รหัสโครงการ SUT1-104-56-24-21

รายงานการวิจัย

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

Biodiversity of Soil Fungi and Their Anti-microbial Substances 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 SUT1-104-56-24-21

รายงานการวิจัย

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

Biodiversity of Soil Fungi and Their Anti-microbial Substances 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

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวรัตน์ นันทพงษ์

สาขาวิชาปรีคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2563

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวพิมพา ขอวางกลาง นักศึกษาปริญญาโท ที่ให้ความช่วยเหลือ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ และขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

โรคติดเชื้อจากเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสจัดเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข โดยเฉพาะในแหล่งชุมชนที่มีประชากรอาศัยอยู่อย่างหนาแน่น ทั้งนี้เชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสหลายสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นเชื้อดื้อยา ดังนั้นการวิจัยเพื่อค้นหาสารปฏิชีวนะตัวใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพต้านเชื้อก่อโรค โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ดื้อยา จึงมีความสำคัญ เชื้อราในดินหลายสปีชีย์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ และ penicillin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะตัวแรกก็แยกได้จากเชื้อราในจีนัส *Penicillium* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายของเชื้อราจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะได้

เชื้อราที่แยกจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 16 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารต้านเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่ใช้ในการทดสอบได้ จากผลการวิเคราะห์ชิ้นส่วน Internal Transcribed Spacer (ITS) พบว่า เชื้อที่แยกได้ 10 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในจีนัส *Aspergillus* เชื้อ 3 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในจีนัส *Penicillium* เชื้อ 2 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในจีนัส *Talaromyces* และเชื้อ 1 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในจีนัส *Clonostachys* เชื้อที่แยกได้จากดินเหล่านี้ มีทั้งกลุ่มที่สร้างสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติเป็น narrow spectrum ที่ออกฤทธิ์เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกหรือยีสต์ ได้แก่ PKF6, PKF38, PKF59, PKF60, PKF61, PKF116, PKF124, PKF125, PKF127 และ PKF145 และกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็น broad spectrum ที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ ได้แก่ PKF77, PKF105, PKF121 และ PKF161 นอกจากนี้ยังมีบางสายพันธุ์ที่ออกฤทธิ์ต้านได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ ได้แก่ PKF104 และ PKF152 ทั้งนี้ยังพบเชื้อราบางสายพันธุ์ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน (MRSA) ได้ ได้แก่ PKF104, PKF121, PKF124, PKF125, PKF127 และ PKF161 ดังนั้นการนำเชื้อกลุ่มนี้ไปศึกษาวิจัยอาจจะนำไปสู่การพัฒนายาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพได้ต่อไป

คำสำคัญ: Soil fungi, Antibiotics, Antibiotic resistant bacteria

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. Several species of soil fungi have shown to produce antibiotics. Actually, the first known antibiotic, penicillin, is produced by fungi of the genus *Penicillium*. The present study attempts to study the diversity of antibiotics producing fungal strains isolated from soil in Suranaree University of Technology.

Sixteen fungal antibiotic producing strains isolated from soil in Suranaree University of Technology were active against test opportunistic pathogens. Based on Internal Transcribed Spacer (ITS) analysis, ten fungal isolates were close affiliated with the genus *Aspergillus*, three isolates were close to *Penicillium*, two isolates showed highest similarity to *Talaromyces* and one isolate was similar to *Clonostachys*. Some fungal isolates showed narrow antimicrobial spectrum activities against either Gram-positive bacteria or yeasts, which were PKF6, PKF38, PKF59, PKF60, PKF61, PKF116, PKF124, PKF125, PKF127 and PKF145. Other isolates exhibited broad antimicrobial spectrum against Gram-positive bacteria and yeasts which were PKF77, PKF105, PKF121 and PKF161. In addition, two isolates, PKF104 and PKF152, were active against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and yeasts. Several fungal isolates also showed antimicrobial activity against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) which were PKF104, PKF121, PKF124, PKF125, PKF127 and PKF161. Thus, the study of these soil isolates could lead to the development of new potent antimicrobial drugs.

Keywords: Soil fungi, Antibiotics, Antibiotic resistant bacteria

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญรูป..... ฉ
สารบัญตาราง..... ช
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 4
1.4 การทบทวนวรรณกรรม..... 5
1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย..... 9
1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 9
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 10
2.1 พื้นที่ที่ทำการศึกษาเก็บตัวอย่าง..... 10
2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ..... 10
2.3 สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค..... 10
2.4 การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน..... 11
2.5 ทดสอบฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อราที่แยกได้จากดิน..... 11
2.6 การสกัดโครโมโซมของเชื้อรา 13
2.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา..... 14
2.8 การจำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินด้วยวิธีทางโมเลกุล..... 14
2.9 การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ..... 15

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย..... 16

3.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อราที่มีศักยภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะจากตัวอย่างดิน..... 16

3.2 การทดสอบศักยภาพของเชื้อราในการสร้างสารปฏิชีวนะ..... 22

3.3 การจำแนกชนิดของเชื้อรา..... 25

3.4 การศึกษาความสัมพันธ์และสายวิวัฒนาการของเชื้อรา 16 สายพันธุ์ด้วย ITS..... 30

บทที่ 4 สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 33

4.1 สรุปการวิจัย..... 33

4.2 ข้อเสนอแนะ..... 34

บรรณานุกรม..... 35

ภาคผนวก..... 41

ภาคผนวก ก. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น ITS ของเชื้อ PKF6, PKF38, PK59, PK60, PK61, PKF77, PKF104, PKF105, PKF116, PKF121, PKF124, PKF125, PKF127, PKF145, PKF152 และ PK161..... 42

ภาคผนวก ข. งานวิจัยจากโครงการนี้ที่มีการเผยแพร่ในงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ..... 48

ประวัตินักวิจัย..... 54

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 ป่าเต็งรังภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี..... 3

รูปที่ 2.1 การทดสอบฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อรา..... 12

รูปที่ 3.1 แสดงส่วนของ Internal Transcribed Spacer (ITS) บริเวณ rRNA ยีน โดยส่วนลูกศร แสดงตำแหน่งของ primers ITS4 และ ITS5..... 25

รูปที่ 3.2 แผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Neighbor-joining ของเชื้อราสายพันธุ์ PKF กับเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank, EzFungi และ UNITE..... 32

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MYA ของเชื้อรา 16 สายพันธุ์..... 17

ตารางที่ 3.2 ผลการทดสอบการสร้างสารต้านแบคทีเรียของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์..... 23

ตารางที่ 3.3 ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์บนส่วน ITS ของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ กับเชื้อราในฐานข้อมูล GenBank, EzFungi และ UNITE 27

ตารางที่ 3.4 การจำแนกเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ ในระดับ genus และ species โดยวิเคราะห์จากผลการ BLAST ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank, EzFungi และ UNITE 30

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 และสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ 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 การศึกษาความหลากหลายของเชื้อราในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยจึงมีความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนไปกว่าการศึกษาสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เนื่องจากเชื้อรามีความสำคัญต่อการหมุนเวียนธาตุอาหารต่าง ๆ ในระบบนิเวศน์ บางชนิดสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ สี และเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ทางด้านการเกษตรและอุตสาหกรรม

พื้นที่ป่าโดยรอบบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา พบว่าเป็นป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณอยู่เป็นบริเวณกว้าง (รูปที่ 1.1) ซึ่งเป็นไปได้ว่าพื้นที่เหล่านี้น่าจะมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อย่างไรก็ดียังไม่เคยมีกลุ่มนักวิจัยเข้าไปสำรวจและเก็บข้อมูลสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้อย่างจริงจัง คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาและเก็บรวบรวมข้อมูลสายพันธุ์ของเชื้อราในดินที่พบในบริเวณนี้ โดยคาดหวังว่าการศึกษาครั้งนี้น่าจะมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราในดิน และเนื่องจากเชื้อราในดิน จัดเป็นแหล่งของสารต้านจุลชีพที่สำคัญ จึงมีโอกาสที่จะพบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะที่น่าสนใจ ซึ่งอาจนำไปพัฒนาต่อได้ในอนาคต ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ทางด้านชนิดและความหลากหลายของเชื้อราและสารต้านจุลชีพจากรา ที่พบในดินบริเวณป่ารอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

รูปที่ 1.1 ป่าเต็งรังภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ในพื้นที่ป่าโดยรอบของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
2. เพื่อแยกเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน จากพื้นที่ป่าโดยรอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
3. เพื่อศึกษาชนิดและความหลากหลายของเชื้อราในดินที่แยกได้ และเก็บรวบรวมไว้เป็น culture collection
4. เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์
5. เพื่อตรวจหาสารต้านจุลินทรีย์ที่เชื้อราสร้าง
6. เพื่อรวบรวมและเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดและความหลากหลายของเชื้อราในดินที่พบในพื้นที่ป่าโดยรอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. สำรวจ เก็บตัวอย่าง และแยกเชื้อราจากดิน
2. จำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดิน และทำการจัดหมวดหมู่
3. นำเชื้อราที่แยกได้ไปคัดเลือกเพื่อหาเชื้อราที่มีศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.4 การทบทวนวรรณกรรม

ดินจัดเป็นแหล่งที่อยู่ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบอยู่ทั่วไปในดิน ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่าย โปรโตซัว รวมถึงไวรัส ดินที่อุดมสมบูรณ์จะพบจุลินทรีย์ในดินเหล่านี้ได้มากถึงพันล้านเซลล์ต่อดินหนึ่งกรัม (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2006) จุลินทรีย์ในดินเหล่านี้จะทำหน้าที่ในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ต่าง ๆ และทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุและสารอาหาร ดังนั้นถ้ามีจุลินทรีย์ปริมาณสูงในดินจะเป็นการบ่งบอกถึงความสมบูรณ์ของดินนั่นเอง (Hassink, Lebbink, and Van Veen, 1991)

เชื้อราจะพบมากบริเวณหน้าดิน ที่มีอากาศถ่ายเท และจะพบมากในบริเวณที่ดินเป็นกรด เชื้อราที่พบในดินมีปริมาณน้อยหากนำไปเทียบกับแบคทีเรีย (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2006) เราสามารถพบเชื้อราได้เกือบทุกชนิดในดิน ราเหล่านี้มีความสำคัญต่อการหมุนเวียนของสารต่าง ๆ ภายในดิน ช่วยส่งเสริมให้พืชเจริญเติบโตได้ดี (Christensen, 1989; นิ่มรัตน์ 2006) เชื้อราที่พบในดินสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม โดยใช้เกณฑ์การได้รับสารอาหารและการสร้างพลังงาน (United States. Natural Resources Conservation Service [NRCS], 1999) ได้แก่ Decomposers (ย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์) Mutualists (อยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นแบบพึ่งพา) และ Pathogens (ก่อโรค) โดยเชื้อราในกลุ่มที่ย่อยซากพืชซากสัตว์ส่วนใหญ่จะสามารถย่อยสลายสารประกอบคาร์บอนที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น lignin และ cellulose ที่ส่วนใหญ่พบเป็นองค์ประกอบของซากพืช ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เซลล์ของเชื้อราเอง หรือเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เช่น แบคทีเรีย ที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้น สามารถนำเข้าไปใช้ภายในเซลล์ได้ (United States. Natural Resources Conservation Service [NRCS], 1999) ส่วนเชื้อราที่เป็นพวก Mutualists ตัวที่พบได้บ่อยและเป็นที่รู้จักกันทั่วไปคือ Mycorrhiza ซึ่งพบอาศัยอยู่กับรากพืช โดยราในกลุ่มนี้จะสร้างเส้นใยแทงเข้าไปเจริญในรากพืช มีการรับสารอาหารบางอย่างจากพืช ในขณะเดียวกันก็จะช่วยละลายแร่ธาตุและสารอาหารบางชนิดจากดินให้พืชนำไปใช้ได้ (United States. Natural Resources Conservation Service [NRCS], 1999) ในกลุ่มของเชื้อราก่อโรคที่พบในดิน อาจพบเป็นกลุ่มที่ก่อโรคในพืช โดยสร้างเส้นใยเข้าไปเจริญในต้นพืช ใช้เนื้อเยื่อพืชเป็นแหล่งของสารอาหาร ทำให้พืชขาดสารอาหารและตายในที่สุด อย่างไรก็ดี เชื้อราก่อโรคที่พบในดินบางชนิด จะเข้าไปเจริญเป็นปรสิตอยู่ใน หนอน และ/หรือ แมลง ศัตรูพืช ซึ่งในกรณีนี้เชื้อราจะช่วยกำจัดแมงศัตรูพืช ทำให้พืช

ไม่ถูกทำลาย นอกจากนี้ ราบางชนิดยังสามารถสร้างสารบางอย่างมาทำลายเซลล์ของแบคทีเรียในดิน เป็นการควบคุมประชากรของแบคทีเรีย ไม่ให้มีมากจนเกินไป (United States. Natural Resources Conservation Service [NRCS], 1999)

จากคุณสมบัติต่าง ๆ ของเชื้อราที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เช่น ราสามารถย่อยสลายโมเลกุลคาร์บอนเชิงซ้อนได้ หรือ ความสามารถของราในการทำลาย พืช แมลง และแบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่าเชื้อราต้องมีการสร้างเอนไซม์ หรือ สารบางอย่างที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ โดยเอนไซม์ หรือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบบ่อยในเชื้อรา ได้แก่ เอนไซม์ cellulase, amylase, lipase และ protease และสารปฏิชีวนะที่สำคัญ ๆ เช่น penicillin ซึ่งเอนไซม์และสารปฏิชีวนะเหล่านี้ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในงานด้านต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง

อุตสาหกรรมหลายประเภทจำเป็นต้องใช้เอนไซม์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิต และ/หรือ เพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ ตัวอย่างของเอนไซม์ที่นำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรม ได้แก่ เอนไซม์ lipase, cellulase, xylanase, amylase และ protease ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้พบได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์หลายชนิดรวมถึงเชื้อรา การผลิตเอนไซม์จากเชื้อราเป็นแนวทางหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเชื้อราเลี้ยงได้ง่ายและให้ผลผลิตเอนไซม์สูง

เอนไซม์ lipase ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ผลิตผงซักฟอก ผลิตโกโก้บัตเตอร์ ใช้ในทางเภสัชกรรม เช่น เป็นส่วนประกอบในยาช่วยย่อย (Costa & Peralta, 1999) เชื้อราที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ lipase ที่สำคัญ ๆ ได้แก่ *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Humicola* (Ruban, 1972; Ghosh, Saxena, Gupta, Yadav, and Davidson, 1996; Costa & Peralta, 1999) สำหรับเอนไซม์ cellulase ก็นำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อาหาร เครื่องดื่ม การเกษตร และอุตสาหกรรมกระดาษและสิ่งทอ เป็นต้น (Tyndall, 1992; Kumar, Yoon, and Purtell, 1997) ตัวอย่างของเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ cellulase ได้ เช่น *Aspergillus*, *Acremonium*, *Phanerochaete* และ *Leucocoprinus* (Klyosov, 1990; Bacci, Anversa, and Pagnocca, 1995; Tomme, Warren, and Gilkes, 1995; Baldrian & Valaskova, 2008) เอนไซม์ xylanase ที่มีคุณสมบัติในการย่อย xylan นำมาใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ ผลิตอาหารสัตว์ ทำขนมปัง ผลิตเครื่องดื่มจำพวกไวน์และน้ำผลไม้ รวมไปถึงการผลิต xylitol (Polizeli et al.,

