายงานการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ จากตัวอย่างดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี-มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (อพ.สธ.-มทส.)

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

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. นวรัตน์ นันทพงษ์

สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กุมภาพันธ์ 2558

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวปัญจมาภรณ์ จันทเสนา นักศึกษาปริญญาโท ที่ให้ความช่วยเหลือทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ และขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

โรคติดเชื้อจากเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสจัดเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข โดยเฉพาะในแหล่งชุมชนที่มีประชากรอาศัยอยู่อย่างหนาแน่น ทั้งนี้เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสหลายสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นเชื้อดื้อยา ดังนั้นการวิจัยเพื่อค้นหาสารปฏิชีวนะตัวใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพต้านเชื้อก่อโรค โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ดื้อยา จึงมีความสำคัญ

แบคทีเรียในดินหลายสปีชี่ย์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้โดยเฉพาะกลุ่มของ Actinobacteria ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในด้านการแพทย์และการค้า ก็ผลิตมาจากเชื้อ Actinobacteria ที่แยกจากดินในยีนัส *Streptomyces* และ *Micromonospora* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะได้

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

คำสำคัญ: Soil bacteria, Antibiotics, Actinobacteria, Actinomycetes

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

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

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

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

Keywords: Soil bacteria, Antibiotics, Actinobacteria, Actinomycetes

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค

สารบัญ..... ง

สารบัญภาพ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

1.3 ขอเขตของการวิจัย..... 3

1.4 การทบทวนวรรณกรรม..... 4

1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย..... 6

1.6ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 6

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 7

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ..... 7

2.2 สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์..... 8

2.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน..... 8

2.4 ทดสอบฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้วิธี Perpendicular streak plate..... 9

2.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีทางอณูพันธุศาสตร์..... 11

บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย..... 12

3.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะจากดิน..... 12

3.2 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA..... 21

3.3 ประสิทธิภาพการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ Actinomycetes สายพันธุ์ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107..... 23

3.4 การศึกษาความสัมพันธ์และสายวิวัฒนาการของเชื้อ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107 โดยใช้ยีน 16S rRNA..... 30

บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย..... 32

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม..... 34

ภาคผนวก..... 36

ภาคผนวก ก. ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107..... 37

ภาคผนวก ข. งานวิจัยจากโครงการนี้ที่มีการเผยแพร่ในงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ..... 45

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 การทดสอบฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรีย..... 10

ภาพที่ 3.1 แนวการเพาะเชื้อ PJ และ เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาส เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ 24

ภาพที่ 3.2 แผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Neighbor–joining ของเชื้อสายพันธุ์ PJ กับเชื้อใน Family Actinomycetes สายพันธุ์ต่าง ๆ..... 31

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 แสดงจำนวนเชื้อเป็นโคโลนีที่พบบนอาหาร SC agar และจำนวนเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะได้..... 13

ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพของเชื้อ PJ1 ถึง PJ123 ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบชนิดต่าง ๆ..... 15

ตารางที่ 3.3 ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 16S rRNA ของเชื้อ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107 กับเชื้อในฐานข้อมูล GenBank 22

ตารางที่ 3.4 การสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ 25

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

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

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

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

พื้นที่ป่าโดยรอบบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา พบว่าเป็นป่าเต็งรัง และป่าเบญจพรรณอยู่เป็นบริเวณกว้าง ซึ่งเป็นไปได้ว่าพื้นที่เหล่านี้น่าจะมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อย่างไรก็ดียังไม่เคยมีกลุ่มนักวิจัยเข้าไปสำรวจและเก็บข้อมูลสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้อย่างจริงจัง คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาและเก็บรวบรวมข้อมูลสายพันธุ์ของแบคทีเรียในดินที่พบในบริเวณนี้ โดยคาดหวังว่าการศึกษาครั้งนี้น่าจะมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบ

ความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในดิน การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ทางด้านชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในดินบริเวณป่ารอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ในพื้นที่ป่าโดยรอบของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

2. เพื่อแยกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินกลุ่มที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ จากพื้นที่ป่าโดยรอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

3. เพื่อศึกษาชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในดินที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ เพื่อรวบรวมและเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในดินที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ ที่พบในพื้นที่ป่าโดยรอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. สำรวจ เก็บตัวอย่าง และแยกเชื้อแบคทีเรียจากดิน

2. จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะได้จากตัวอย่างดิน

3. จัดทำฐานข้อมูลความหลากหลายของชนิดของแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ โดยอาจนำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาศึกษาและประยุกต์ใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป

1.4 การทบทวนวรรณกรรม

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

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

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

กลุ่ม β–lactam ได้ (Williams et al., 1986) นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณ 66 % ของยาปฏิชีวนะที่แยกได้จากธรรมชาติส่วนใหญ่ จะได้มาจากเชื้อในยีนัส *Streptomyces* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่พบได้บ่อยในดิน โดยเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น neomycin, chloramphenicol และ streptomycin เป็นต้น (Watve et al., 2001)

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

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

1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แบคทีเรียในดินส่วนใหญ่จะช่วยในการหมุนเวียนแร่ธาตุและสารอาหารภายในดิน โดยแบคทีเรียจะมีความสามารถในการเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ไปเป็นสารประกอบอนินทรีย์สำหรับให้พืชและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ นำไปใช้ได้ เนื่องจากแบคทีเรียที่พบในดินมีความหลากหลายมากทั้งชนิดและปริมาณ ดังนั้นการศึกษาเพื่อระบุชนิดและกลุ่มของแบคทีเรียที่พบในดินบริเวณที่ยังไม่เคยทำการสำรวจจึงมีความสำคัญ เนื่องจากข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับพัฒนาวิทยาศาสตร์แขนงอื่น ๆ ได้ต่อไป

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

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

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

พื้นที่ที่ทำการศึกษาเก็บตัวอย่าง

บริเวณพื้นที่ป่าภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินคือ Starch–Casein agar (SC agar) ที่มีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ soluble starch 10, casein 0.3, KNO_3 2, NaCl 2, K_2HPO_4 2, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05, $CaCO_3$ 0.02, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 และ agar 15 สำหรับอาหารที่ใช้สำหรับทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์คือ Mueller Hinton Agar (MHA) ที่มีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ beef extract 300, casein hydro lysate 17.5, starch 1.5 และ agar 17 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดจะผ่านการทำปลอดเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15–20 นาที เชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารจะนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ

2.2 สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์

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

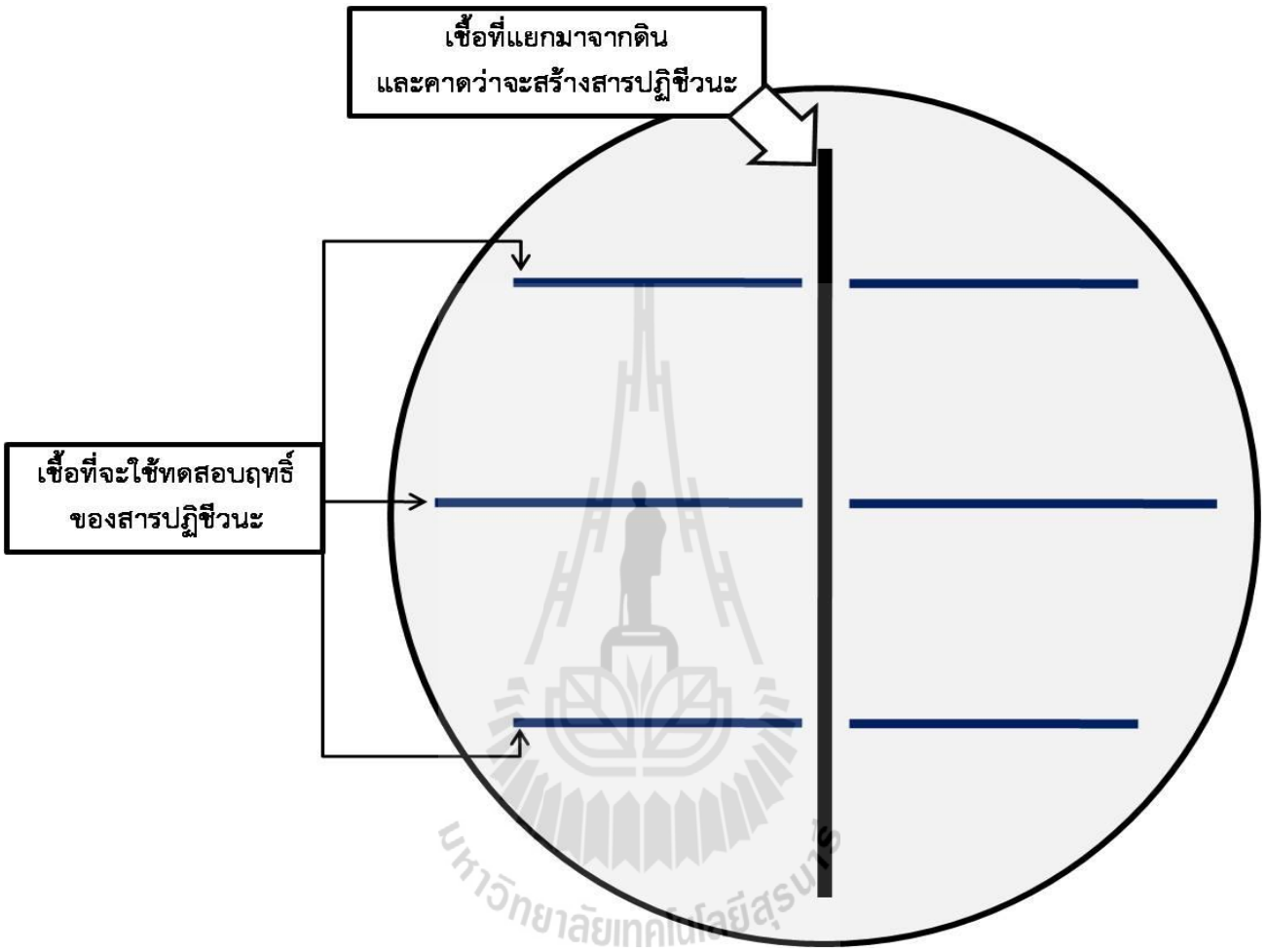
2.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

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

2.4 ทดสอบฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้วิธี Perpendicular streak plate

นำเชื้อที่คาดว่ามีความสามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์มาเพาะลงบนจานอาหาร MHA โดยขีดลากเป็นเส้นตรงตามแนวกึ่งกลางจานอาหาร (ภาพที่ 2.1) นำจานไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนเชื้อเจริญ เพื่อให้เชื้อสร้างสารปฏิชีวนะซึมเข้าไปในเนื้อวุ้นโดยรอบโคโลนี ต่อมานำเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่จะใช้ทดสอบความไวไปเพาะบนจานเดียวกับเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะ โดยขีดลากเป็นแนวตั้งฉากกับเชื้อเดิมที่เจริญอยู่ก่อน (ภาพที่ 2.1) แล้วนำจานไปบ่มต่อประมาณ 24–48 ชั่วโมง โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในกรณีที่เชื้อก่อโรคเป็นยีสต์ แต่ถ้าเชื้อก่อโรคที่นำมาทดสอบเป็นแบคทีเรีย ให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การตรวจผล ให้ตรวจดูการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบความไวโดยสังเกตว่า หากเชื้อทดสอบตัวใดไม่สามารถเจริญเข้ามาใกล้โคโลนีของเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ แสดงว่าสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างออกมานั้นมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อทดสอบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 2.1 การทดสอบฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรีย

2.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีทางอณูพันธุศาสตร์

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

2.6 การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อที่แยกได้จากดิน มาสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียที่ทราบชนิดแล้วจากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0

บทที่ 3
ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะจากตัวอย่างดิน

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 แสดงจำนวนเชื้อเป็นโคโลนีที่พบบนอาหาร SC agar และจำนวนเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะได้

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

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

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสารต้านแบคทีเรียของเชื้อ PJ1 ถึง PJ123 แสดงไว้ในตารางที่ 3.2

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพของเชื้อ PJ1 ถึง PJ123 ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบชนิดต่าง ๆ

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Isolate name	เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่ใช้ทดสอบ				
	S. aureus	*B. cereus*	*E. coli*	*E. aerogenes*	*P. aeruginosa*
PJ105	–	–	–	–	–
PJ106	–	–	–	–	–
PJ107	+	+	–	–	–
PJ108	–	–	–	–	–
PJ109	–	–	–	–	–
PJ110	–	–	–	–	–
PJ111	–	–	–	–	–
PJ112	–	–	–	–	–
PJ113	–	–	–	–	–
PJ114	–	–	–	–	–
PJ115	–	–	–	–	–
PJ116	–	–	–	–	–
PJ117	–	–	–	–	–
PJ118	–	–	–	–	–
PJ119	–	–	–	–	–
PJ120	–	–	–	–	–
PJ121	+	–	–	ND	–
PJ122	–	–	–	–	–
PJ123	–	–	–	–	–