2005) ตัวอย่างของเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ xylanase ได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* และ *Gliocladium* (Betini et al., 2009; Antoine, Jacqueline, and Thonart, 2010; Mitra, Banerjee, Gachhui, and Mukherjee, 2011; Zhou, Zhu, Katrolia, Jiang, 2011) เอนไซม์ amylase นำมาใช้ในกระบวนการย่อยสลายแป้ง ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและการผลิตผงซักฟอก เป็นต้น (Augustin, Zemek, and Fassatiová, 1981) ส่วนเอนไซม์ protease นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา ฟอกหนัง และการผลิตผงซักฟอก (Wang, Vespa, and Hesseltine, 1974; Haq & Mukhtar 2004; Macchione, Merheb, Gomes, and Silva, 2008) นอกจากนี้เอนไซม์ lipase, amylase และ protease จากเชื้อรายังสามารถนำมาใช้บำบัดน้ำเสียและขยะในชุมชนได้อีกด้วย (ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล, และสมใจ ศิริโภค, 2541)

เชื้อรายังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์จำเพาะบางชนิดออกมาย่อยสลายสารพิษได้ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการ Bioremediation เพื่อกำจัดสารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ (Ding, Cong et al. 2008) มีการรายงานที่พบว่าเชื้อรา *Phanerochaete chrysosporium* สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม ligninolytic เช่น lignin peroxidase (LiP) และ manganese-dependent peroxidase (MnP) ออกมาย่อยสลายสารพิษจำพวก Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ซึ่งสารในกลุ่มนี้อาจมีปะปนอยู่ในสิ่งแวดล้อมจากการปล่อยของเสียของโรงงานอุตสาหกรรม หรือ การเผาไหม้ของน้ำมันเชื้อเพลิง PAHs มีความเป็นพิษสูง อาจเป็นสารก่อมะเร็ง และ/หรือ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตได้ (Cerniglia, 1992; Juhasz & Naidu, 2000; Ding, Cong, Zhou, and Gao, 2008)

เนื่องจากอัตราการเติบโตของภาคอุตสาหกรรมในปัจจุบันเพิ่มมากขึ้นทุกปี ทำให้ความต้องการในการใช้เอนไซม์เพิ่มขึ้นตามไปด้วย และเพื่อสนองตอบความต้องการของภาคอุตสาหกรรม จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อหาแหล่งของเอนไซม์ใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

ปัจจุบันพบว่า หนึ่งในปัญหาหลัก ๆ ที่สำคัญและกำลังได้รับความสนใจทางด้านการแพทย์และสาธารณสุข คือ ปัญหาการเกิดของเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยา ซึ่งทำให้การรักษาด้วยยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันไม่ได้ผล จึงมีความต้องการที่จะค้นคว้าหายาต้านจุลินทรีย์ตัวใหม่ ๆ มาใช้รักษาโรคติดเชื้อที่ดื้อยาเหล่านี้ จากการศึกษาวิจัยพบว่าเชื้อราหลายชนิดที่พบในตัวอย่างดินสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ (Jefferys,

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Brian, Hemming, and Lowe, 1953) และราบางชนิด เช่น *Aspergillus terreus* สามารถสร้าง terrecyclic acid A (TCA) ที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้ (Turbyville, Wijeratne, Whitesell, and Gunatilaka, 2005)

มีงานวิจัยมากมายที่กล่าวถึงความสามารถของเชื้อราในการผลิตสารต้านจุลชีพ ยกตัวอย่างเช่น *Aspergillus terreus* var. *aureus* สามารถผลิตสารเมแทบอไลท์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและแบคทีเรียได้ อย่างน้อย 6 ชนิด (Inamori et al., 1983) เชื้อรา *Aspergillus terreus* Thorn var. *terreus* ที่แยกได้จากดินในประเทศเอควาดอร์ มีความสามารถในการสร้างสารอนุพันธ์ของ butyrolactone I ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ รวมถึงเชื้อรา บางชนิดได้ (Cazar, Schmeda-Hirschmann, and Astudillo, 2005) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการแยกเชื้อราจากดินในจังหวัดหนึ่งของประเทศอินเดีย (Marudhu Ramachandran et al., 2007) และประเทศบราซิล (Takahashi et al., 2008) พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่ที่พบสามารถสร้างสารต้านราและแบคทีเรียที่นำมาใช้ทดสอบได้

เนื่องจากความรู้และเทคนิควิธีการทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมีการพัฒนาไปมาก ทำให้มีการตัดต่อยีนหลาย ๆ ชนิดจากเชื้อราเข้าสู่จุลินทรีย์ชนิดอื่น เพื่อที่จะนำจุลินทรีย์ที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์เหล่านั้นไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป เช่น มีการตัดต่อยีนที่สร้างเอนไซม์ xylanase จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* (BCC129) เข้าสู่ยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อที่จะนำยีสต์กลายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ xylanase ได้ ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร หรือ กระดาษ เนื่องจากการใช้เชื้อราโดยตรงอาจทำให้มีการปนเปื้อนของสารพิษจากรา (mycotoxins) ได้ (Chantasingh, Pootanakit, Champreda, Kanokratana, and Eurwilaichitr, 2006)

จากตัวอย่างของข้อมูลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น เป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้นักวิจัยหลายกลุ่มมีความสนใจที่จะศึกษา ค้นคว้า เพื่อหาสายพันธุ์ของราสำหรับใช้เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ในด้านต่าง ๆ รวมถึงใช้เป็นแหล่งของสารพันธุกรรมในกระบวนการถ่ายทอดยีน เพื่อที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ สำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวางต่อไป

ความหลากหลายของชนิดของราที่พบในดินทั่วโลกมีอยู่ประมาณ 75,000 สปีชี่ย์ (Finlay & Clay, 2007) ซึ่งเชื้อราที่พบในดินของประเทศไทยที่มีรายงานไว้จนถึงปี 1998 มีจำนวนเพียง 95 สปีชี่ย์เท่านั้น (Jones, Tantichareon, and Hyde, 2004) และเนื่องด้วยการแยกเชื้อราจากดินเพื่อนำมาศึกษามีข้อจำกัดหลาย ๆ อย่าง ดังนั้นปริมาณของเชื้อราที่มีอยู่จริง น่าจะมีจำนวนมากกว่าที่มีการค้นพบและได้รายงานไว้ (Bridge & Spooner, 2001; Anderson & Cairney, 2004) จึงมีการคาดการณ์กันว่าประเทศไทยคงมีเชื้อราอีกหลายชนิดที่ยังไม่เคยพบและนำมาศึกษา (Jones, Tantichareon, and Hyde, 2004) ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อคัดแยกเชื้อราจากดินโดยวิธีต่าง ๆ จึงมีความจำเป็นและเป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราในดินบริเวณที่ยังไม่เคยมีการสำรวจหรือเก็บข้อมูลอย่างจริงจัง ดังเช่นพื้นที่ป่าของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา อาจนำไปสู่การพบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ หรือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางอย่างได้ ซึ่งจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเชื้อราเหล่านี้ในด้านต่าง ๆ ได้ต่อไป

1.5 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินส่วนใหญ่จะช่วยในการหมุนเวียนของแร่ธาตุและสารอาหารภายในดิน นอกจากนี้เส้นใยรายังช่วยทำให้อนุภาคของดินในยึดเกาะกันได้ดีอีกด้วย เชื้อราในดินจะมีความสามารถในการเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ไปเป็นสารประกอบอนินทรีย์สำหรับให้พืชและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ นำไปใช้ได้ เนื่องจากเชื้อราที่พบในดินมีความหลากหลายมากทั้งชนิดและปริมาณ ดังนั้นการศึกษาเพื่อระบุชนิดและกลุ่มของเชื้อราที่พบในดินบริเวณที่ยังไม่เคยทำการสำรวจจึงมีความสำคัญ เนื่องจากข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับพัฒนาวิทยาศาสตร์แขนงอื่น ๆ ได้ต่อไป

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ทราบชนิด ความหลากหลาย และการแพร่กระจายของเชื้อราที่พบในดินบริเวณพื้นที่ป่ารอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. สร้างฐานข้อมูลของเชื้อราที่พบในดินบริเวณพื้นที่ป่ารอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3. คาดว่าจะได้เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลชีพ

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 พื้นที่ที่ทำการศึกษาเก็บตัวอย่าง

พื้นที่ป่าเต็งรังภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินคือ Malt Yeast extract agar (MY agar) ที่มีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ Peptone 5, Yeast extract 3, Malt extract 3, Glucose 10 และ agar 15 สำหรับอาหารที่ใช้สำหรับทดสอบความสามารถของเชื้อราในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ คือ Mueller-Hinton agar (MHA) ที่มีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ Casein hydrolysate 17.5, Beef extract 2.0, แป้ง 1.5 และ agar 15 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดจะผ่านการทำปลอดเชื้อด้วยความร้อนชื้น 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-30 นาที

2.3 สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

จุลินทรีย์ก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่ใช้ในการทดลองเป็นสายพันธุ์ที่ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(TISTR) ประกอบไปด้วย *Staphylococcus aureus* TISTR1466, *Staphylococcus epidermidis* TISTR518, *Bacillus subtilis* TISTR008, *Bacillus cereus* TISTR687, *Escherichia coli* TISTR780, *Enterobacter aerogenes* TISTR1540, *Salmonella typhi* TISTR292, *Proteus mirabilis* TISTR100, *Candida albicans* TISTR5779, *Candida tropicalis* TISTR5174, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5049 และสายพันธุ์ของเชื้อดื้อยาที่ใช้ในการทดลองเป็นสายพันธุ์ที่ซื้อมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMST) ประเทศไทย ได้แก่ เชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST20654 (MRSA)

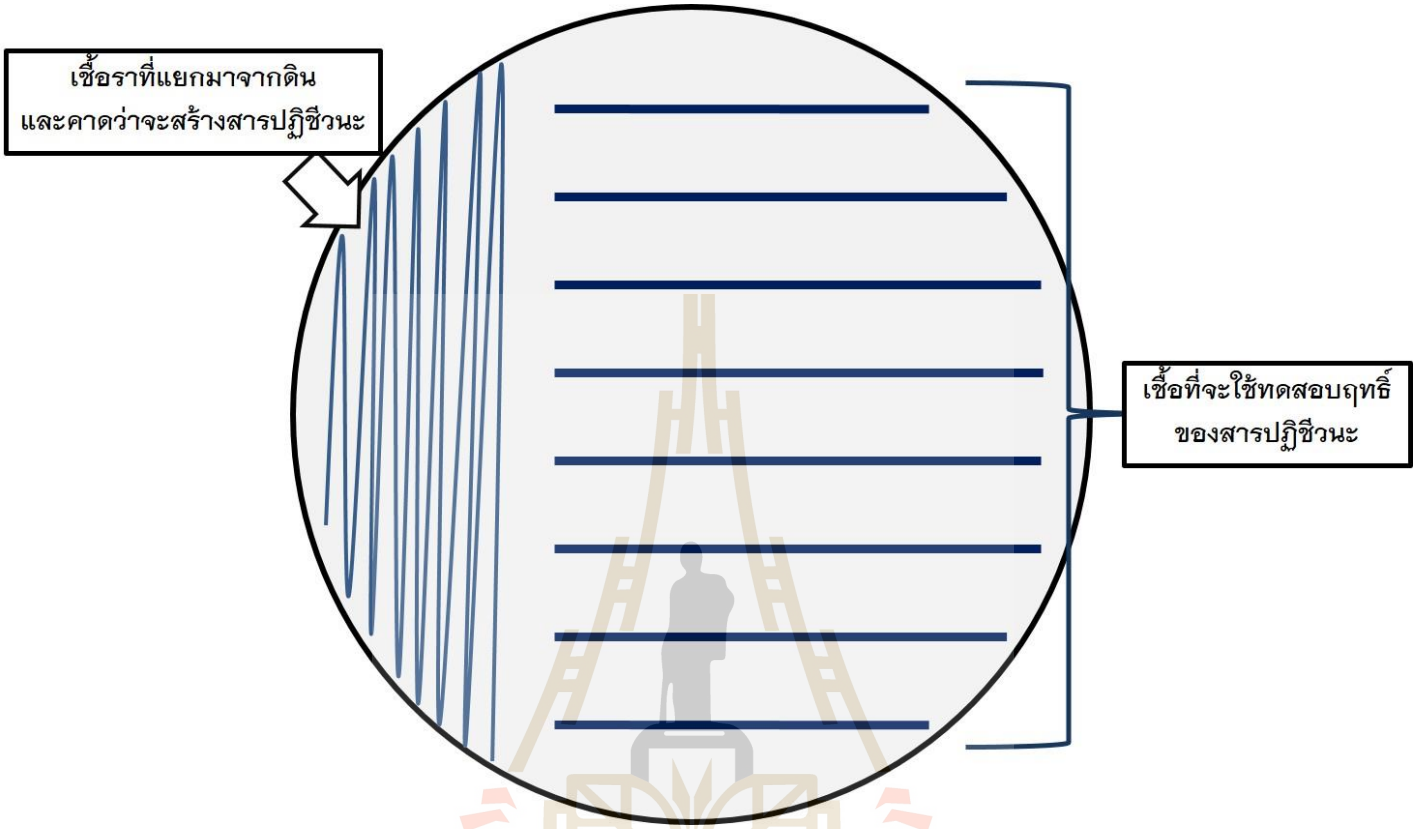
2.4 การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน

การแยกเชื้อจากตัวอย่างดินทำโดยวิธี dilution plating ทำโดยนำดินที่ต้องการแยกเชื้อมาจำนวน 10 กรัม ใส่ลงใน flask ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร (ได้สารละลายดินที่ความเจือจาง 1:10) เขย่าให้ดินกระจายตัว 20-30 นาทีโดยใช้เครื่องเขย่า ตั้ง flask ทิ้งไว้สักครู่จนสารแขวนลอยดินเริ่มตกตะกอนแล้วจึงใช้ pipette ดูดสารละลายดินมา 10 มล. นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร (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 MY agar แล้วทำการ Spread plate นำจานไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2-3 วัน หรือจนกว่าจะพบโคโลนีของเชื้อราบนจานอาหาร เลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่าง ๆ กันมาทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

2.5 ทดสอบฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อราที่แยกได้จากดิน

นำเชื้อราที่จะทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์มาเพาะลงบนจานอาหาร NA โดยการขีดลากเป็นเส้นตรงตามแนวกึ่งกลางจานอาหาร (รูปที่ 2.1) นำจานไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนเชื้อเจริญ เพื่อให้เชื้อสร้างสารปฏิชีวนะแผ่ออกมาโดยรอบโคโลนี

ลำดับต่อมา ให้นำเชื้อที่จะใช้ทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะไปเพาะบนจานเดียวกับเชื้อราที่สร้างปฏิชีวนะ โดยขีดลากเป็นแนวตั้งฉากกับแนวการเจริญของเชื้อราที่เจริญอยู่ก่อน (ภาพที่ 1) นำจานไปบ่มต่อประมาณ 24-48 ชั่วโมง ตรวจผลการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบความไวโดยสังเกตว่า หากเชื้อทดสอบตัวใดไม่สามารถเจริญเข้ามาใกล้โคโลนีของเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ แสดงว่าสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างออกมานั้นมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อทดสอบ



รูปที่ 2.1 การทดสอบฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อรา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.6 การสกัดโครโมโซมของเชื้อรา

เพาะเลี้ยงสายพันธุ์ของเชื้อราที่ต้องการใช้ในการสกัดโครโมโซมในอาหารเหลว Malt Yeast extract ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยการเขย่าที่สภาวะ 200 รอบต่อนาที และบ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 3 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีให้แยกส่วนเซลล์ของเชื้อราออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อและนำมาใช้ในการสกัดโครโมโซม

การสกัดโครโมโซมของเชื้อราทำได้โดยบดเซลล์ของเส้นใยรา (100 ถึง 150 มิลลิกรัม) ด้วยโกร่งบด ในสภาวะที่มี glass beads และ lysis buffer (400 mM Tris-HCl pH 8.0, 60 mM EDTA pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% w/v sodium dodecyl sulfate) (Liu, Coloe, Baird, and Pedersen, 2000) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ดูด suspension ของเชื้อราจากโกร่งใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 165 ไมโครลิตร ลงไปในหลอด microcentrifuge ผสมสารละลายเซลล์กับ NaCl ให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้น-ลง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 20 นาที ดูดของเหลวส่วนบนไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (1:1) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ลงไป ผสมให้สารละลายเข้ากันและเป็นสีขาวขุ่นเหมือนน้ำนม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 20 นาที แล้วดูดของเหลวด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม chloroform ปริมาตรที่เท่ากันกับของเหลวที่ดูดออกมาใส่ลงไปในหลอด ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 20 นาที ดูดของเหลวด้านบนที่มีส่วนของโครโมโซมอยู่ใส่ลงในหลอดใหม่ แล้วทำการตกตะกอน DNA ด้วยการเติม ethanol ปริมาตร 2 เท่า ของของเหลวที่ดูดออกมา นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm นาน 10 นาที จะได้ DNA ตกเป็นตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 2 รอบ ทิ้งให้ตะกอน DNA แห้ง แล้วเติม TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) ปริมาตร 30 ถึง 50 ไมโครลิตร เพื่อละลาย DNA เก็บสารละลาย DNA ไว้ที่-20 °C

2.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราจากลักษณะรูปร่างของโคโลนีโดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร MYA และบมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน หรือจนเชื้อเจริญ แล้วจึงนำมาตรวจสอบลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารและบันทึกผล

ศึกษาขนาดและรูปรางสปอร ลักษณะก่นชูสปอรด่วยเทคนิค slide culture โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร MYA นำไปบมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน และใชกระจกปิดสไลด์เสียบลงบนโคโลนีของเชื้อราโดยให้ทำมุมกับเอียงประมาณ 45 องศา กับผิวอาหาร และนำไปบ่มต่อจนเส่นใยราเจริญขึ้นมายังกระจกปดสไลด์ นำกระจกปิดสไลด์ที่มีเส้นใยราเจริญมายอมสีโดยใช้ lactophenol cotton blue แล้วจึงนำไปตรวจดูภายใตกลองจุลทรรศน์

2.8 การจำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินด้วยวิธีทางโมเลกุล

การจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยวิธีทางโมเลกุลทำโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน Internal Transcribed Spacer (ITS) ที่อยู่บนโครโมโซมของเชื้อรา ซึ่งการหาลำดับเบสทำได้โดย การสกัดโครโมโซมของเชื้อราและใช้เป็นแหล่งของ DNA template ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นของ ITS โดยใช้ primers ITS4 และ ITS5 (Gardes & Bruns, 1996) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ทั้งสองเป็นดังนี้ ITS4 คือ 5’- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’ และ ITS5 คือ 5’-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3’ โดยสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR เป็นดังนี้ ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 25 รอบ ตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

นำชิ้น ITS ที่ได้จากการทำ PCR มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปใช้เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง Automated Sequencer ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ จะนำไปวิเคราะห์เพื่อหาว่าลำดับเบสของ ITS ที่ได้มานี้ตรงกับเชื้อราชนิดใด โดยใช้โปรแกรม clone manager ในการวิเคราะห์ เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อราสายพันธุ์มาตรฐานที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank NCBI, EzFungi และ UNITE

2.9 การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อราที่แยกได้จากดินทำได้โดย นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal Transcribed Spacer (ITS) ของเชื้อราที่แยกจากดินมาวิเคราะห์ความคล้ายคลึงโดยทำการ Blast กับสายพันธุ์รามาตรฐานที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank NCBI, EzFungi และ UNITE แล้วจึงนำข้อมูลลำดับเบสของเชื้อราที่แยกจากดินกับสายพันธุ์มาตรฐานที่มีความใกล้เคียงกันนี้มาสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการโดยทำการเทียบ (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์เบสด้วยโปรแกรม CrustalW แล้วนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปทำการสร้างแผนภูมิวิววัฒนาการด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis software version 6.0 (MEGA 6.0)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

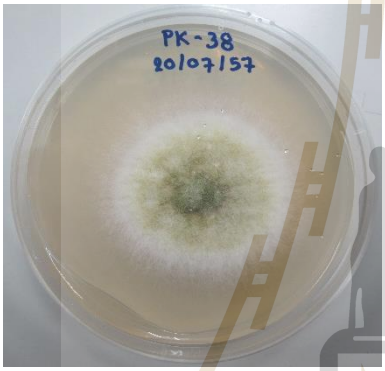
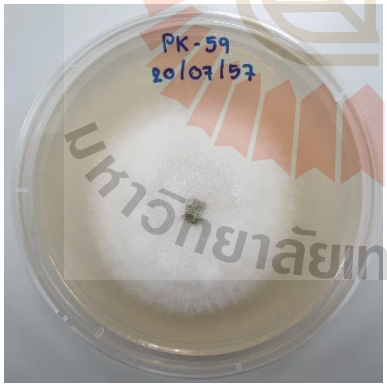
3.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อราที่มีศักยภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะจากตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา แบบสุ่ม โดยออกเก็บตัวอย่างดินเฉลี่ยเดือนละ 1 ถึง 2 ครั้ง เป็นเวลา 1 ปี 6 เดือน ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 21 ตัวอย่าง ขั้นตอนการเก็บทำโดย ใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บตัวอย่างดินที่อยู่ลึกลงไปจากหน้าดินประมาณ 10 ซม. ใส่ในภาชนะที่สะอาด แล้วนำมาแยกหาเชื้อในห้องปฏิบัติการ ตามวิธีที่บรรยายไว้ในบทที่ 2 (วิธีการดำเนินงานวิจัย) หัวข้อที่ 2.4 โดยจะมุ่งเน้นในการคัดแยกเชื้อราที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ จากอาหาร MY agar มาทำการตรวจสอบศักยภาพของเชื้อในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์

จากผลการทดลองพบว่า สามารถแยกเชื้อราจากดิน 21 ตัวอย่าง ได้ 177 สายพันธุ์ โดยให้ชื่อสายพันธุ์เป็น PKF1, PKF2, PKF3,...,PKF177 และจากเชื้อรา 177 สายพันธุ์นี้ มีเพียง 16 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านจุลชีพได้ สายพันธุ์ดังกล่าวประกอบไปด้วย PKF6, PKF38, PK59, PK60, PK61, PKF77, PKF104, PKF105, PKF116, PKF121, PKF124, PKF125, PKF127, PKF145, PKF152และ PK161 ตามลำดับ ซึ่งลักษณะรูปร่างโคโลนีและการเจริญบนอาหารแข็งของเชื้อราเหล่านี้แสดงไว้ในตารางที่ 3.1

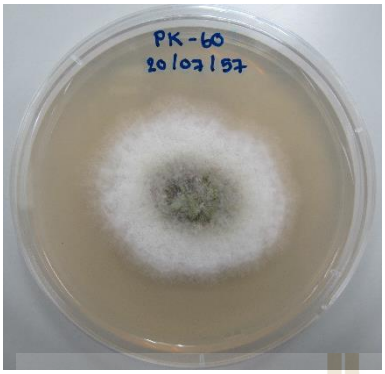
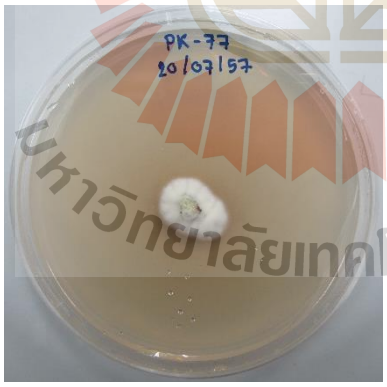
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MYA ของเชื้อรา 16 สายพันธุ์

สายพันธุ์	รูปร่างโคโลนี	ลักษณะโคโลนี
PKF6		เส้นใยขาวฟู บาง สปอร์สีดำ
PKF38		เส้นใยขาวฟู บาง สปอร์สีเขียว
PKF59		เส้นใยขาวฟู หนา สปอร์สีขาว-เทา

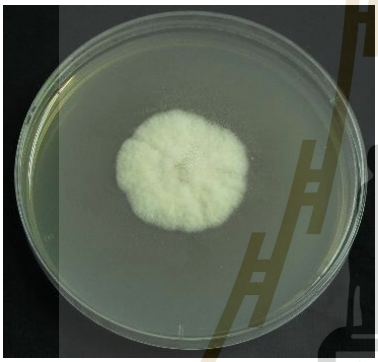
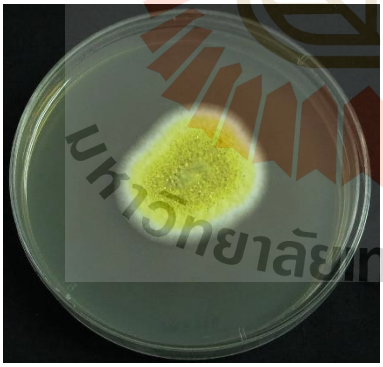
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MYA ของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์	รูปร่างโคโลนี	ลักษณะโคโลนี
PKF60		เส้นใยขาวฟู บาง สปอร์สีเขียวเข้ม
PKF61		เส้นใยขาวฟู บาง สปอร์สีเขียว
PKF77		เส้นใยขาว อัดตัวกันแน่น สปอร์สีขาว

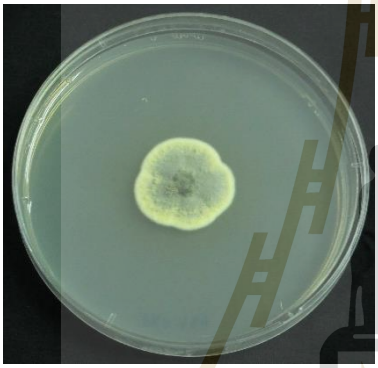
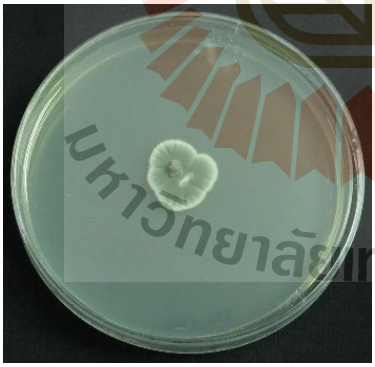
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MYA ของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์	รูปร่างโคโลนี	ลักษณะโคโลนี
PKF104		เส้นใยขาว อัดตัวกันแน่น สปอร์สีขาวอมเหลือง
PKF105		เส้นใยขาว อัดตัวกันแน่น สปอร์สีขาว
PKF116		เส้นใยขาว ฟูขึ้นมาจากผิวอาหารเล็กน้อย สปอร์สีเหลือง มีหยดของเหลวสีเหลืองใสอยู่บนโคโลนี

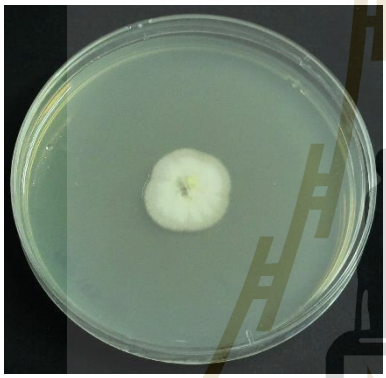
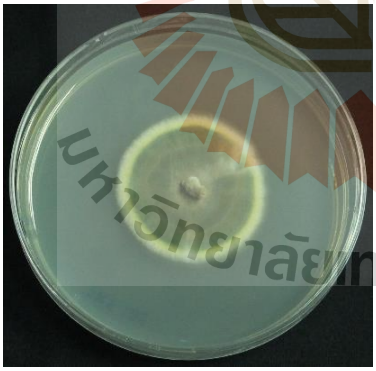
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MYA ของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์	รูปร่างโคโลนี	ลักษณะโคโลนี
PKF121		เส้นใยสีขาวเรียบไปกับผิวอาหาร สปอร์สีเทาอมเขียว ผิวโคโลนีคล้ายกำมะหยี่
PKF124		เส้นใยสีเหลืองเรียบไปกับผิวอาหาร สปอร์สีเทาลักษณะเป็นผง
PKF125		เส้นใยสีขาวเรียบไปกับผิวอาหาร สปอร์สีเทาอมเขียว ผิวโคโลนีคล้ายกำมะหยี่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MYA ของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์	รูปร่างโคโลนี	ลักษณะโคโลนี
PKF127		เส้นใยสีขาวเรียบไปกับผิวอาหาร สปอร์สีเทาอมเขียว มีหยดของเหลวใสอยู่บนโคโลนี
PKF145		เส้นใยขาวเรียบไปกับผิวอาหาร สปอร์สีขาว
PKF152		เส้นใยสีเหลือง ฟูเล็กน้อย สปอร์สีเขียว-เทา ลักษณะเป็นผง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MYA ของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์	รูปร่างโคโลนี	ลักษณะโคโลนี
PKF161		เส้นใยสีขาวอัดตัวกันหลวม ๆ ค่อนข้างฟู สปอร์สีดำลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ

3.2 การทดสอบศักยภาพของเชื้อราในการสร้างสารปฏิชีวนะ

นำเชื้อราที่แยกได้ทั้ง 16 สายพันธุ์มาทำการทดสอบศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลชีพด้วยวิธี perpendicular streak plate ซึ่งขั้นตอนการทำแสดงไว้ในบทที่ 2 และเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาสที่นำมาใช้ทดสอบมีจำนวน 12 สายพันธุ์ ประกอบไปด้วยแบคทีเรียแกรมบวก 5 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* แบคทีเรียแกรมลบ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis* และเชื้อยีสต์อีก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Canidida albicans*, *Candida tropicalis* และ *Saccharomyces cereviciae* ผลการทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 3.2

สำนักวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.2 ผลการทดสอบการสร้างสารต้านแบคทีเรียของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์

สายพันธุ์	Inhibition zone (mm.)											
	แบคทีเรียแกรมบวก					แบคทีเรียแกรมลบ				ยีสต์		
	S. aureus	*S. aureus* (MRSA)	*S. epidermidis*	*B. subtilis*	*B. cereus*	*E. coli*	*E. aerogenes*	*S. typhi*	*P. mirabilis*	*C. albicans*	*C. tropicalis*	*S.cerevisiae*
PKF6	16	-	20	21	-	-	-	-	-	-	-	-
PKF38	13	-	20	15	-	-	-	-	-	-	-	-
PKF59	10	-	16	8	-	-	-	-	-	-	-	-
PKF60	17	-	20	15	7	-	-	-	-	-	-	-
PKF61	10	-	21	18	-	-	-	-	-	-	-	-
PKF77	5	-	20	13	-	-	-	-	-	18	10	15
PKF104	9	11	12	14	-	6	-	-	-	9	8	-
PKF105	-	-	5	-	-	-	-	-	-	20	20	15
PKF116	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	8	10
PKF121	5	10	20	14	6	-	-	-	-	10	5	3
PKF124	3	10	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PKF125	7	12	25	13	14	-	-	-	-	-	-	-
PKF127	11	11	20	20	15	-	-	-	-	-	-	-
PKF145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	10
PKF152	-	-	-	9	5	-	7	11	7	5	-	3
PKF161	5	5	15	7	5	-	-	-	-	-	-	5

(-) ไม่เกิด inhibition zone

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 3.2 แสดงให้เห็นว่า เชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์มีศักยภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะออกมาต้านแบคทีเรียและยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบได้แตกต่างกันไป และหากจัดกลุ่มเชื้อราตามคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จะสามารถจัดออกได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มเชื้อราที่สร้างสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม narrow spectrum โดยจะมีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น เชื้อราในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ PKF6, PKF38, PKF59, PKF60, PKF61, PKF124, PKF125 และ PKF127
- กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มเชื้อราที่สร้างสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม narrow spectrum โดยจะมีฤทธิ์ต่อเชื้อยีสต์เท่านั้น เชื้อราในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ PKF116 และ PKF145
- กลุ่มที่ 3 คือกลุ่มเชื้อราที่สร้างสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ ยีสต์ เชื้อราในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ PKF77, PKF105, PKF121 และ PKF161
- กลุ่มที่ 4 2 คือกลุ่มเชื้อราที่สร้างสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม broad spectrum โดยจะมีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ เชื้อราในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ PKF104 และ PKF152

นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อรา 6 สายพันธุ์ ได้แก่ ที่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA ได้แก่ PKF104, PKF121, PKF124, PKF125, PKF127 และ PKF161

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ของเชื้อราที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้มีศักยภาพในการที่จะนำมาใช้ศึกษาต่อเพื่อพัฒนายาปฏิชีวนะสำหรับใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อดื้อยาได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

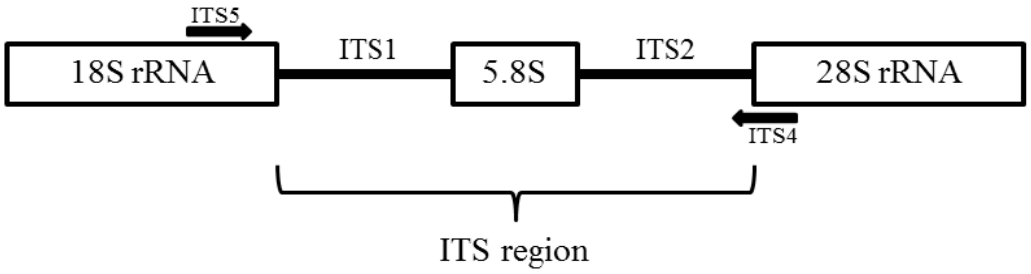
3.3 การจำแนกชนิดของเชื้อรา

นำเชื้อราที่แยกได้ทั้ง 16 สายพันธุ์มาจำแนกชนิดโดยดูลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 3.1) รวมถึงลักษณะเส้นใย และ สปอร์ที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่สร้างเส้นใยสีขาว ไปจนถึงสีเหลือง สปอร์มีตั้งแต่สีขาว สีเหลือง สีเขียวอมเทา ไปจนถึงสีดำ ส่วนใหญ่พบการสร้าง asexual spores ชนิด conidiospores ทำให้สรุปได้อย่างคร่าว ๆ ว่าเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ น่าจะอยู่ใน Phylum Ascomycota เป็นหลัก

อย่างไรก็ดี การจำแนกเชื้อราในระดับ genus และ species จะต้องใช้ข้อมูลของลำดับเบสบนส่วน Internal Transcribed Spacer (ITS) ของเชื้อราเหล่านี้ มาทำการจัดกลุ่มอีกขั้นหนึ่ง โดย ITS เป็นส่วนที่อยู่บนจีโนมของเชื้อรา มีความยาวประมาณ 650 ถึง 750 คู่เบส ประกอบไปด้วยส่วนที่เรียกว่า ITS1-ยีน 5.8S rRNA-ITS2 ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ซึ่ง ITS จัดเป็นส่วนที่มียีนที่ทำหน้าที่คงตัว เป็นบริเวณอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และมีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) สูงกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอื่น ทำให้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของราสปีชีส์เดียวกันออกเป็นหลายสายพันธุ์ได้ (Das & Deb, 2015) ดังนั้นการจำแนกเชื้อราโดยวิธีทางโมเลกุลจึงนิยมใช้การเปรียบเทียบลำดับเบสของส่วน ITS นี้

ซึ่งการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บน ITS ของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ ในการทดลองนี้จะใช้ primer ชื่อ ITS4 และ ITS5 (รูปที่ 3.1) (Gardes & Bruns, 1996) สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ ITS จากจีโนมของเชื้อราด้วยวิธี PCR ซึ่งขั้นตอนอย่างละเอียดได้แสดงไว้ในบทที่ 2 (วิธีดำเนินงานวิจัย) หัวข้อ 2.6 และ หัวข้อ 2.8

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.1 แสดงส่วนของ Internal Transcribed Spacer (ITS) บริเวณ rRNA ยีน โดยส่วนลูกศรแสดงตำแหน่งของ primers ITS4 และ ITS5

ต่อมานำลำดับเบสบนส่วน ITS ของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ ไปทำการ BLAST (basic local alignment search tool) เพื่อหา genus และ species ของเชื้อรา โดยการ BLAST จะเป็นการเปรียบเทียบส่วน ITS ของราที่แยกได้กับเชื้อราที่ทราบชนิดแล้วที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล ซึ่งการศึกษานี้จะทำการเปรียบเทียบลำดับเบสบน ITS ของเชื้อรา 16 สายพันธุ์กับเชื้อราที่อยู่ในฐานข้อมูล 3 ฐาน ได้แก่ GenBank, EzFungi และ UNITE ซึ่งผลการ BLAST แสดงไว้ในตารางที่ 3.3

ซึ่งการเปรียบเทียบลำดับเบสโดยใช้ฐานข้อมูลมากกว่า 1 ฐานข้อมูลขึ้นไปจะเป็นการช่วยในการจัดกลุ่มและยืนยันชนิดของเชื้อได้แม่นยำมากขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.3 ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์บนส่วน ITS ของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ กับเชื้อราในฐานข้อมูล GenBank, EzFungi และ UNITE

สายพันธุ์	GenBank		EzFungi		UNITE	
	Closest relative strains	Similarity (%)	Closest relative strains	Similarity (%)	Closest relative strains	Similarity (%)
PKF6	*Aspergillus flavus* SGE22	100%	*Aspergillus flavus* WM10.84	100%	*Aspergillus flavus* SGE22	100%
PKF38	*Aspergillus flavus* MBSF_1	99%	*Aspergillus flavus* UCDF1	94.4%	*Aspergillus flavus* MSAR1	99.1%
PKF59	*Aspergillus nomius* MF63	98%	*Aspergillus nomius* PEIPDFF22	95.2%	*Aspergillus nomius* DT_2_5_2	98.3%
PKF60	*Aspergillus flavus* MBSF_1	100%	*Aspergillus flavus*	100%	*Aspergillus flavus* MSAR1	100%
PKF61	*Aspergillus oryzae* asemoK	95%	*Aspergillus flavus* UCDF1	96.9%	*Aspergillus oryzae* asemoK	95.4%
PKF77	*Aspergillus flavipes* NZ-3	99%	*Aspergillus flavipes* SEFN2	99.7%	*Aspergillus flavipes* NZ-3	99%
PKF104	*Clonostachys rogersoniana* P62	100%	*Clonostachys rogersoniana* CBS582.89	100%	*Clonostachys rogersoniana* P62	100%
PKF105	*Aspergillus micronesiensis* DTO266-D3	100%	*Aspergillus flavipes* NRRL295	100%	*Aspergillus micronesiensis* DTO266-D3	100%
PKF116	*Aspergillus flavipes* IHBF2335	100%	*Aspergillus flavipes* NRRL295	100%	*Aspergillus flavipes* IHBF2335	100%
PKF121	*Penicillium citrinum* F5	100%	*Penicillium citrinum* 25A	100%	*Penicillium citrinum* F5	100%
PKF124	*Talaromyces allahabadensis* NRRL62157	95%	*Talaromyces radicus* SL-36	100%	*Talaromyces allahabadensis* NRRL62157	99.8%
PKF125	*Penicillium citrinum* IFM63148	100%	*Penicillium citrinum* 27A	100%	*Penicillium citrinum* IFM63148	100%
PKF127	*Penicillium citrinum* F5	100%	*Penicillium citrinum* 27A	100%	*Penicillium citrinum* F5	100%
PKF145	*Aspergillus flavipes* IHBF 2335	100%	*Aspergillus flavipes* NRRL295	100%	*Aspergillus flavipes* IHBF2335	100%
PKF152	*Talaromyces purpureogenus* SQU14109	99%	*Talaromyces purpureogenus* DTO173E6	100%	*Talaromyces purpureogenus* SQU14109	99%
PKF161	*Aspergillus niger isolate* R	99%	*Aspergillus awamori* F6310	100%	*Aspergillus awamori* CBS557.65	99.3%

จากผลความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์บนส่วน ITS ของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ กับเชื้อราในฐานข้อมูล (ตารางที่ 3.3) แสดงให้เห็นว่า เชื้อราส่วนใหญ่ที่แยกได้จากการศึกษานี้เป็นเชื้อราใน genus *Aspergillus* และพบเชื้อราเพียงบางส่วนอยู่ใน genus *Penicillium*, *Talaromyces* และ *Clonostachys* ซึ่งจากผลการ BLAST โดยเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วน ITS ของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ กับเชื้อราจาก 3 ฐานข้อมูล พบว่าผลการ BLAST ที่ได้จากทั้ง 3 ฐานข้อมูล ให้ผลเหมือนกันทั้งในระดับ genus และ species ตัวอย่างเช่น เชื้อราสายพันธุ์ PKF6, PKF38 และ PKF60 มีลำดับเบสบน ITS คล้ายคลึงกับเชื้อ *Aspergillus flavus* มากที่สุด ซึ่งผลนี้เป็นผลที่ตรงกันทั้ง 3 ฐานข้อมูล ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเชื้อ สายพันธุ์ PKF6, PKF38 และ PKF60 คือเชื้อ *Aspergillus flavus* ในทำนองเดียวกันผลของความคล้ายคลึงกันของลำดับของคู่เบสบน ITS ที่ตรงกันจากทั้ง 3 ฐานข้อมูลของเชื้อสายพันธุ์ PKF77, PKF116 และ PKF145 แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์นี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Aspergillus flavipes* มากที่สุด ดังนั้นเชื้อราสายพันธุ์ PKF77, PKF116 และ PKF145 น่าจะเป็นเชื้อ *Aspergillus flavipes* จากผลการ BLAST นี้เองจึงสามารถสรุปได้อย่างคร่าว ๆ ว่า เชื้อสายพันธุ์ที่เหลือ ได้แก่ PKF59 น่าจะจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Aspergillus nomius*, PKF104 คือเชื้อ *Clonostachys rogersoniana*, PKF121, PKF125 และ PKF127 คือเชื้อ *Penicillium citrinum* ส่วน PKF152 คือเชื้อ *Talaromyces purpureogenus*

อย่างไรก็ดีผลการ BLAST ของเชื้อรา 4 สายพันธุ์ คือ PKF61, PKF105, PKF124 และ PKF161 จาก 3 ฐานข้อมูล ให้ผลที่ไม่ตรงกันทั้งหมด โดยการ BLAST ของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ให้ผลที่เหมือนกันใน 2 ฐานข้อมูลเท่านั้น เช่น เชื้อสายพันธุ์ PKF61 ให้ผลการ BLAST จากฐานข้อมูล GenBank และ UNITE ตรงกันคือ เชื้อ *Aspergillus oryzae* แต่ฐานข้อมูล EzFungi กลับให้ผลว่าเชื้อ PKF61 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยในปี ค.ศ. 2012 งานตีพิมพ์ของ Park และคณะ (Park et al., 2012) กล่าวไว้ว่าการจัดกลุ่มและจำแนกเชื้อโดยใช้วิธีการทางโมเลกุลด้วยการทำ BLAST เพื่อให้เกิดความถูกต้องและแม่นยำนั้นควรทำเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมากกว่า 1 ฐานขึ้นไป และควรทำเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลอย่างน้อย 3 ฐานข้อมูล โดยในกรณีที่ผลการ BLAST ในแต่ละฐานข้อมูลออกมาไม่ตรงกัน ให้ตัดสินจากผลที่ได้จากฐานข้อมูลที่ใช้ว่าผลออกมาตรงกับเชื้อชนิดใดมากที่สุด ดังนั้น กรณีของเชื้อสายพันธุ์ PKF61 จึงน่าจะถูกจัดเป็นเชื้อ *Aspergillus oryzae* เนื่องจาผลที่ได้จาก 2 ฐานข้อมูลคือ GenBank และ UNITE นั้น ตรงกัน ซึ่งหากใช้หลักการนี้กับการจัดกลุ่มเชื้อราที่เหลือจะสามารถสรุปได้ว่า เชื้อราสายพันธุ์ PKF105 คือเชื้อ

Aspergillus micronesiensis, PKF124 คือเชื้อ *Talaromyces allahabadensi* และ PKF161 คือเชื้อ *Aspergillus awamori*

จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสของคู่เบสบน ITS ของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ โดยทำการ BLAST กับเชื้อราที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank, EzFungi และ UNITE สามารถสรุปชนิดของเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 การจำแนกเชื้อราทั้ง 16 สายพันธุ์ ในระดับ genus และ species โดยวิเคราะห์จากผลการ BLAST ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank, EzFungi และ UNITE

สายพันธุ์ของเชื้อราที่แยกจากดิน	ชนิดของเชื้อราในระดับ genus-species
PKF6, PKF38, PKF60	*Aspergillus flavus*
PKF77, PKF116, PKF145	*Aspergillus flavipes*
PKF121, PKF125, PKF127	*Penicillium citrinum*
PKF59	*Aspergillus nomius*
PKF61	*Aspergillus oryzae*
PKF104	*Clonostachys rogersoniana*
PKF105	*Aspergillus micronesiensis*
PKF124	*Talaromyces allahabadensi*
PKF152	*Talaromyces purpureogenus*
PKF161	*Aspergillus awamori*

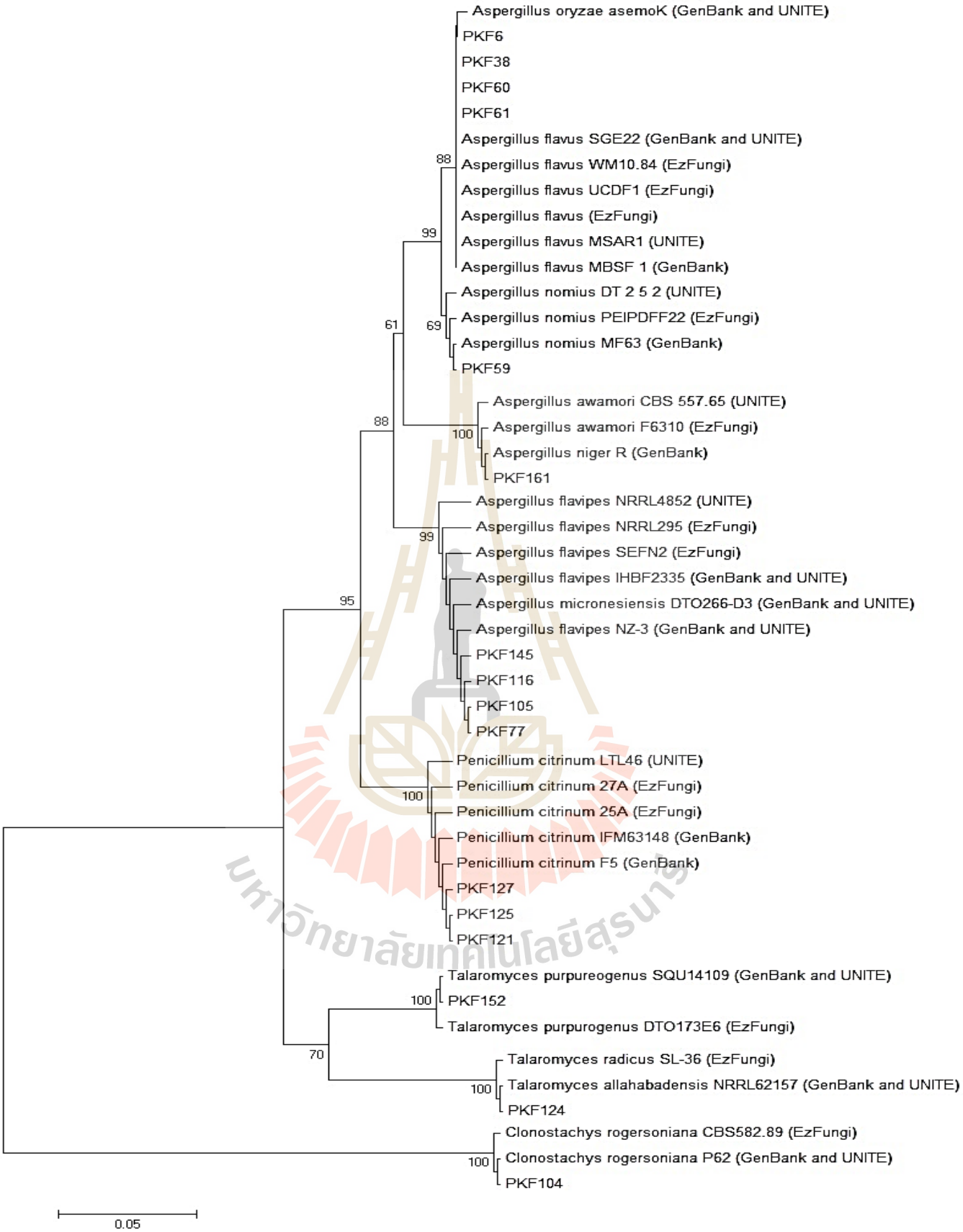
3.4 การศึกษาความสัมพันธ์และสายวิวัฒนาการของเชื้อรา 16 สายพันธุ์ด้วย ITS