คำอธิบายสัญลักษณ์:

+	สร้างสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้
–	ไม่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบ
ND	ไม่ได้ทดสอบ (Not Determine)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

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

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

3.2 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

ในเบื้องต้น เชื้อที่แยกได้ทั้ง 22 isolates มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาตรงกับเชื้อในกลุ่ม Actinomycetes เนื่องจากโคโลนีของเชื้อส่วนใหญ่มีการสร้างเม็ดสี ขอบโคโลนีนูน–แข็ง คล้ายโคโลนีของเชื้อรามากกว่าแบคทีเรีย และเมื่อนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ก็พบเซลล์มีลักษณะเป็นเส้นใย ติดสีแกรมบวก โดยลักษณะที่กล่าวมานี้จะตรงกับเชื้อใน genus *Streptomycetes* มากที่สุด (Whitman et al., 2012)

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

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

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยนำไปเทียบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นในฐานข้อมูล GenBank พบว่า เชื้อที่แยกได้จำนวน 11 isolates คือ PJ33 PJ36 PJ43 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในยีนัส *Streptomyces* มีเชื้อเพียง 1 isolate คือ PJ51 ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในยีนัส *Nonomuraea* ผลการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อทั้ง 12 isolates กับฐานข้อมูล GenBank แสดงไว้ในตารางที่ 3.3

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

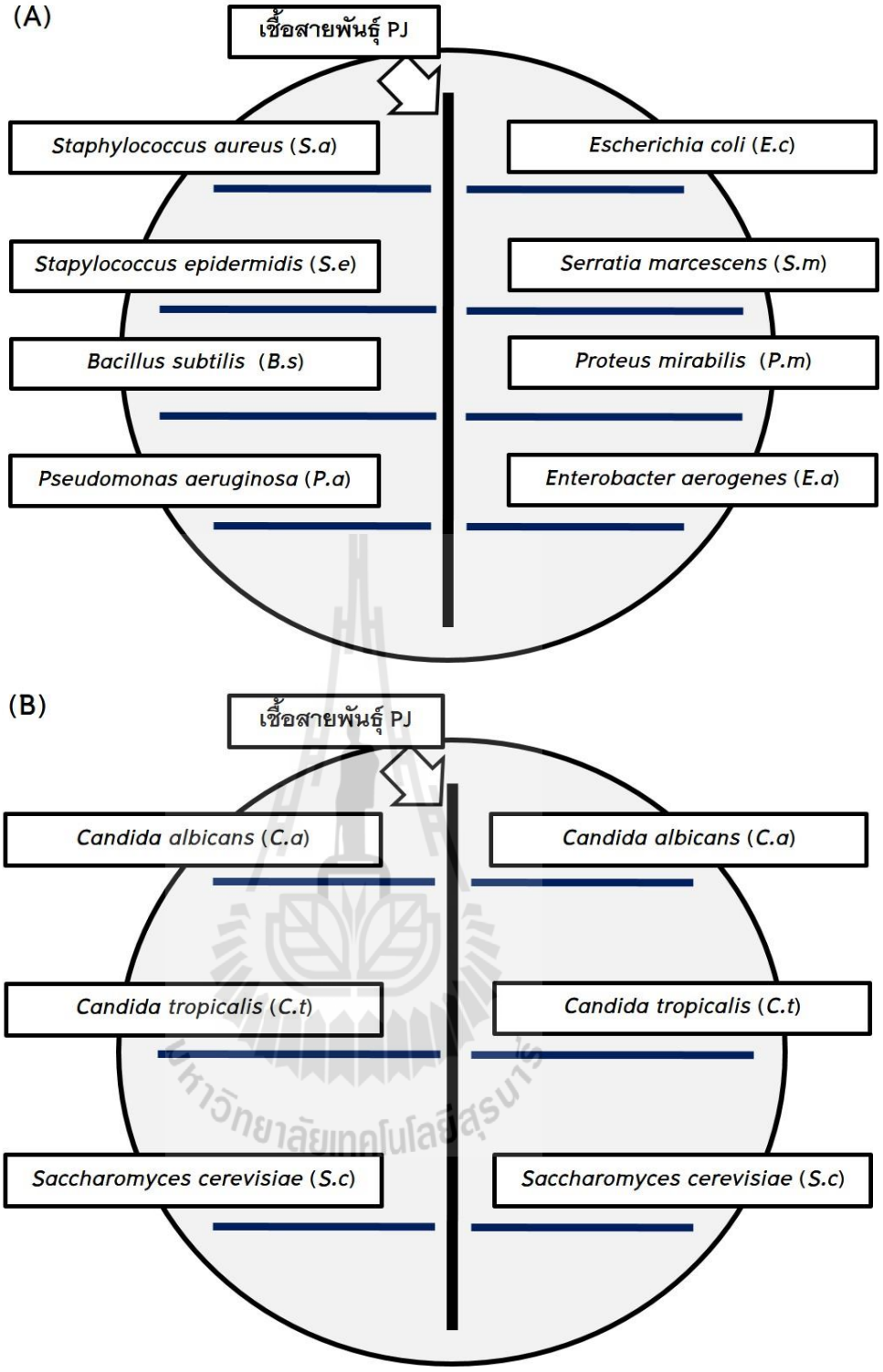
Isolate name	**ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน 16S rRNA**	
	สายพันธุ์	**% ความเหมือน**
PJ33	*Streptomyces alboniger*	99
PJ36	*Streptomyces chrestomyceticus*	99
PJ43	*Streptomyces cinereospinus*	99
PJ51	*Nonomuraea jabiensis*	99
PJ75	*Streptomyces cyaneus*	99
PJ76	*Streptomyces iakyrus*	100
PJ77	*Streptomyces celluloflavus*	99
PJ85	*Streptomyces durhamensis*	98
PJ88	*Streptomyces griseocarneus*	99
PJ90	*Streptomyces filipinensis*	99
PJ95	*Streptomyces luteosporeus*	100
PJ107	*Streptomyces filipinensis*	99

3.3 ประสิทธิภาพการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ Actinomycetes สายพันธุ์ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107