การศึกษาความสัมพันธ์และลำดับวิวัฒนาการของเชื้อรา 16 สายพันธุ์ กับเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank, EzFungi และ UNITE ทำได้โดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บนส่วนของ ITS ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงไว้ในรูปที่ 3.2

เมื่อนำผลจากตารางที่ 3.3 มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับแผนภูมิวิวัฒนาการในรูปที่ 3.2 จะสังเกตเห็นว่า เชื้อราสายพันธุ์ PKF ที่แยกได้จากดินมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราสายพันธุ์มาตรฐานจากฐานข้อมูล GenBank, EzFungi และ UNITE โดยหากสายพันธุ์ PKF มีลำดับนิวคลีโอไทด์บน ITS ใกล้เคียงกับสายพันธุ์มาตรฐานชนิดใด เชื้อรา PKF นั้นก็จะถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกับสายพันธุ์มาตรฐานชนิดนั้น ๆ ยกตัวอย่าง เช่น เชื้อราสายพันธุ์ PKF6, PKF38 และ PKF60 ที่ผลการ BLAST แสดงให้เห็นว่าเชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อ *Aspergillus flavus* ซึ่งจากแผนภูมิวิวัฒนาการในรูปที่ 3.2 ของเชื้อ PKF6, PKF38 และ PKF60 กับเชื้อ *Aspergillus flavus* แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน เนื่องจากถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกัน

ในทำนองเดียวกันกับเชื้อสายพันธุ์ PKF77, PKF116 และ PKF145 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บนส่วนของ ITS คล้ายคลึงกับเชื้อ *Aspergillus flavipes* ซึ่งจากแผนภูมิวิวัฒนาการก็แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ PKF77, PKF116 และ PKF145 อยู่ใน clade เดียวกับเชื้อ *Aspergillus flavipes* โดยลักษณะเช่นนี้ยังสามารถพบได้ในเชื้อ PKF121, PKF125 และ PKF127 กับเชื้อ *Penicillium citrinum* เชื้อสายพันธุ์ PKF59 กับเชื้อ *Aspergillus nomius*, สายพันธุ์ PKF61 กับเชื้อ *Aspergillus oryzae*, สายพันธุ์ PKF104 กับเชื้อ *Clonostachys rogersoniana*, สายพันธุ์ PKF105 กับเชื้อ*Aspergillus micronesiensis*, สายพันธุ์ PKF124 กับเชื้อ *Talaromyces allahabadensi*, สายพันธุ์ PKF152 กับเชื้อ *Talaromyces purpureogenus* และสายพันธุ์ PKF161 กับเชื้อ *Aspergillus awamori*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.2 แผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Neighbor-joining ของเชื้อราสายพันธุ์ PKF กับเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank, EzFungi และ UNITE

บทที่ 4
สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปการวิจัย

ในปัจจุบันโรคติดเชื้อจัดเป็นปัญหาทางสาธารณะสุขที่สำคัญในทุกภูมิภาคทั่วโลก โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อดื้อยา สืบเนื่องมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะกันอย่างกว้างขวางและขาดการควบคุม ประชาชนสามารถเข้าถึงยาปฏิชีวนะได้ง่าย จึงส่งผลให้พบสายพันธุ์ของเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงมีจำเป็นที่จะต้องพัฒนายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ สำหรับนำมาใช้กับเชื้อดื้อยาเหล่านี้ โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้นส่วนใหญ่ได้มาจากสารในกลุ่ม secondary metabolites ที่สร้างโดยเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย หรือ เชื้อรา ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่เป็นไปได้ในการพัฒนายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ ก็คือการค้นหาและคัดแยกเชื้อที่ผลิตสารปฏิชีวนะเหล่านี้จากแหล่งต่าง ๆ ในธรรมชาติ มีผู้รายงานไว้ว่าการคัดแยกเชื้อจากแหล่งธรรมชาติในช่วง 10-20 ปี มานี้ลดลงอย่างมาก เนื่องจากนักวิทยาศาสตร์ให้ความสำคัญกับงานด้านนี้น้อยลง ทำให้ในยุคหลังนี้ไม่มีรายงานการค้นพบยาชนิดใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นมากนัก ซึ่งขัดกับการคาดการณ์ที่ว่า ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในวงการแพทย์ปัจจุบันนี้เป็นเพียงร้อยละ 1-3 จากสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Streptomyces* เพียงอย่างเดียว (Baltz, 2015; Shetty, Buddana, Tatipamula, Naga, Ahmad, 2014) จากข้อมูลดังกล่าวนี้จะเห็นได้ว่านักวิทยาศาสตร์ควรให้ความสำคัญในการคัดแยกเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะได้จากแหล่งต่าง ๆ ในธรรมชาติอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากยังมีสารปฏิชีวนะในธรรมชาติอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ถูกค้นพบ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายของเชื้อราที่สร้างสารปฏิชีวนะได้จากแหล่งดินในป่าเต็งรังบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งบริเวณดังกล่าวยังไม่เคยมีผู้เข้าไปศึกษาเพื่อเก็บข้อมูลของเชื้อเหล่านี้ ซึ่งผลจากการคัดแยกเชื้อราที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้จากดินในบริเวณนี้พบว่า มีเชื้อรา 16 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมาต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบได้ ซึ่งร้อยละ 62.50 ของเชื้อราที่พบในบริเวณนี้และสร้างสารปฏิชีวนะได้คือเชื้อในจีนัส *Aspergillus* ร้อยละ 18.75 คือ เชื้อในจีนัส *Penicillium* ร้อยละ 12.50 คือ เชื้อในจีนัส *Talaromyces* ส่วนที่เหลือ อีกร้อยละ 6.25 คือ เชื้อราในจีนัส *Clonostachys* ดังนั้นจึงสามารถ

สรุปได้ว่าเชื้อรากลุ่มหลักที่พบในดินบริเวณป่าเต็งรังของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้อยู่ในจีนัส *Aspergillus*

เมื่อนำเชื้อราสายพันธุ์ PKF ที่แยกได้ มาศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการกับเชื้อรามาตรฐานจากฐานข้อมูล GenBank, EzFungi และ UNITE พบว่า เชื้อ PKF แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อราามาตรฐานที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกันกับเชื้อ PKF ชนิดนั้น ๆ มากที่สุด เนื่องจากจะพบอยู่ใน clade เดียวกันในสายวิวัฒนาการ อย่างไรก็ดี แม้ว่าเชื้อราสายพันธุ์ PKF จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อมาตรฐานค่อนสูง แต่ก็ยังแสดงสายวิวัฒนาการแยกออกมาจากสายพันธุ์มาตรฐาน รวมถึงเชื้อ PKF บางสายพันธุ์ ได้แก่ PKF104, PKF121, PKF124, PKF125, PKF127 และ PKF161 ยังมีคุณสมบัติเด่นบางประการ เช่น สามารถสร้างสารชีวภาพที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อสายพันธุ์ดื้อยา MRSA ได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อาจเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพในการที่จะนำมาศึกษาเพื่อใช้ในการพัฒนายาต้านเชื้อดื้อยาต่อไป

4.2 ข้อเสนอแนะ

นำผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปทำการทดลองต่อยอด เนื่องจากเชื้อราบางสายพันธุ์ที่แยกได้มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อดื้อยา ดังนั้นจึงควรนำเชื้อเหล่านี้มาศึกษาและทดสอบเพิ่มเติมกับเชื้อดื้อยาสายพันธุ์อื่น ๆ และควรทำการทดลองสกัดสารที่เชื้อราสร้างได้ออกมาศึกษาโครงสร้าง และคุณสมบัติของสาร

ซึ่งทีมนักวิจัยมีความหวังว่าผลการทดลองที่ได้จะสามารถนำไปใช้ในการพัฒนายาชนิดใหม่ ๆ สำหรับนำมาใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากจุลินทรีย์ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2549). จุลชีววิทยาทางดิน. กรุงเทพ ฯ: โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล, สมใจ ศิริโภค. (2541). การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส (รายงานการวิจัย). กรุงเทพ ฯ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สมจิตร อยู่เป็นสุข. (2549). ราวิทยา. กรุงเทพ ฯ: พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์.

Anderson, I. C., & Cairney, J. W. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. Environmental microbiology, 6(8), 769-779.

Antoine, A. A., Jacqueline, D., & Thonart, P. (2010). Xylanase production by *Penicillium canescens* on soya oil cake in solid-state fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(1), 50-62.

Augustín, J., Zemek, J., & Fassatiová, O. (1981). Production of α-amylase by microscopic fungi. *Folia microbiologica*, 26(2), 142-146.

Bacci, M., Anversa, M., & Pagnocca, F. (1995). Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant Atta sexdens rubropilosa. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67(4), 385-386.

Baldrian, P., & Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 32(3), 501-521.

Baltz, R. H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current opinion in pharmacology*, 8(5), 557-563.

Betini, J. H. A., Michelin, M., Peixoto-Nogueira, S. d. C., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., & Polizeli, M. (2009). Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(6), 819-824.

Borneman, J., & Hartin, R. J. (2000). PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4356-4360.

Bridge, P., & Spooner, B. (2001). Soil fungi: diversity and detection. *Plant and soil*, 232(1-2), 147-154.

Cazar, M., Schmeda-Hirschmann, G., & Astudillo, L. (2005). Antimicrobial butyrolactone I derivatives from the Ecuadorian soil fungus *Aspergillus terreus* Thorn. var *terreus*. *World journal of microbiology and biotechnology*, 21(6-7), 1067-1075.

Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 4(3), 331-338.

Chantasingh, D., Pootanakit, K., Champreda, V., Kanokratana, P., & Eurwilaichitr, L. (2006). Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 46(1), 143-149.

Chen, Y., Prior, B. A., Shi, G., & Wang, Z. (2011). A rapid PCR-based approach for molecular identification of filamentous fungi. *The journal of microbiology*, 49(4), 675.

Christensen, M. (1989). A view of fungal ecology. *Mycologia*, 81(1), 1-19.

Costa, M. A. F., & Peralta, R. M. (1999). Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). *Journal of basic microbiology: an international journal on biochemistry, physiology, genetics, morphology, and ecology of microorganisms*, 39(1), 11-15.

Das, S., & Deb, B. (2015). DNA barcoding of fungi using ribosomal ITS marker for genetic diversity analysis: a review. *International journal of pure and applied bioscience*, 3, 160-167.

Davidson, S. (1996). Microbial lipases: production and applications. *Science progress*, 79(2), 119-157.

Ding, J., Cong, J., Zhou, J., & Gao, S. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and extracellular enzyme secretion in agitated and stationary cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of environmental sciences*, 20(1), 88-93.

Finlay, R. D., & Clay, K. (2007). Fungal endophytes in forests, woody plants and grassland ecosystems: diversity, functional ecology and evolution. *Fungal biology reviews*, 2(21), 49-50.

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1996). ITS-RFLP matching for identification of fungi. *Methods in molecular biology*, 50, 177-186.

Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P., & Davidson, S. (1996). Microbial lipases: production and applications. *Science progress*, 79 (2), 119-157.

Haq, I., & Mukhtar, H. (2004). Biosynthesis of proteases by *Rhizopus oligosporus* IHS13 in low-cost medium by solid-state fermentation. *Journal of basic microbiology: an international journal on biochemistry, physiology, genetics, morphology, and ecology of microorganisms*, 44(4), 280-287.

Hassink, J., Lebbink, G., & Van Veen, J. (1991). Microbial biomass and activity of a reclaimed-polder soil under a conventional or a reduced-input farming system. *Soil biology and biochemistry*, 23(6), 507-513.

Inamori, Y., Kato, Y., Kubo, M., Kamiki, T., Takemoto, T., & Nomoto, K. (1983). Studies on metabolites produced by *Aspergillus terreus* var. *aureus*. I. Chemical structures and antimicrobial activities of metabolites isolated from culture broth. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 31(12), 4543-4548.

Jefferys, E., Brian, P., Hemming, H., & Lowe, D. (1953). Antibiotic production by the microfungi of acid heath soils. *Microbiology*, 9(2), 314-341.

Jones, E. B. G., Tanticharoen, M., & Hyde, K. D. (2004). Thai fungal diversity. Pathum Thani: National center for genetic engineering and biotechnology.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Juan, D., Jun, C., Juan, Z., & Shixiang, G. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and extracellular enzyme secretion in agitated and stationary cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of environmental sciences*, 20(1), 88-93.

Juhasz, A. L., & Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzopyrene. *International biodeterioration and biodegradation*, 45(1-2), 57-88.

Kitancharoen, N., & Hatai, K. (1998). Some biochemical characteristics of fungi isolated from salmonid eggs. *Mycoscience*, 39(3), 249-255.

Klyosov, A. A. (1990). Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. *Biochemistry*, 29(47), 10577-10585.

Kumar, A., Yoon, M.-Y., & Purtell, C. (1997). Optimizing the use of cellulase enzymes in finishing cellulosic fabrics. *Textile chemist and colorist*, 29(4), 37-42.

Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of clinical microbiology*, 38(1), 471-471.

Macchione, M. M., Merheb, C. W., Gomes, E., & Da Silva, R. (2008). Protease production by different thermophilic fungi. *Applied biochemistry and biotechnology*, 146(1-3), 223-230.

Madiga, M. T., Martinko, J. M., & Brock, T. D. (2006). Brock biology of microorganisms (edition 11th). Upper saddle river: Pearson prentice hall.

Marudhu Ramachandran, M., Balakrishnan, K., Cynthiya, A., Mani Sankar, M., Panimalar, M., Raghuraman, T., & Siva Ganesa Karthikeyan, R. (2007). Screening and isolation of cyclosporine-related compound producing soil fungi from the Western Ghats, Tamil Nadu. *Current science*, 92(6), 726-727.

Mitra, S., Banerjee, P., Gachhui, R., & Mukherjee, J. (2011). Cellulase and xylanase activity in relation to biofilm formation by two intertidal filamentous fungi in a novel

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

polymethylmethacrylate conico-cylindrical flask. *Bioprocess and biosystems engineering*, 34(9), 1087-1101.

Park, K. S., Ki, C.-S., Kang, C.-I., Kim, Y.-J., Chung, D. R., Peck, K. R., Song, J-H., & Lee, N. Y. (2012). Evaluation of the GenBank, EzTaxon, and BIBI services for molecular identification of clinical blood culture isolates that were unidentifiable or misidentified by conventional methods. *Journal of clinical microbiology*, 50(5), 1792-1795.

Polizeli, M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J. A., & Amorim, D. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(5), 577-591.

Ruban, E. (1972). Microbial lipases. *Izvestiia akademii nauk SSSR. Seriia biologicheskaia*, 3, 326-332.

Shetty, P. R., Buddana, S. K., Tatipamula, V. B., Naga, Y. V. V., & Ahmad, J. (2014). Production of polypeptide antibiotic from *Streptomyces parvulus* and its antibacterial activity. *Brazilian journal of microbiology*, 45(1), 303-312.

Takahashi, J. A., de Castro, M. M., Souza, G. G., Lucas, E. M., Bracarense, A. A., Abreu, L. M., Marriel, I.E., Oliveira, M. S., Floreano, M. B., & Oliveira, T. S. (2008). Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *Journal de mycologie médicale*, 18(4), 198-204.

Tomme, P., Warren, R., & Gilkes, N. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in microbial physiology*, 37, 1-81.

Turbyville, T. J., Wijeratne, E. K., Whitesell, L., & Gunatilaka, A. L. (2005). The anticancer activity of the fungal metabolite terrecyclic acid A is associated with modulation of multiple cellular stress response pathways. *Molecular cancer therapeutics*, 4(10), 1569-1576.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Tyndall, R. M. (1992). Improving the softness and surface appearance of cotton fabrics and garments by treatment with cellulase enzymes. *Textile chemist and colorist*, 24(6), 23-26.

United States. Natural Resources Conservation Service. (1999). *Soil biology primer*. Washington D.C.: U.S. Department. of agriculture, natural resources conservation service.

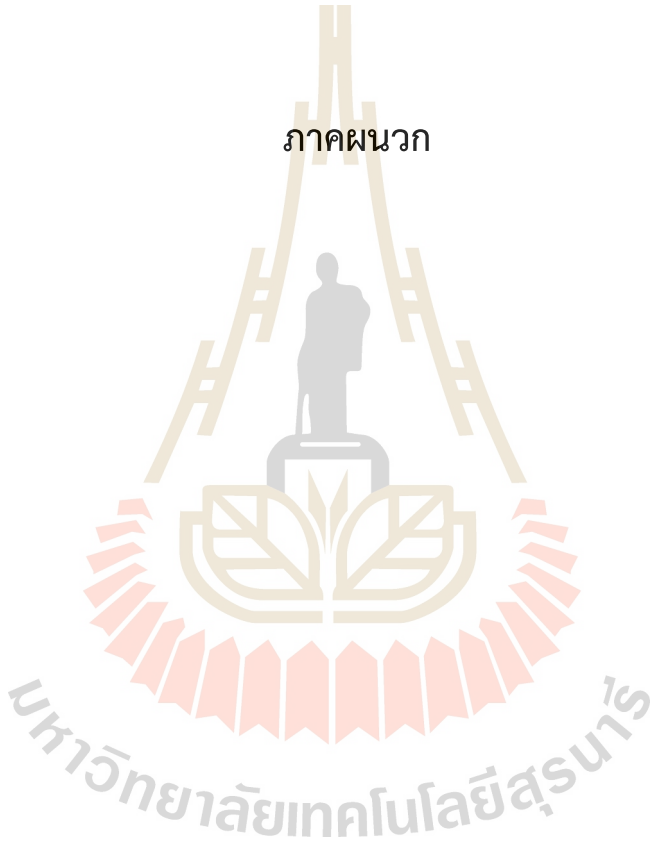
Wang, H. L., Vespa, J. B., & Hesseltine, C. (1974). Acid protease production by fungi used in soybean food fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 27(5), 906-911.

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols A guide to methods and applications* (pp. 315-322) Massachusetts, United States: Academic press.

Zhou, P., Zhu, H., Yan, Q., Katrolia, P., & Jiang, Z. (2011). Purification and properties of a psychrotrophic *Trichoderma* sp. xylanase and its gene sequence. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164(6), 944-956.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก



ภาพผนวก ก.

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น ITS ของเชื้อ PKF6, PKF38, PK59, PK60, PK61, PKF77, PKF104, PKF105, PKF116, PKF121, PKF124, PKF125, PKF127, PKF145, PKF152และ PK161

>PKF6

CCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCC
GGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGC
AATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTC
CGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCC
CCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCT
TTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCTATA

>PKF38

CAGGATCTTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTG
CTTCGGCGGCCCCTCCATTCTTGGGCTCCGAGGGGTCGCCGCCCCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCCC
GGAGAGGGGACGACGACCCAACGCACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATG
CCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCAC
ACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAACAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTA
ACTGATTGCGATACAATCAACTCGGACTTCGCGTAGTCACAACGAAGTCCGGGGGGCCTCCGGCGGGC
GCGGGCCCGGCGCTGACAGCCCCCGGCGGCCTTGAGTGGCGGGCCCTCCGAACCCCTACGGTACGCCC
AGCCGGTGGGGGGGTGGGCTCGTCAGGCATTCTCCACGCTGACATGAGACCTCGT

>PKF59

GACATTAGCGACGTGTAGGGGTCATAGAGCGAGCCCACCTCCCACCGTGCTTTCGGTACCTAAGAGGG
GGTGACGGAGCCCCCTACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTAGGGCCCGACCCCGC
ACTCAGAACGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTTGCGGGATCGGAATGAAACTTTGGACAGGGGTGC
CCCCTGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGGCCAAATGCTCGATGATTCAGGGAATTGTGGAATTCCC
AGTATTTTTCGGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGGATTCCGGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTA
ACTGATTGCGATACAATCAAGTCTGACTTCACTAGATCGTTCAGAGTTCGTGGGG

>PKF60

TAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCC
GCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAG
TCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAGTGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCATAATTCCGTGAATCATCTATTCTTGGAACCCTC
ATTGCGCCCCCGGGTATTCCAGGGGGTGTGGAAGGCTTTAAGTGATTGCTACCCATTCAACTCGGATTT
CGTGTTGTCAGACCGACTTCGTGGTGGCTCCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGCTGAGAGCCCCCGGCGGC
CATGAATGGCGGGGCCGTCGAAGCAACTAACGGACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGG
AACCCTACACGCGGACATGATACTTCGGCAGGTTCCCCGCTG

>PKF61

GAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCC
CGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGT
CTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTC
CGGCATCGATGAAGAACGCAACGAAATGCTATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAG
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGTGTGCCAGGCCTAAACTGATTGCTGCCCAA
TCAGCTCGGATTTCGTGTTGGGTCACAGAGTTCGTGGTGGCTCCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGCTGAG
AACCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGGCCGTCTAAGCAACTAACGGACAGTAAACACGGGTGTGAGGT
TGGGCTC

>PKF77

TCCCTCGTGGCCCACCTCCCACCCGTGACTACTGTACCACTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCGTCTG
CTGGCCGCCGGGGGGGTTCCGCCCCTGGCTTTCGGGCCCGCCCCCCCGGGGGGACGAAGACCCTATTC
AAAGCCGGGCTGAAGGCCATTCTTGTGCGATCGGATAGGACTTTCCCCCGGAATCTCGGGGGTCCAGC
GTCGATGAAAAAACCCGCGAATTGCCGAAACTAATGTGTAATGTAGAATTTCGGTGATTCCCCGAGGTC
TTTAACGCACCTGGACCCCCCGGTCTTTCGGGGGGGGTTTCAGTTCATACCAAAAATCCGGCCTCCAAC
CGGGTTTGGAATGGGGTGTTCGTGTCGGGGGTCGGCGGGCCCGGGGCCCGGGGGCGGAACCCCCCCG
GGGCCTCGAGAATATGGGGGGTCCCCCCAAGCTATGAGGGCCCGGCCGGCCCCGGCCGGAAGGTAGGC
TTTTATTTTTCCGGGTGAGCTTGGATCCTGTCGGGGTTCCCGCTGAAATAAGCGTTCAAAA

>PKF104

CATACCTATCGTTGCTTCGGCGGGATCGCCCCGGGCGCCTTGTGTGCCCCGGATCCAGGCACCCGCCG
GGGGACCTTAACTCTTGTTTTATTTAGAATCTTCTGAGTAGTTTTTACAAATAAATAAAAACTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAAAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAG
CGTCATTTCAACCCTCATACCCCTAGGGTGTGGTGTTGGGGATCGGCCAAGGCCCGCAAGGGACGGCC
GGCCCCTAAATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGTAATATTCCGCATCGGAGAA
GCGACGAGCCCCTGCCGTTAAACCCCCAACTTTCTAAGGTTGACCTCAGATCAGGTAGGAATACCCGCT
GAACTTAAGCATATCTA

>PKF105

CCTCCCACCCGTGACTACTGTACCACTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCCTAGCTGGCCGCCGGGGG
GCTTCTGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTTTCTGAAAGCCTGTATGA
ATCCGATTCTTTGTAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGC
GCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTATTG
GGTCCTCGTCCCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATG
GGGCTTTGTCACCCGCTCTGGAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCCACGCAGATCATCCTTTTTTTCAGGTTG
ACCTCGGATCATGTA

>PKF116

CCTCCCACCCGTGACTACTGTACCACTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCCTAGCTGGCCGCCGGGGG
GCTTCTGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTTTCTGAAAGCCTGTATGA
ATCCGATTCTTTGTAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGC
GCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTATTG
GGTCCTCGTCCCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATG
GGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCCACGCAGATCATCCTTTTTTTCAGGTTG
ACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT

>PKF121

GTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCCGCCGACGGCCCCCCTGAACGCTGTCTG
AAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTG
AACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCC
GGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCCCGCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCGCCGCG
TCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACCCCC
AACCTTTAATTATCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC

>PKF124

CTGCAGTGTACACTTACCGAAGCCTCTGCAGCCGCGCAAGCGGTAGGCCCGAGCGACTCTCTAAACAA
GTCGGCGCCGTTGCAAGTCCCAGGGCTTTCCCTCCCGGAAAGCCCCCGGGGCGACACTCTCGAATTGA
CGGGGACACCCTAAAGCCAGTCGCGCCAACCCGCCGGGAGAAATCCCTCGGGGGCCTGTGTTAACCGC
ACAGGGTACGGTAACAGACGATCTGGATACTTCTGCCTCCCGCAGAGACCATGGGCAATCCGCAGCGA
AGCCCCTAAAGCCCTCGCGGGCCATGGGGAACGTTCACAGACTAAGTGTGAGTGGGGTGGAGGCCGAG
CCTCCGCTTAAGATATAGTCGGGCTCCCCGAGAGATCGGGGGGACAAGTACACTGAACTTCAAGCCGTT
CCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGCGGGTTCGAACGAGCCCAACCTCCCACCCGTG
TCTACTGTTACCGCGTTGCTTCGGCGGGCCCACTGGGGCCTCGCCCCGGTCGCCGGGGGGTTCTTGCC
CCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCCCTGGAACCCTGTCTGAATAGTGAGTCTGAGTGAGAGATTGAA
TCATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGG
GGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCCAGCACGGCTGGGTGATTTGTGCTGTCCCCCCG
GATACACGCCTCAAAACCCGTGGGGGGTCTCCGCGTCGGGAACCTCCAGCGTATGGGGCTCTGTCCCCA
CCTGGTGAGGGACTCGCTCGGGGCTAGTCTTCCCCCAGGTGCCCATTTGGGGGTCAGTG

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

>PKF125

CCTCCCACCCGTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCCGCCGACGGCCCCCCTGA
ACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGC
CCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCCCGCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGC
GGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGGCGCCAG
CCGACCCCCAACCTTTAATTATCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAAC

>PKF127

GTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCGCGCCCGCCGACGGCCCCCCTGAACGCTGTCTG
AAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTG
AACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCC
GGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCCCGCCGGGGGGACGGGCACGAAAGGCAGCGGCGGCGCCGCG
TCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGGCGCCATCCGACCCCC
AACCTTTAATTATCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC

>PKF145

GAGTGAGGGTCCTCGTGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTACTGTACCACTGTTGCTTCGGCGGGCCCG
CCAGCCTAGCTGGCCGCCGGGGGGCTTCTGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAAC
ACTGTTTCTGAAAGCCTGTATGAATCCGATTCTTTGTAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTG
GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGC
CCTCAAGCCCGGCTTGTATTGGGTCCTCGTCCCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCG
CGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCCACGCA
GATCATCCTTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCTA

>PKF152

CACCTGTTGCTTCGGCGGGCCCACCGGGGCCACCCGGTCGCCGGGGGACATCCTGTCCCCGGGCCCGC
GCCCGCCGAGGCGCTCTGTGAACCCTGATGAAGATGGGCTGTCTGAGTGATTATGAAAATTGTCAAAAC
TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCC
TGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCCGGGGACCTGCC
CGAAAGGCAGCGGCGACGTCCGTCTGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACTCGCTCGGGAAGGAC
CTGCGGGGGTTGGTCACCACCACATCTTTTTACAAGGTTGACCTCGGATCATGTAGGAGTTACCCGCTG
AACTTAATCATATCATA

>PKF161

ATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGCGTCTCT
GCCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTG
ATTGAATGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCC
CTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGT
CGCCGTCCCCCTCTCGGGGGGGGGACGGCCCGGACCCGGGGGGCAGACACCCCCCCCCAGCCGCCAA
CAAACGGCGGTTTCTCCGAAGCACCAGGGTACTATACACACCGAGGGGAGG

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพผนวก ข.

งานวิจัยจากโครงการนี้ที่มีการเผยแพร่ในงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

13th Int'l Conference on Advances in Agricultural, Environmental, Biological & Medical Sciences (AAEBM-18) April 24-25, 2018 Pattaya (Thailand)

Filamentous Fungi PKF121 Isolated from Dry Dipterocarp Forest Soil in Northeast Thailand Produces Antimicrobial Agents Active against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Phimpha Khowangklang and Nawarat Nantapong*

***Abstract*—** An antimicrobial-producing fungi PKF121 strain was isolated from dry dipterocarp forest soil in Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand. Morphological characteristics of PKF121 showed grayish green color, granular powdery colony and septate hyphae which indicated the genus *Penicillium*. The species level of PKF121 was determined by the internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis. The results of morphological characteristics and ITS sequence analysis, thus, concluded that PKF121 could be classified as *P. citrinum*. Antimicrobial activity analysis showed that PKF121 was active against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* as well as drug-resistant strain, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

***Keywords*—**Antimicrobial, *Penicillium*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA.

I. Introduction

Infectious diseases caused by pathogenic microorganisms including drug-resistant bacteria have been the leading cause of illness and death in human [1]. The major type of drug-resistant bacterial strains causing infectious diseases include methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE), penicillin-resistant *Streptococcus pneumonia* (PRSP) and multidrug-resistant *Clostridium difficile* (MDR) [2]. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major cause of hospital-acquired infection. It leads to a higher medical cost, prolonged hospital stay and increased mortality [3]. Thus, there is an increasing need of new and effective drugs for the treatment of infectious diseases. One potential source of novel antibiotics is microorganisms. Many previous studies have shown that antimicrobial-producing microorganisms are widely distributed in natural habitats, especially in soil [4-8]. Soil microorganisms are an important source for bioactive secondary metabolites such as antimicrobial drugs, anticancer drugs, insecticides and herbicides [9, 10]. Soil microorganisms that are commonly found to produce antibiotics include actinomycetes (70%), fungi (20%) and eubacteria (10%) [11]. In comparison to other natural sources, microorganisms is highly diverse but narrowly explored. The study based on the estimation of microbial populations has showed that only 1% of bacteria and 5% of fungi have been classified. The rest remain unexplored for their antimicrobial activity [12].

Soil fungi play an important role within the soil in relation to nutrient cycling and disease suppression [13, 14]. Since the 1940s, fungi have been used for the production of antibiotics [11]. Antimicrobial drugs produced by fungi include penicillin, cephalosporin, griseofulvin, fumagillin and fusidic acid [15-17]. Several methods were used for classification and identification of fungi which included colony morphology, cell morphology and ITS sequence analysis. However, the combination of macroscopic characteristics, microscopic characteristics and sequence analysis of ITS enabled an identification of fungi to the genus-species level [18, 19].

It has been reported that 32.1% of Thailand is covered by various forest habitats [20]. Although, the study of microbial diversity in Thailand have been conducted, an investigation of soil microorganisms including fungi from many part of Thailand remain unexplored. Thus, the present study was focused on the isolation and identification of antimicrobial-producing fungi from forest soil in Nakhon Ratchasima province, Thailand where the study of antimicrobial-producing fungi has never been reported.