เพื่อให้ผลการทดลองการสร้างสารต้านเชื้อจุลชีพของเชื้อ Actinomycetes ทั้ง 12 isolates คลอบคลุมกลุ่มเชื้อ opportunistic pathogens ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ให้มากที่สุด นักวิจัยจึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติม โดยแบ่งกลุ่มเชื้อที่ใช้ทดสอบดังนี้

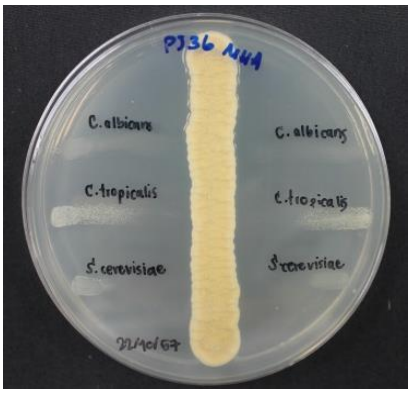
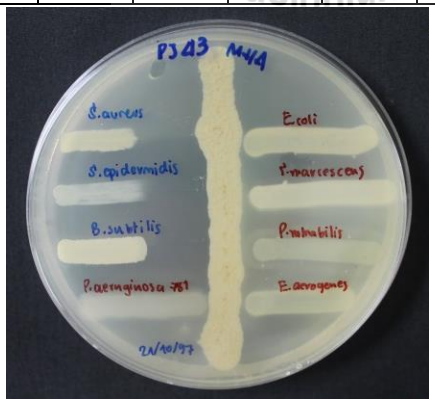
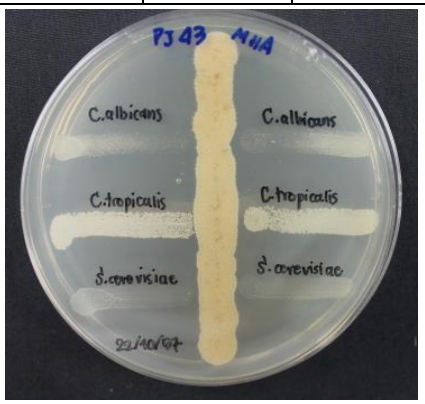
แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Bacillus subtilis* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* และ *Enterobacter aerogenes* ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans*, *Candida tropicalis* และ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

การทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ ทำโดยใช้วิธีการ perpendicular streak plate ซึ่งจะเพาะเชื้อสายพันธุ์ PJ ที่สร้างสารปฏิชีวนะไว้ในแนวกึ่งกลางของจานอาหาร แล้วนำไปบ่มประมาณ 3 ถึง 5 วัน เพื่อที่เชื้อจะได้สร้างสารต้านจุลชีพและปล่อย แพร่ออกมาในวุ้น หลังจากนั้นจึงเพาะเชื้อในกลุ่ม opportunistic pathogens ให้อยู่ในแนวตั้งฉากกับเชื้อที่สร้างสารต้านจุลชีพ นำไปบ่มต่อประมาณ 24 ถึง 48 ชั่วโมง แล้วมาตรวจผลโดยดูว่าเชื้อก่อโรคสามารถเจริญเข้ามาใกล้แนวการเจริญของเชื้อ PJ ที่สร้างสารต้านจุลชีพได้หรือไม่ ผลการสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อ PJ ทั้ง 12 isolates แสดงในตารางที่ 3.4 และ แผนผังการเพาะเชื้อสำหรับทดสอบแสดงในภาพที่ 3.1

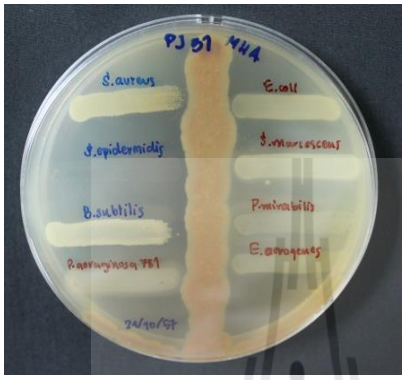
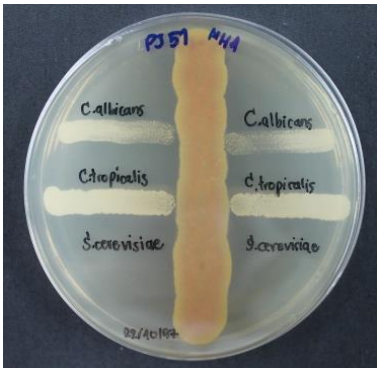
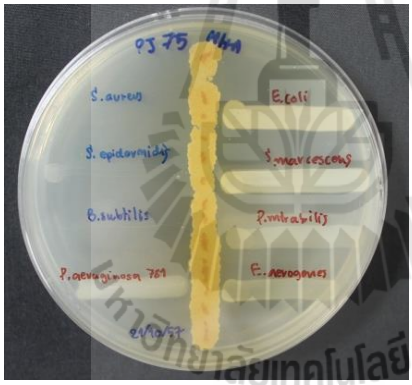
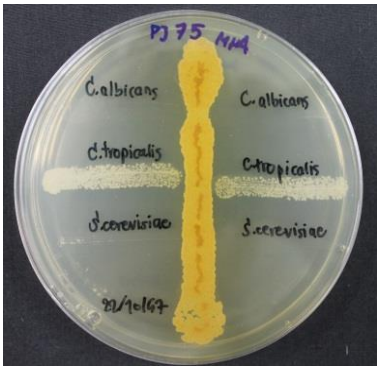
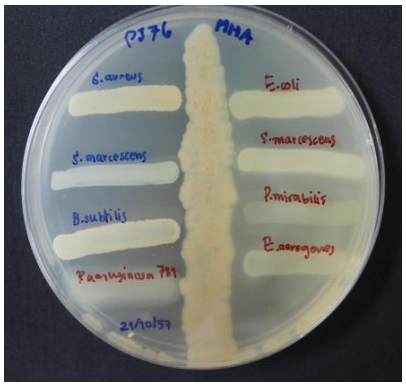


ภาพที่ 3.1 แนวการเพาะเชื้อ PJ และ เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาส เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ (A) ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแบบฉวยโอกาส (B) ทดสอบกับเชื้อยีสต์ก่อโรคแบบฉวยโอกาส

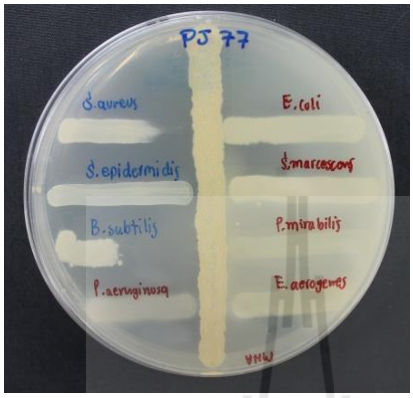
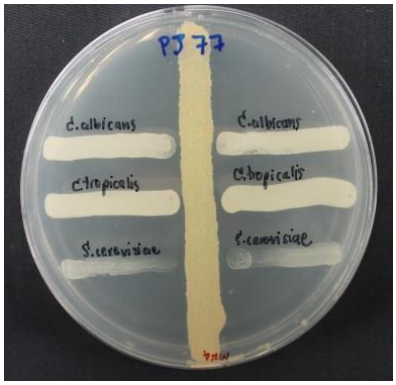
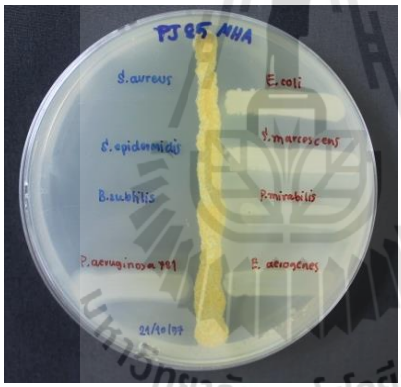
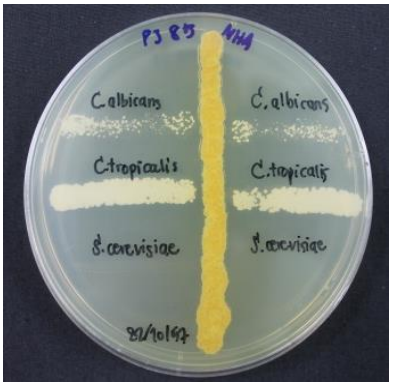
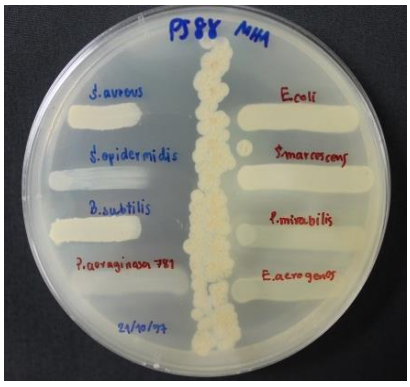
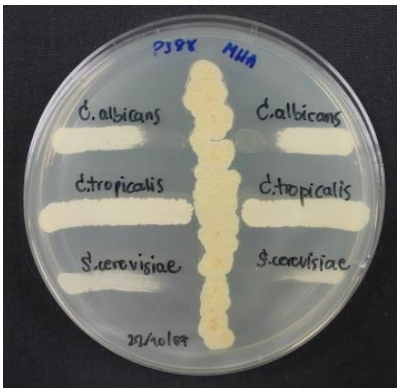
ตารางที่ 3.4 การสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ

สายพันธุ์ PJ	เชื้อก่อโรคฉวยโอกาส										
	แบคทีเรียแกรมบวก			แบคทีเรียแกรมลบ					ยีสต์		
	S.a	*S.e*	*B.s*	*P. a*	*E.c*	*S.m*	*P.m*	*E.a*	*C.a*	*C.t*	*S.c*
PJ33	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
PJ36	+++	+++	+++	–	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
											
PJ43	++	++	++	–	–	–	–	–	++	–	++
											

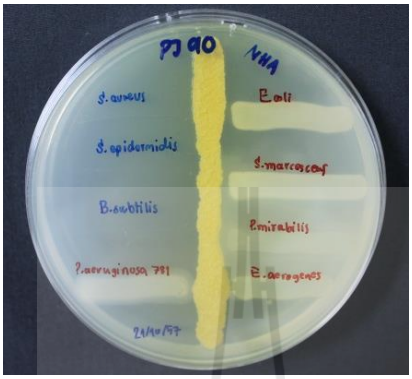
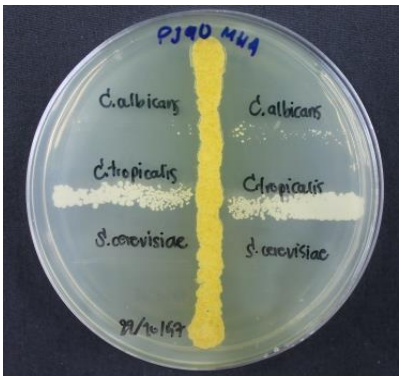
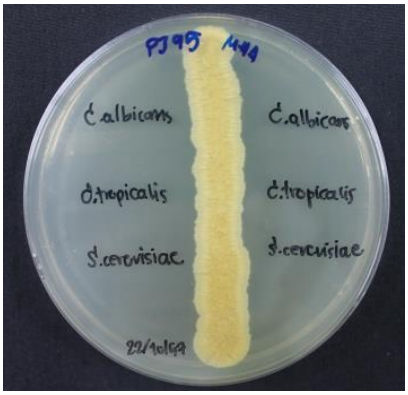
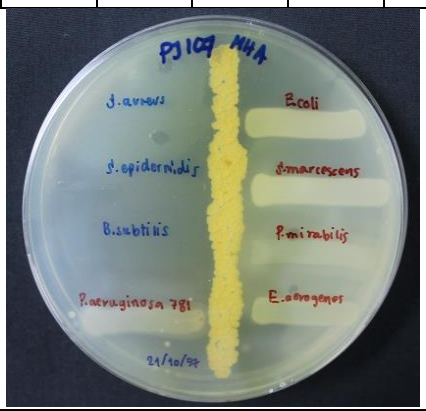
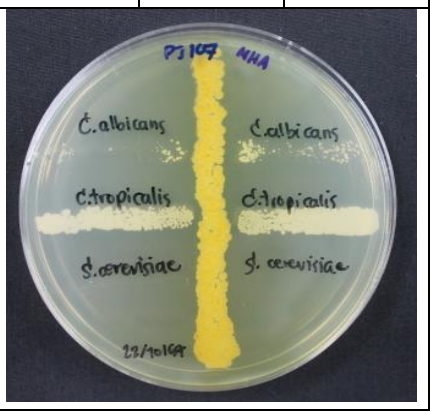
ตารางที่ 3.4 การสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ (ต่อ)

สายพันธุ์ PJ	เชื้อก่อโรคฉวยโอกาส										
	แบคทีเรียแกรมบวก			แบคทีเรียแกรมลบ					ยีสต์		
	S.a	*S.e*	*B.s*	*P. a*	*E.c*	*S.m*	*P.m*	*E.a*	*C.a*	*C.t*	*S.c*
PJ51	–	+++	–	–	–	–	–	–	–	–	+++
										
PJ75	+++	+++	+++	–	–	–	–	–	+++	–	+++
										
PJ76	–	–	–	–	–	–	–	–	+++	+	+++
										

ตารางที่ 3.4 การสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ (ต่อ)

สายพันธุ์ PJ	เชื้อก่อโรคฉวยโอกาส										
	แบคทีเรียแกรมบวก			แบคทีเรียแกรมลบ					ยีสต์		
	S.a	*S.e*	*B.s*	*P. a*	*E.c*	*S.m*	*P.m*	*E.a*	*C.a*	*C.t*	*S.c*
PJ77	+	–	++	–	–	–	–	–	–	–	–
											
PJ85	+++	+++	+++	–	–	–	–	–	+	–	+++
											
PJ88	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	+
											

ตารางที่ 3.4 การสร้างสารต้านจุลชีพของเชื้อสายพันธุ์ PJ (ต่อ)

สายพันธุ์ PJ	เชื้อก่อโรคฉวยโอกาส										
	แบคทีเรียแกรมบวก			แบคทีเรียแกรมลบ					ยีสต์		
	S.a	*S.e*	*B.s*	*P. a*	*E.c*	*S.m*	*P.m*	*E.a*	*C.a*	*C.t*	*S.c*
PJ90	+++	+++	+++	–	–	–	–	–	+++	–	+++
											
PJ95	+++	+++	+++	–	+++	–	+++	+	+++	+++	+++
											
PJ107	+++	+++	+++	–	–	–	–	–	+++	–	+++
											

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

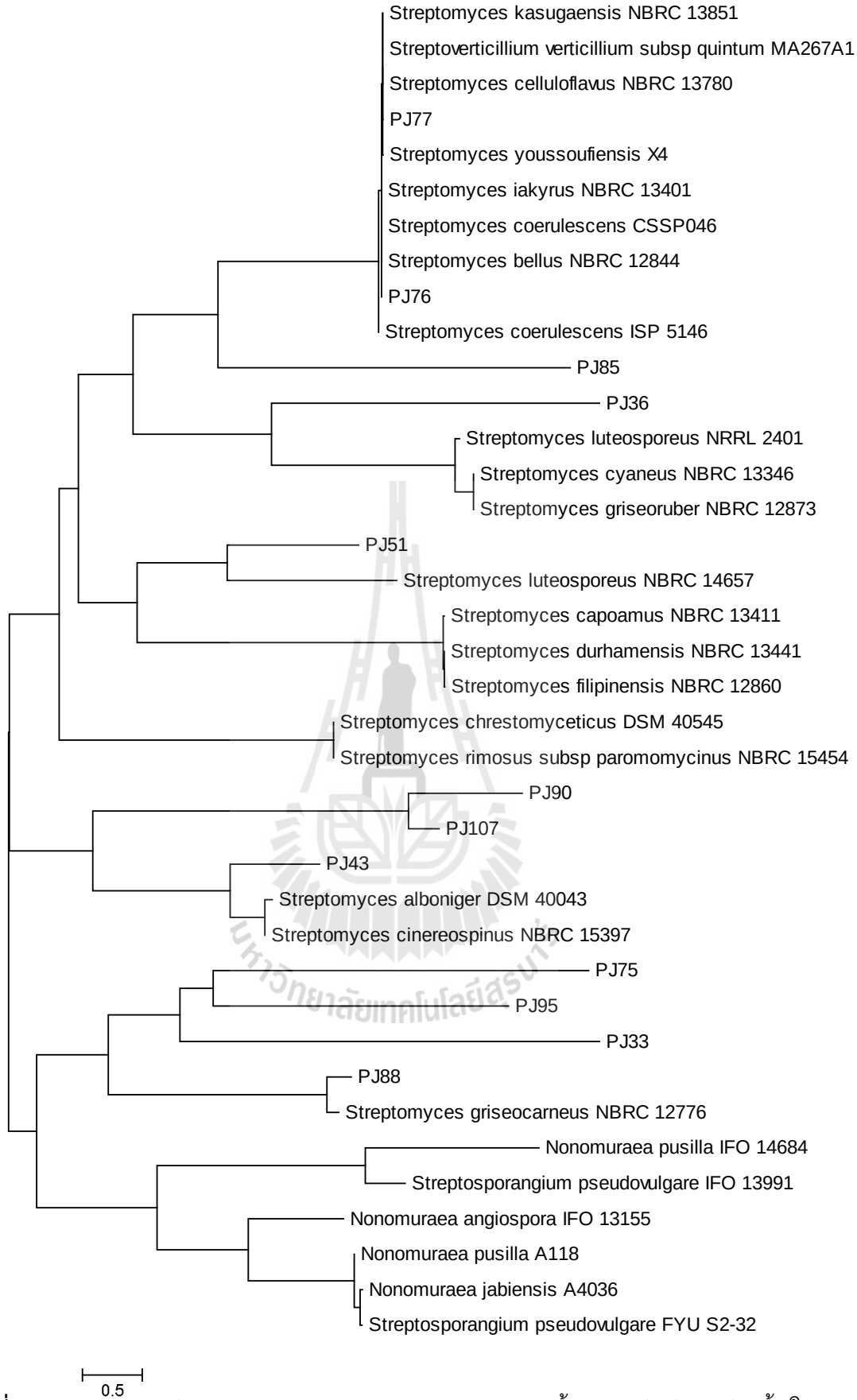
สำหรับผลการต้านเชื้อยีสต์ของเชื้อทั้ง 12 isolates พบว่า ส่วนใหญ่จะสามารถสร้างสารมาต้านการเจริญของยีสต์ได้ ได้แก่ PJ36 PJ43 PJ 51 PJ75 PJ76 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107 มีเพียงเชื้อ PJ33 และ PJ77 ที่ไม่มีความสามารถในการต้านเชื้อยีสต์ที่ใช้ทดสอบสายพันธุ์ใดได้เลย

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

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

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

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



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

บทที่ 4
สรุปการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

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

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

คุณลักษณะเด่นของเชื้อที่แยกได้จากดินในแถบนี้ คือ สามารถเจริญและสร้างสารปฏิชีวนะได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าเชื้อส่วนใหญ่ในกลุ่ม Actinomycetes ที่เคยมีการรายงานไว้ เชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวะนะได้ส่วนใหญ่ จะสร้างสารเหล่านี้ออกมาต้านเชื้อได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 28 ถึง 30 องศาเซลเซียส เป็นผลให้การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นในการที่จะรักษาระดับอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการผลิต ส่งผลให้สารปฏิชีวนะมีราคาสูงตามไปด้วย อีกทั้งสารปฏิชีวนะที่ได้มาจากเชื้อกลุ่มที่เจริญและสร้างสารเหล่านี้ได้ดีที่อุณหภูมิสูงน่าจะเก็บรักษาได้ง่ายและมีอายุการใช้งานยาวนานขึ้น เพราะสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่มักจะเสื่อมสภาพได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง

ดังนั้นการนำเชื้อกลุ่มนี้ไปศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนายาต้านจุลชีพ จึงเป็นหนทางหนึ่งที่น่าจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการพัฒนายาเพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อต่อไป

บรรณานุกรม

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2549) จุลชีววิทยาทางดิน. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์. 280 หน้า

Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Dean D.H. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 62:807–813.

Feitelson, J.S., Payne, J. and Kim, L. (1992) *Bacillus thuringiensis*: insect and beyond. Biol Technol. 10:271–275.

Gill, S.S., Cowles, E.A. and Pietrantonio, P.V. (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu Rev Entomol. 37:615–636.

Hassink, J., Lebbink, G. and Van Veen J.A. (1991) Microbial biomass and activity of a reclaimed–polder soil under a conventional or a reduced–input farming system. Soil Biol Biochem. 23:507–513.

Hume, D.J. and Blair, D.H. (1992) Effect of numbers of *Bradyrhizobium japonicum* applied in commercial inoculants on soybean yield in Ontario. Can J Microbiol. 38:588–593.

Knowles, B.H. (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* insecticidal delta–endotoxins. Adv Insect Physiol. 24:276–307.

Monciardini, P., Sosio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C. and Donadio, S. (2002) New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. FEMS Microbiology Ecology. 42: 419–429.

Schnepf, E., Crickmore, N., Rie, J.V., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 62:775–806.

Thompson, M.A., Schnepf, H.E. and Feitelson, J.S. (1995) Structure, function, and engineering of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: Setlow JK, editor. Genetic engineering: principles and methods. New York: Plenum Press. p. 99–117.

Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. and Bhole, B.D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. Arch Microbiol. 176:386–90.

Whitman, W.B.; Goodfellow, M.; Kämpfer, P.; Busse, H.-J.; Trujillo, M.E.; Ludwig, W.; Suzuki, K.-i.; Parte, A. Eds. (2012) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 5, 2d ed. New York, Springer.

Williams, S.T. and Vickers, J.C. (1986) The ecology of antibiotic production. Microb Ecol. 12:43–52.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ภาพผนวก ก.

ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อ PJ33 PJ36 PJ43 PJ51 PJ75 PJ76 PJ77 PJ85 PJ88 PJ90 PJ95 และ PJ107

>PJ33

ATGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCAA
CTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACAGGCTTTTTGAGATTCGCTCCACC
TCGCGGTATCGCTGCTCATTGTACCTGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGA
CTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTTCTGTGAGTCCCCATCACCCCGAAGGG
CATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG
ACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGGCACCATCTCTGATGCTTTCCGGTGTATGT
CAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGT
CAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACC
GACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTAGTTCCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG
TTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCT
CCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCCTGCCCGTA
TCGACTGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTA
CGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCG
CTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCC
CTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
CTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCC

>PJ36

TGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGG
CTTTTTGAGATTCGCTCCACCTCGCGGTATCGCAGCTCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCC
AAGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTGTG
AGTCCCCATCACCCCNGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGACCCTGT
CTCCAGGGTTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTC
CGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAAC
TTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACGACGTGGAATGTCGCCCACACCTAGTTCCCAACGTTTACGGCGTG
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCCAGAGAT
CCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCT
ACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGTGA
CAAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTG
CTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTGCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTT
ACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAATATTCCC
CACTG

>PJ43

GGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC
AGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGT
CGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGNTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGG
AGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGAT
CTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAA
GTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAKCGG
CGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACMCTY
MGAGAYMGGTKCCCCCTTGTGGTCGGWGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCSTGAGATG
TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACT
CACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCT
TGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAA

AGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
CAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA

>PJ51

GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAGTGGG
CGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGA
CGAAGTTGACGTGTACCTGCACAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GCGCCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGASCTCGTAGGTGSCTGGTCGCGTCTGCCGKGAAAGC
CCTGCAGCTTAACTGCGGGTCYGCGGKGGATACGGSCCGGSTWGAGGTMKGYAGGGGSARGTGGARTTC
CTGGTGTAGCGKYGAMATGCGCASRKAKSTTAGGARGAAMACMRGTGGCSMAGGYGGSYKGCCTGSCG
CCTTACCTGWYGCTTACGAGGAGCGAWRGMKKRGGRMKCRMCTACAGSAYYMSMCTASSMWGSWMG
TCCWYSCTGYWRRCTGTWSGRCSCWASSWGATSKGAGATCWTCCACGATCTCCGTGCMKSAGCYAACG
CAWTAAGCGCAGCCCKCATGCTGRSRWGWMCRGAGCCGMWMSSCTMWWGGACTSMMMKGMMKYG
ACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTT
GACATCACCCGGAAAGCTCTGGAGACAGGGCCCTCTTCGGACTGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCTCCATGTTGCCAGCACGC
CCTTCGGGGTGGTGGGGACTCATGGGGGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTG
AGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGG
AGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC

>PJ75

TTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGA
TCTGCGATTACTAGCAACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACAGGCTTT
TTGAGATTCGCTCCACCTCACGGTTTCGCAGCTCATTGTACCTGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGA
CATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTCCTGTGAGTC
CCCATCACCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAWC
ATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGACCATCTCT
GGCCGTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCT
GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACTTAA
TGCGTTAGCTGCGGCACCGACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTAGTTCCCACCGTTTACGGCGTGGACT
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGC
CTTCGCCACCGGTGTTCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCA

CACTCTAGCTAGCCCGTATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACACCCGACGTGACAAG
CCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGG
CACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAA
CCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTG
CTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCG

>PJ76

CCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC
GGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAG
TTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
GAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCT
AACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCC
GCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACC
GGAAACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGT
GCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGC
CCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGC
GAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAG
TAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGA
A

>PJ77

CCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC
GGCTTGTTGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAG
TTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
GAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCT
AACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCC
GCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACC
GGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGG
TGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATG
CCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAG
CGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTA
GTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACG

>PJ85

TTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATT
ACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTC
GCTCCACCTCACGGTATCGCAGCTCTTTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGG
GCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTCCTGTGAGTCCCCATCAC
CCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA
CACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGCCTGTCTCCAGACGTTTCC
GGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGMATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCG
GGCCCCCGTCAATTCCTYTGAGTTTTAGCCTTGMGKCCGTACTCCCCMGGCGGSGAACTTAAYGCGTTAG
CTGCGGCACCGRYGAMGTGGAATGTCGCCAACACMTAGTTCCCACCGTYTACGGCGTGGACTACCAGGG
TATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCC
ACCGGTGTTCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTA
GCTAGCCCGTATCGACTGCAGACCCGAGGTTAAGCCTCGGGCTTTCACAATCGACGTGACAAGCCGCCTA
CGAGCTCTTTACGCCC

>PJ88

TCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCG
TCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTYTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGG
AGATCGNAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGAT
CTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAA
GTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAG
CGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCGCT
AGAGATAGTGCCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTKCATGGCTGNTCGNCAGCTCGTGTCGTGAGATG
TTGGGTTAAGTNCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCTGTGTTGCNAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGA
CTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCACGCCCCTTATGT
CTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGGGA

>PJ90

ACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGC
GACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCA
CCTCACGGTATCGCAGCTCTTTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGAT
GACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTCCTGTGAGTCCCCATCACCCCNGAA
GGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG
CTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGCCTGTCTCCAGACGTTTCCGGTGTA
TGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCC
CGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACTTAATGCGTTAGCTGCGGC
ACCGACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTAGTTCCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT
CCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGT
TCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCTAGCC
CGTATCGACTGCAGACCCGAGGTTAAGCCTCGGGCTTTCACAATCGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTC
TTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCG
GCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTC
ATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG
GAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCC

>PJ95

GTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACT
AGCAACTCCAACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCT
CCACCTCGCGGTATCGCAGCTCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCA
TGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTGTGAGTCCCCATCACCCC
GAAGGGCATGCTGGCAACACAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC
GAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGGCACCATCTCTGATGCTTTCCGGT
GTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGC
GGCACGGACCACGTGGAATGTGGCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT
AATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGG
TGTTCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTG
CCCGTATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGCGACAAGCCGCCTACGAGC
TCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGC
CGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCG
TCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGT
AGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGC

>PJ107

ACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGC
GACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCA
CCTCACGGTATCGCAGCTCTTTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGAT
GACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTCCTGTGAGTCCCCATCACCCCGAAG
GGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC
TGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGCCTGTCTCCAGACGTTTCCGGTGTAT
GTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCC
GTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACTTAATGCGTTAGCTGCGGCA
CCGACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTAGTTCCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC
CTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTT
CCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCTAGCCC
GTATCGACTGCAGACCCGAGGTTAAGCCTCGGGCTTTCACAATCGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTCT
TTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGG

CGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCA
TCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGC

ภาพผนวก ข.

งานวิจัยจากโครงการนี้ที่มีการเผยแพร่ในงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ

The 10 th Young Scientist Seminar

Establishment of International Research Network for Tropical Bioresources and Their Utilization

NOVEMBER 16 th-17 th , 2014

SEMINAR PARK, YAMAGUCHI, JAPAN

SUPPORTED BY
YAMAGUCHI UNIVERSITY

Minimum Inhibitory Concentration of Galangal Rhizome Mixed with Straw Ash on Comparative with Fluconazole and Itraconazole on Growth of *Pityrosporum ovale* 34
Permara Ayu Kamila, Erna Sulistyowati, Novi Arfarita

Investigation of cell motility by flagellum of *Pelotomaculum thermopropionicum* SI 35
Mutsumi Goda, Manami Inoue, Tomoyuki Kosaka and Mamoru Yamada

Induced Mutation of *Zymomonas mobilis* by Ethyl Methane Sulfonate (EMS) 36
Jatupat Samappito and Pornthap Thanonkeo

Relation between thermal adaptation and reactive oxygen species generation in *Corynebacterium glutamicum* 37
Ryutaro Murata, Yasutaka Ohnishi, Nawarat Nantapong, Minenosuke Matsutani, Naoya Kataoka, Toshiharu Yakushi and Kazunobu Mutsushita

Comprehensive identification of human N-myristoylated proteins using Swiss-Prot protein database and cell-free protein synthesis system 38
Haruna Iwata

Group 3

Isolation of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* 39
Mitsunori Kodama, Kazunori Sasaki, Asako Yamada and Shin-ichi Ito

Effect of modified atmosphere packaging and oxygen absorber used on storage time of Khanom Jaak 40
Boondarika Sumana, Wannasiri Hirunkerd, Arnon Aemrod, Nucharin Khomsri and Patwinan Suwasri

Studies on dihydroxyacetone kinase of *Gluconobacter* spp. 41
Kaori Hirata, Minenosuke Matsutani, Naoya Kataoka, Toshiharu Yakushi, Kazunobu Matsushita

Genetic analysis of canine enteric viruses from dogs with diarrhea in Vietnam 42
Nguyen Van Dung, Junko Suzuki, Yutaka Terada, Keita Noguchi, Hiroshi Shimoda, Masami Mochizuki, Ken Maeda

Production of L-lactic acid by metabolic engineering in thermotolerant *Zymomonas mobilis* 43
Katsuaki Emoto, Ui Kamatsu, Akira Irie, Yasuyuki Nakajima, Naoko Fujimoto, Masayuki Murata, Tomoyuki Kosaka, and MamoruYamada

Evaluation of antimicrobial activity of Actinomycetes isolated from soil against opportunistic pathogens 44
Panjamaphon Chanthasena and Nawarat Nantapong

Characteristics of a GASP-acquiring mutant and visualization of cell population shifts in long-term stationary phase 45
Tomomi Masuda, Junpei Kawaguchi, Tomoyuki Kosaka and Mamoru Yamada

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

Panjamaphon Chanthasena[1] and Nawarat Nantapong[2]
[1] *Phamacology, Faculty of Science, Suranaree University of Technology*
[2] *Microbiology, Faculty of Science, Suranaree University of Technology*

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

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