II. Materials and Methods

A. Sample Collection

Soil Samples were collected from different area in Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand. Soil samples were randomly taken at 10-15 cm depth from surface. The soil were kept in polypropylene bags and transferred to the laboratory in icebox.

B. Media and Culture Conditions

Potato dextrose broth (PDB), potato dextrose agar (PDA) and Muller-Hinton agar (MHA) were purchased from Hi-Media, India. Sabouraud dextrose agar (SDA) was prepared by

[1]Phimpha Khowangklang and Nawarat Nantapong* are with the School of Preclinical Science, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand (e-mail: nawarat@sut.ac.th).

dissolving 10 g of peptone, 40 g of glucose and 15 g of agar in 1 L of water and adjusted a pH to 5.6. PDA and PDB medium were used for isolation and cultivation of fungi. Cultivation temperature of fungal strain was 28 ^{o}C. MHA and SDA were used for the determination of antimicrobial activity. The incubation temperature for antimicrobial activity test was 37 ^{o}C.

C. Strain of Test Pathogens

The pathogenic strains used in this study were purchased from Department of Medical Sciences Thailand (DMST) and Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). They were *Staphylococcus aureus* TISTR1466, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST20654 (MRSA), *Bacillus subtilis* TISTR008, *Bacillus cereus* TISTR687, *Candida albicans* TISTR5779, *Candida tropicalis* TISTR5174 and *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5049.

D. Isolation of Fungi from Soil Sample

One gram of soil samples was suspended in Erlenmeyer flask containing 99 ml sterile water and incubated at room temperature with shaking condition for 30 min. Soil suspension was serially diluted and spreaded onto PDA plates supplemented with 50 mg/l chloramphenicol. The plates were incubated at room temperature for 7-14 days. After incubation, the suspected fungal colonies were sub-cultured to PDA plates without antibiotics and used for further study.

E. Determination of Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity of soil isolates were determined by cross-streak method. The fungal isolate was inoculated on MHA or SDA by streaking at one side of a petri dish. MHA medium was used for bacterial sensitivity test while SDA medium was used for yeast sensitivity test. The plates were incubated at 28^{o}C for 5 days to allow the organisms to produce and release antimicrobial substance into the agar. After incubation, the test pathogens were streaked perpendicularly to the line of fungal colonies and incubated at 37^{o}C for 24-48 h. The zone of inhibition in millimeter against pathogenic strains was measured.

F. The Internal Transcribed Spacer (ITS) Region Sequencing and Sequence Analysis

Genomics DNA of fungal strain was isolated from cell grown in 10 ml PDB at 28^{o}C with 200 rpm shaking condition for 5 days. Extraction of fungal genomic DNA was performed as described by Al-Samarrai & Schmid (2000) [21]. The fungal genomic DNA was used as DNA template for PCR amplification of ITS region. The PCR amplification of ITS region was performed by using universal primer, ITS5 (5' – GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG – 3') and ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') [22]. The thermal cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95^{o}C for 5 min followed by 30 cycles of denaturation at 95^{o}C for 30 sec, annealing at 50^{o}C for 1 min, extension at 72^{o}C for 1 min and final extension at 72^{o}C for 7 min. The amplified fragments were purified using NucleoSpin® Gel and PCR clean-up kit (MACHEREY-NAGEL, Germany). The purified PCR product was submitted for DNA sequencing at Macrogen Inc., Korea. The sequence of ITS region was compared with known sequence from NCBI GenBank, database.

III. Results and Discussion

Natural compounds from soil microorganisms are the most important source for the production of bioactive agents used in pharmacy, industry and agriculture [23]. Antimicrobial metabolites play an important role in the treatment of bacterial and fungal infectious diseases [24]. The emergence of antibiotic-resistant bacteria decreases the efficacy of therapeutic drugs [25]. Therefore, it is necessary for the search of the novel effective antibiotics. In this study, we attempted to isolate the antimicrobial-producing fungi from forest soil in Suranaree University of Technology. This area is covered with dry dipterocarp forest. Dry dipterocarp forest soil is less water retention, sandy loam or gravel and low nutrients which could establish slightly extreme condition. Microorganisms live under an extreme condition usually produce the secondary metabolites such as antibiotics and other defensive compounds for their survival [26]. It has been shown that soil from dry dipterocarp forest in Suranaree University of Technology in northeast of Thailand contains a variety of antibiotic-producing actinomycetes [27]. Therefore, the screening and isolation of fungal strain from this area might lead to the discovery of antibiotic drugs to combat pathogenic organisms especially, drug-resistant strain.

A. Isolation and Classification of Soil Fungi PKF121

In this study we obtained antimicrobial-producing fungal strain, PKF121 from forest soil in Suranaree University of Technology, Thailand. This strain showed antimicrobial activity against test pathogens which were Gram-positive bacteria and yeasts. The identification of PKF121 was based on colony morphology, cell morphology and ITS sequence. The colony of PKF121 appeared grayish green color with a white periphery, granular powdery colony and the reverse side showed pale to yellowish in color on PDA medium (Fig. 1A-1B). PKF121 showed septate hyphae with globose to sub-globose conidia and philides flask shaped (Fig. 1C). From these results, it could be suggested that PKF121 might belong to the genus *Penicillium*. The macroscopic and microscopic characteristics of PKF121 are summarized in Table 1.

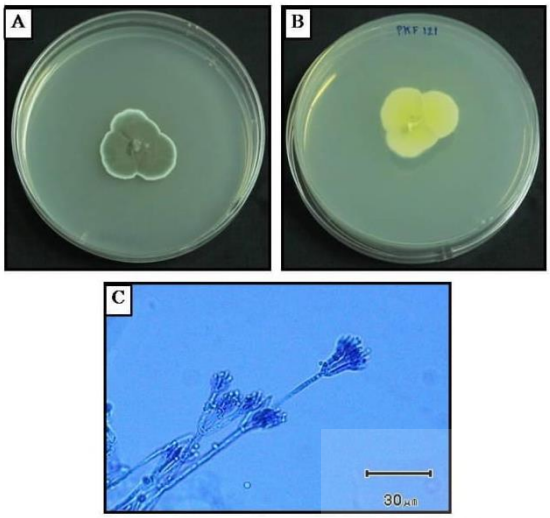


Fig. 1: The colony morphology of fungal isolate PKF121 on PDA medium: (A) obverse; (B) reverse. Cell morphology of PKF121 under light microscope (C)

TABLE 1:
MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC MORPHOLOGIES OF PKF121

Characteristics	Observation
Surface texture	Velutinous
Colony growth appear	Radially sulcate
Color of aerial mycelium	Greyish-turquoise with a white periphery
Color of the reverse	Pale yellow
Hyphae	Septate hyphae, Smooth-walled
Phialides	Flask-shaped
Conidia	Globose to sub-globose

The internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis was used for the identification of PKF121 in the species level. To amplify the ITS region of PKF121, ITS5 and ITS4 primers were used. The sequence of ITS region was blasted and aligned with known species from NCBI GenBank database. The blast result of PKF121 revealed 99% similarity to *Penicillium citrinum* strain IFM63148 (Fig. 2). Thus, this strain, could be classified as *Penicillium citrinum*.

```
  PKF121   1   GTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGGCCCCGCGCCCGCCGACGGCCCCCCTGAAC  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IFM63148  69  GTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGGCCCCGCGCCCGCCGACGGCCCCCCTGAAC  128
  PKF121   61  GCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAAAACTTTCAACAACGGA  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IFM63148  129 GCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAAAACTTTCAACAACGGA  188
  PKF121   121 TCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCA  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IFM63148  189 TCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCA  248
  PKF121   181 GAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGC  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IFM63148  249 GAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGC  308
  PKF121   241 ATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTcccc  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IFM63148  309 ATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCC  368
  PKF121   301 cccGCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCGCCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTAT  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IFM63148  369 CCCGCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTAT  428
  PKF121   361 GGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACCCCCAACCTTTAAT  420
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IFM63148  429 GGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACCCCCAACCTTTAAT  488
  PKF121   421 TATCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA  453
              |||||||||||||||||||||||||||||||
IFM63148  489 TATCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA  521
```

Fig. 2: Alignment sequence between ITS sequence of PKF121 and *Penicillium citrinum* IFM63148

B. Determination of Antimicrobial Activity of PKF121

The determination of antimicrobial activity of PKF121 was done by cross-streak method (Fig. 3). The pathogenic strains used in this study were *Staphylococcus aureus* TISTR1466, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST20654 (MRSA), *Bacillus subtilis* TISTR008, *Bacillus cereus* TISTR687, *Candida albicans* TISTR5779, *Candida tropicalis* TISTR5174 and *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5049. The antimicrobial activities of fungal strain PKF121 against test pathogens are shown in Table 2. The results indicated that PKF121 exhibited antibacterial activity toward methicillin-resistant *S. aureus*, *S. aureus, B. subtilis* and *B. cereus*. The strain PKF121 showed the highest activity against *B. subtilis* (42 mm.) followed by *B. cereus* (35 mm.), MRSA (29 mm.) and *S. aureus* (22 mm.). The PKF121 also showed antiyeast activity against *C. albicans* (17 mm.) and *S. cerevisiae* (8 mm.). Antimicrobial agent produced from PKF121, however, was not active against *C. tropicalis.*

In Thailand, the strains of antimicrobial-producing fungi were isolated from soil collected in Chiang Mai, Khon Kaen, Bangkok and Nakhon Si Thammarat. They were *Neosartoya hiratsukae, Neosartorya pseudofischeri, Neosartorya spinosa, Lasiodiplodia theobromae, Sclerotium rolfsii, Phytophthora*

palmivora, Colletotrichum capsici, Pyricularia grisea, Alternaria sp., Helminthosporium maydis, Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum, Colletotrichum gloeosporioides, Trichoderma harzianum, Aspergillus flavus, Trichoderma brevicompactum, Trichoderma atroviride, Fusarium solani and *Penicillium sp.* [28-31]. However, *P. citrinum* with antimicrobial and antiyeast activities was reported from Surat Thani province in southern part of Thailand [32]. To our best knowledge, this study provides the first report of antimicrobial producing *P. citrinum* isolate from soil in northeast of Thailand. It should be noted that PKF121 exhibited a relatively high antibacterial activity against MRSA. The study of PKF121 may lead to the development of antimicrobial drug to treat drug-resistant pathogenic strains. Thus, dry dipterocarp forest soil in Suranaree University of Technology has proven to be an attractive source for the search of antimicrobial substances.

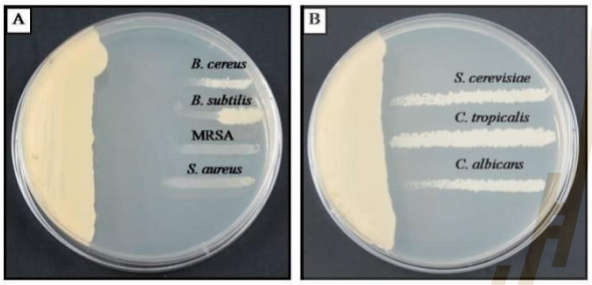


Fig. 3: Antimicrobial activity of fungal strain PKF121 against pathogenic bacteria (A) and yeasts (B) by cross-streak method

TABLE II:
ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PKF121 AGAINST TEST PATHOGENS BY CROSS-STREAK METHOD

Test pathogens	Zone of inhibition (mm)
Gram-positive bacteria	
Staphylococcus aureus TISTR1466	22
Staphylococcus aureus DMST20654 (MRSA)	29
Bacillus subtilis TISTR008	42
Bacillus cereus TISTR687	35
Yeasts	
Candida albicans TISTR5779	15
Candida tropicalis TISTR5174	0
Saccharomyces cerevisiae TISTR5049	8

IV. CONCLUSION

Fungal strain PKF121 was successfully isolated from dry dipterocarp forest soil in Suranaree University of Technology, Thailand. This strain was classified as *Penicillium citrinum*. It is active against test pathogens including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The study of this strain might be further use for the treatment of MRSA infections.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank Suranaree University of Technology for research funding through plant genetic conservation project under the Royal initiative of her Royal highness princess Maha Chakri Sirindhorn-Suranaree University of Technology (RSPG-SUT).

REFERENCES

[1] S. Lihan, Y. K. Choon, N. K. Hua and M. E. Wasli, "Screening for antimicrobial activity of fungi in soil samples collected from kubah national park," *International Journal Of Scientific & Technology Research*, vol. 3, pp. 9, Feb 2014.

[2] R. J. Fair and Y. Tor, "Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century," *Perspectives in Medicinal Chemistry*, vol. 6, pp. 25-64, Aug 2014.

[3] E. Klein, D. L Smith, and R. Laxminarayan, "Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 13, pp. 1840-1846, Dec 2007.

[4] J. O. Falkinham, T. E. Wall, J. R. Tanner, K. Tawaha, F. Q. Alali, C. Li and N. H. Oberlies, "Proliferation of antibiotic-producing bacteria and concomitant antibiotic production as the basis for the antibiotic activity of Jordan's red soils," A*pplied and Environmental Microbiology*, vol. 75, pp. 2735-2741, May 2009.

[5] A. Mashoria, H. S. Lovewanshi and B. S Rajawat, "Isolation of antimicrobial producing bacteria from soil samples collected from bhopal region of madhya pradesh, india," *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 3, pp. 563-569, Dec 2014.

[6] N. Soltani, R. Khavari-Nejad, Y. M. Tabatabaei, S. Shokravi and E. Fernandez-Valiente, "Screening of soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity," *Pharmaceutical Biology*, vol. 43, pp. 455-459, Mar 2005.

[7] O. Tabbene, I. B. Slimene, F. Bouabdallah, M. L. Mangoni, M. C. Urdaci and F. Limam, "Production of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus* activity from *Bacillus subtilis* sp. strain B38 newly isolated from soil," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 157, pp. 407-419, Jun 2009.

[8] S. Lihan, C. S. Lin, I. Ahmad, F. M. Sinang, N. K. Hua and A. A. Sallehin. (Jan 2014). Antimicrobial producing microbes isolated from soil samples collected from nanga merit forest in sarawak, malaysian borneo. *European Journal of Experimental Biology*. *[online]*. 4(1). pp. 494-501. Available: http://www.imedpub.com/articles/antimicrobial-producing-microbes-isolated-from-soil-samples-collected-from-nanga-merit-forest-in-sarawak-malaysian-borneo.pdf

[9] S. Donadio, P. Monciardini, R. Alduina, P. Mazza, C. Chiocchini, L. Cavaletti, M. Sosio and A. M. Puglia, "Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites," *Journal of Biotechnology*, vol. 99, pp. 187-198, Nov 2002.

[10] A. Sharma, N. Kumari and E. Menghani, "Bioactive secondary metabolites: an overview," *International Journal of Scientific & Engineering Research*, vol. 5, pp. 1395-1407, Apr 2014.

[11] M. Makut and O. Owolewa, "Antibiotic-producing fungi present in the soil environment of keffi metropolis, nasarawa state, nigeria," *Trakia Journal of Sciences*, vol. 10, pp. 33-39, 2011.

[12] M. Qadri, S. Johri, B. A. Shah, A. Khajuria, T. Sidiq, S. K. Lattoo, M. Z. Abdin, S. Riyaz-Ul-Hassan, "Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the western himalayas," *SpringerPlus*, vol. 2, pp. 14, Dec 2013.

[13] P. Bridge and B. Spooner, "Soil fungi: diversity and detection," *Plant and Soil*, vol. 232, pp. 147-154, May 2001.

[14] C. R. Penton, V. Gupta, J. M. Tiedje, S. M. Neate, K. Ophel-Keller, M. Gillings, P. Harvey, A. Pham, D. K. Roget, "Fungal community structure in disease suppressive soils assessed by 28S LSU gene sequencing," *PLoS One*, vol. 9, pp. 12, Apr 2014.

[15] U. Kück, S. Bloemendal and I. Teichert, "Putting fungi to work: harvesting a cornucopia of drugs, toxins, and antibiotics" *PLoS Pathogens*, vol. 10, pp. 4, Mar 2014.

[16] C. Hesseltine and J. Ellis, "Antibiotic-producing fungi: current status of nomenclature," *Advances in Applied Microbiology*; vol. 19, pp. 47-57, 1975.

[17] I. Ullah, N. A. Khan, M. A. Jadoon, H. U. Rehman, H. Khan, M. U. Rehman,A. H.ayat, S. Ali, M. Rehman, M. A. Khan, A. Maqsood and A. Sultana, "Isolation and identification of different Rhizospheres fungi of Mansehra region, Pakistan," *Journal of Entomology and Zoology Studies*,vol. 5, pp. 437-442, Feb 2017.

[18] T. W. K. Ko, S. L. Stephenson, A. H. Bahkali and K. D. Hyde, "From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes?," *Fungal Diversity*, vol. 50, pp. 113-120, Sep 2011.

[19] R. H. Nilsson, M. Ryberg, K. Abarenkov, E. Sjökvist and E. Kristiansson, "The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 296, pp. 97-101, Jul 2009.

[20] The World Bank group, "Forest area (% of land area)," *[online]*. Availiable: https://data.worldbank.org/indicator/AG.LND.FRST.ZS, 2015.

[21] T. H. Al-Samarrai and J. Schmid, "A simple method for extraction of fungal genomic DNA," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 30, pp. 53-6, Jan 2000.

[22] M. Gardes and T. D. Bruns, "ITS-RFLP matching for identification of fungi" in: J. P. Clapp, Ed. Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods. Totowa, NJ: Humana Press; 1996. pp. 177-86.

[23] S. A. Hassan, E. Hanif and R. R. Zohra, "Isolation and screening of soil bacteria for potential antimicrobial activity," *FUUAST Journal of Biology*, vol. 4, pp. 217-219, Dec 2014.

[24] M. El-Neketi, W. Ebrahim, W. Lin, S. Gedara, F. Badria, H. E. Saad, D. Lai, P. Proksch, "Alkaloids and polyketides from *Penicillium citrinum*, an endophyte isolated from the moroccan plant *Ceratonia siliqua*," *Journal of Natural Products*, vol. 76, pp. 1099-104, Jun 2013.

[25] C. L. Ventola, "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats," *Pharmacy and Therapeutics*, vol. 40, pp. 277-83, Apr 2015.

[26] F. Nadeem, M. Oves, H. Qari and I. Ismail, "Red sea microbial diversity for antimicrobial and anticancer agents," *Journal of Molecular Biomarker & Diagnosis*, vol. 7, pp. 14, Dec 2015.

[27] P. Chanthasena and N. Nantapong, "Biodiversity of antimicrobial-producing actinomycetes strains isolated from dry dipterocarp forest soil in northeast thailand," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 59, pp. 11, May 2016.

[28] S. Poeaim, K. Tongkantom, P. Jabamrung, O. Bo-kaew and M. Soytong, "Isolation, characterization and screening for anticancer and antimicrobial properties of the crude extract from genus *Neosartorya*," *Bioengineering and Bioscience*, vol. 4, pp. 71-5, 2016.

[29] W. Sanmanoch, W. Mongkolthanaruk, S. Kanokmedhakul, T. Aimi and S. Boonlue, "Isolation of ascomycetous fungi, *Neosartorya* spp. and screening for its antibacterial metabolites," *Journal of Life Sciences and Technologies*, vol. 1, pp. 180-183, Sep 2013.

[30] A. Jantasorn, J. Mongon, B. Moungsrimuangdee and T. Oiuphisittraiwat, "In vitro antifungal activity of soil fungi crude extracts isolated from riparian forest against plant pathogenic fungi," *Journal of Biopesticides*, vol. 9, pp. 119-124, Oct 2016.

[31] S. Wongthong, P. Bangrak, S. Phongpaichit, S. Somrithipol and P. Songkumarn, "Antimicrobial activity of soil fungi from khao nan national park, nakhon si thammarat province, thailand," *Journal of Pure and Applied Microbiology*, vol. 8, pp. 2999-3010, Aug 2014.

[32] K. Borwornwiriyapan, "Screening of soil fungi from plant genetic conservation project area, rajjaprabha dam, suratthani province which produced antimicrobial substance," M.S. Thesis, Dept. Microbiol., Prince of Songkla Univ., Songkla, Thailand, 2013.

สถาบันเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

ชื่อ-สกุล: ดร.นวรัตน์ นันทพงษ์

ตำแหน่งปัจจุบัน: ผู้ช่วยสาสตราจารย์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การศึกษา/คุณวุฒิ:

- ปริญญาเอก: 2548 Ph.D. (Bioresources Science: Applied microbiology), Tottori University, Japan
- ปริญญาโท: 2544 M.Sc. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์), มหาวิทยาลัยมหิดล
- ปริญญาตรี: 2541 B.Sc. (จุลชีววิทยา), มหาวิทยาเกษตรศาสตร์

ประวัติการทำงาน:

Period	Position	Institute/Firm
2007-present	Lecturer, Assistant Professor	Suranaree University of Technology, Thailand
2005-2006	Lecturer,	Kasetsart University of Technology, Thailand
		Head of Microbiology Department,
		Faculty of Veterinary Technology

รางวัลและเกียรติประวัติ:

2001-2005: Scholarship for Ph.D. Program at Tottori University: Monbukagakusho Scholarship of the Japanese Government, Japan

1998-2001: Scholarship for M.Sc. Program at Mahidol University: Development and Promotion of Science and Technology Talents Project, Institute for the Promotion of Teaching Science and Technology, Thailand

1997: Certificate and honorable pin for excellence undergraduate student: Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand

1996: Certificate and honorable pin for excellence undergraduate student: Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand

1995: Certificate and honorable pin for excellence undergraduate student: Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand

1995-1998: Scholarship for B.Sc. Program at Kasetsart University: Development and Promotion of Science and Technology Talents Project, Institute for the Promotion of Teaching Science and Technology, Thailand

ผลงานทางวิชาการ/ผลงานวิจัย:

Research Grants:

2017-present: Research Grants (1 **Grants**): National Research Council of Thailand/ Institute of Research and Development, Suranaree University of Technology, Thailand (Title: Antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of Actinomycetes isolated from soil)

2012-2013: Research Grants (1 **Grants**): National Research Council of Thailand/ Institute of Research and Development, Suranaree University of Technology, Thailand (Title: Biodiversity of Soil Fungi and Their Anti-microbial Substances 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)

2011: Research Grants (1 **Grants**): Plant Genetic Conservation Project Under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn/Institute of Research and Development, Suranaree University of Technology, Thailand (Title: 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)

2010-2011: Research Grants (1 **Grants**): National Research Council of Thailand/ Institute of Research and Development, Suranaree University of Technology, Thailand (Title: Isolation of thermotolerant *Corynebacterium glutamicum* from northeastern region of Thailand that have an ability to grow and efficiently produce glutamic acid at high temperature)

2007: Young Researchers Grant: The Research and Development Fund, Institute of Research and Development, Suranaree University of Technology, Thailand (Title: Study of thermotolerant glutamate producing strains of *Corynebacterium glutamicum*)

Referred Articles:

1. **Nantapong, N.**, Tanapongpipat, S., Cole, J., Panyim, S. (2002) Development of a method for heterologous gene expression in *Enterobacter amnigenus*, a potential host for the biological control of mosquito larvi. Journal of Microbiology Method. 49: 329-334.
2. Tanapongpipat, S., **Nantapong, N.**, Cole, J., Panyim, S. (2003) Stable integration and expression of mosquito-larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* into the chromosome of *Enterobacter amnigenus*: a potential breakthrough in mosquito biocontrol. FEMS Microbiology Letters. 221: 243-248.
3. **Nantapong, N.**, Kugimiya, Y., Toyama, H., Adachi, O., Matsushita, K. (2004) Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in *Corynebacterium glutamicum* KY9714. Applied Microbiology and Biotechnology. 66: 187-193.
4. **Nantapong, N.**, Otofuji, A., Migita, CT., Adachi, O., Toyama, H., Matsushita, K. (2005) Electron transfer ability from NADH to menaquinone and from NADPH to oxygen of Type II NADH dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 69: 149-159.
5. Kamonwannasit S., **Nantapong N.**, Kumkrai P., Luecha P., Kupittayanant S., Chudapongse N. *(2013).* Antibacterial activity of *Aquilaria crassna* leaf extract against *Staphylococcus epidermidis* by disruption of cell wall. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. *12:20.*
6. Chanthasena, P., and **Nantapong, N.** (2016). Biodiversity of Antimicrobial-Producing Actinomycetes Strains Isolated from Dry Dipterocarp Forest Soil in Northeast Thailand. Brazilian Archives of Biology and Technology. 59.
7. Chanthasena, P., and **Nantapong, N.** (2016). Antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. PJ90 isolated from soil in northeast Thailand. Jurnal Teknologi. 78(5-5), 45-50.
8. Matsutani, M., **Nantapong, N.**, Murata, R., Paisrisan, P., Hirakawa, H., Kataoka, N., Yakushi, T. and Matsushita, K. (2017). Complete genome sequencing of newly isolated thermotolerant *Corynebacterium glutamicum* N24 provides a new insights into its thermotolerant phenotype. Journal of Biotechnology. 247, 29-33.
9. Siritapetawee, J., Limphirat, W., **Nantapong, N.**, Songthamwat, D. (2018). Fabrication of silver chloride nanoparticles using a plant serine protease in combination with photo-activation and investigation of their biological activities. Biotechnology and applied biochemistry. 65, 572-579.
10. **Nantapong N**, Murata R, Trakulnaleamsai S, Kataoka N, Yakushi T, Matsushita K. The effect of reactive oxygen species (ROS) and ROS-scavenging enzymes, superoxide dismutase and catalase, on the thermotolerant ability of *Corynebacterium glutamicum*. Applied microbiology and biotechnology. 103(13), 5355-5366.

Patent:

1. Japanese patent No. 2014-159048: Manufacture method of the heat-resistant microbe; [Inventors] R. Akada, H. Hoshida, M. Yamada, M. Murata, T. Kosaka, K. Matsushita, T. Yakushi, **N. Nantapong**, Y. Azuma; [Applicant] Yamaguchi University and Kinki University; applied in August 4th, 2014.

Conference Abstracts:

1. **Nantapong, N.**, Toyama, H., Adachi, O., Matsushita, K. (2002) Energy metabolic engineering i n *Corynebacterium glutamicum*. The 3rd JSPS-NRCT Joint Seminar on Development of The rmo-tolerant Microbial Resources and Their Application, Chiang Mai University, Thailand.
2. **Nantapong, N.**, Toyama, H., Adachi, O., Matsushita, K. (2004) Effect of NADH-disruption and over-expression on the respiratory-related metabolism in *Corynebacterium glutamicum* KY97 14. Annual meeting of Japan society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Hiros hima University, Japan.
3. Nakano, Y., **Nantapong, N.**, Trakulnaleamsai, S., Matsutani, M., Hirakawa, H., Yakushi, T., Matsushita, K. (2010) Glutamate fermentation ability of higher temperature-dependent fermentative *Corynebacterium glutamicum* I2L. Ann. Meeting of Nippon Nhogei-kagaku-kai Society.
4. **Nantapong, N.**, Kamkhunthod, M., Tengking S., Gritsanapan W., Chudapongse, N. (2010). Antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and inhibition of glucose-stimulated oxygen consumption by *Garcinia mangostana*. Planta Medica. 76 (12): 1315-1315.
5. Chudapongse, N., Klahan, K., Kamkhunthod, M., Ratchawong, C., **Nantapong, N.** (2010). Antifungal activity against *Candida albicans* and effect on mitochondrial NADH oxidation of galangin. Planta Medica. 76 (12): 1296-1296.
6. Paisrisan, P., Pattanasiriwisawa, W., Chudapongse, N., **Nantapong, N**. (2011) Comparative analysis of *Corynebacterium glutamicum* and *Arthrobacter* spp. isolated from soil by using fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Asia Oceania Forum for Synchrotron Radiation Research.
7. Kamonwannasit S., Kumkrai P., **Nantapong N.**, Kupittayanant S, Chudapongse N. (2011). Antioxidant and antibacterial activities of the extract of *Aquilaria crassna* leaves. Planta Medica. 77 (12): 1396-1396.
8. **Nantapong N.**, Trakulnaleamsai S., Matsushita K. (2012). Glutamate fermentation in thermotolerant *Corynebacterium glutamicum*. **The 5th Satellite Seminar of JSPS-NRCT Asian Core Program**, Japan.

9. **Nangtapong N**, Trakulnaleamsai S, Matsutani M, Yakushi T, Kataoka N, Matsushia K. Role of SOD on thermotolerance in Corynebacterium glutamicum. Thailand Research Expo 2014; The 1st Joint Seminar New Core to Core Program, Bangkok Thailand, August 10th – 11th, 2014.
10. **Nangtapong N**, Nakano Y, Yakushi T, Kataoka N, Matsushia K. Role of SOD on thermotolerance in *Corynebacterium glutamicum*. The 66th Annual Meeting of Japan Biotechnology Society, Sapporo Japan, September 9th, 2014.
11. Chanthasena P and **Nantapong N**: Evaluation of antimicrobial activity of Actinomycetes isolated from soil against opportunistic pathogens. The 10th young scientist seminar, Establishment of international research network for tropical bioresources and their utilization. Yamaguchi Japan, November 16th – 17th, 2014.
12. **Nantapong N** and Chanthasena P :Phylogenetic analysis of antimicrobial-producing Actinomycetes isolated from Dry Dipterocarp Forest Soil in Northeast Thailand. 13th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology. Milan Italy, June 14th – 18th, 2015.
13. Chudapongse N, Weeranantanapan O, Doan H, **Nantapong N**: The cyanobacterial diversities of two different geothermal hot springs in Thailand. 13th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology. Milan Italy, June 14th – 18th, 2015.
14. Weeranantanapan O, **Nantapong N**, Doan H, Chudapongse H: Bacterial and archaeal diversities in San Kamphaeng hot spring, Chiangmai, Thailand. 13th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology. Milan Italy, June 14th – 18th, 2015.
15. **Nantapong N**, Trakulnaleamsai S, Matsutani M, Yakushi T, Kataoka N, Matsushia K. Glutamate Fermentation in Thermotolerant *Corynebacterium glutamicum*. International Joint Seminar Core to Core Program A. Advanced Research Networks "Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas (World-class research hub of tropical microbial resources and their utilization)" (Part of The Thailand Research EXPO 2018). Bangkok Thailand, August 13th, 2018.
16. **Nantapong N**, Trakulnaleamsai S, Matsutani M, Yakushi T, Kataoka N, Matsushia K. Development of Glutamate Fermentation by Using Thermotolerant *Corynebacterium glutamicum*. Core to Core Program A. Advanced Research Networks on Establishment of an international research core for bio-research fields with microbes from tropical areas (World-class research hub of tropical microbial resources and their utilization) The Final Joint Seminar. Yamaguchi Japan, December 2nd – 4th, 2018.

International Conference Proceedings:

1. Paisrisan P, Chudapongse N, **Nantapong N.** (2012). Improvement of L-glutamic acid production by a novel thermotolerant *Corynebacterium glutamicum* PP25. The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Thailand. 476-481 pp.
2. Paisrisan P, Chudapongse N, **Nantapong N.** (2013). Isolation and improvement a novel thermotolerant glutamic acid producing *Corynebacterium glutamicum* PP29 strain. Burapha University International Conference 2013, Thailand. 602-612 pp.
3. Khowangklang, P., **Nantapong, N**. (2018). Filamentous Fungi PKF121 Isolated from Dry Dipterocarp Forest Soil in Northeast Thailand Produces Antimicrobial Agents Active against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. 13th International Conference on Advances in Agricultural, Environmental, Biological and Medical Sciences. 44-48 pp.
4. Wakui H, Krubphachaya P, **Nantapong N**. Identification of Uncultured Cyanobacteria Based on 16s rRNA Gene. International Forum-Agriculture, Biology and Life Science 2019, Thailand. 23-37 pp.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี