

พิมพ์ ขอวางกลาง : การคัดแยกจุลินทรีย์สร้างสารต้านจุลชีพจากดิน (ISOLATION OF ANTIMICROBIAL-PRODUCING MICROORGANISMS FROM SOIL)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวรรตน์ นันทพงษ์, 93 หน้า

สายพันธุ์แอสเพอร์จิลลินแบคทีเรีย 77 สายพันธุ์ และเชื้อรา 177 สายพันธุ์ ได้ถูกแยกจากดินในเขตมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เชื้อเหล่านี้ได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านจุลชีพก่อโรค ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR1466 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST20654 (MRSA) *Bacillus subtilis* TISTR008 *Bacillus cereus* TISTR687 *Escherichia coli* TISTR780 *Enterobacter aerogenes* TISTR1540 *Salmonella typhi* TISTR292 *Proteus mirabilis* TISTR100 *Candida albicans* TISTR5779 *Candida tropicalis* TISTR5174 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5049 พบว่ามีเพียงเชื้อรา 11 สายพันธุ์ และเชื้อแอสเพอร์จิลลินแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยแอสเพอร์จิลลินแบคทีเรียสายพันธุ์ PKA45 และ PKA51 มีความสามารถในการสร้างสารต้านจุลชีพทดสอบทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ได้ดีที่สุด จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญดังกล่าวสามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินทั้งหมดจำนวน 17 สายพันธุ์มาจัดจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal transcribed spacer (ITS) region และยีนส์ 16S rRNA พบว่า เชื้อราทั้งหมด 11 สายพันธุ์ สามารถระบุชนิดได้ 4 ชนิด ที่พบเป็น กลุ่มใหญ่ คือ *Aspergillus* (45.5%) *Penicillium* (27.3%) *Talaromyces* (18.2%) และ *Clonostachys* (9.1%) และ 6 สายพันธุ์ของเชื้อแอสเพอร์จิลลินแบคทีเรีย พบว่า ทุกสายพันธุ์เป็นสมาชิกในกลุ่ม *Streptomyces* และจากการศึกษาแผนภูมิวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PKA45 มีสายวิวัฒนาการที่แยกออกไปจากเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง คือเชื้อ *Streptomyces sioyaensis* ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PKA45 อาจจะเป็นสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อ *Streptomyces sioyaensis* จากผลการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพก่อโรค เชื้อแอสเพอร์จิลลินแบคทีเรียสายพันธุ์ PKA45 และ PKA51 ที่สามารถสร้างสารต้านจุลชีพที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างได้ถูกคัดเลือกนำมาใช้ในการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะเวลาในการบ่ม และชนิดของสารสกัดต่อการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน และระยะเวลาการบ่มที่ต่างกันมีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพทดสอบ โดยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร MHB และใช้ระยะเวลาในการบ่ม 3 วัน เชื้อจะผลิตสารต้านจุลชีพทดสอบได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ให้ผลการต้านจุลชีพทดสอบทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ได้ดีที่สุด ผลจากการศึกษาในครั้งนี้

พบว่าเชื้อแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ PKA45 และ PKA 51 สามารถสร้างสารต้านจุลชีพก่อโรคได้ดีที่สุด รวมทั้งเชื้อคือยาสายพันธุ์ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST20654 (MRSA) ดังนั้นการศึกษาสารออกฤทธิ์และการทำให้สารออกฤทธิ์บริสุทธิ์อาจถูกนำมาศึกษาเพิ่มเติมเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ MRSA นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังเป็นการรายงานการคัดแยกเชื้อ *Streptomyces sioyaensis* จากดินในประเทศไทย ที่สามารถสร้างสารต้านจุลชีพก่อโรคได้เป็นครั้งแรก



สาขาวิชาปรสิตวิทยา
ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนักศึกษา พริมาภ.
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา พริมาภ.

PHIMPHA KHOWANGKLANG : ISOLATION OF ANTIMICROBIAL-
PRODUCING MICROORGANISMS FROM SOIL. THESIS ADVISOR :
ASST. PROF. NAWARAT NANTAPONG, Ph.D. 93 PP.

ACTINOBACTERIA/ METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
STREPTOMYCES SIOYAENSIS/ ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Total of 77 actinobacteria strains and 177 fungal strains were isolated from soil in Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand. They were used for the screening of their antimicrobial activity against selected bacterial pathogens. They were *Staphylococcus aureus* TISTR1466, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST20654 (MRSA), *Bacillus subtilis* TISTR008, *Bacillus cereus* TISTR687, *Escherichia coli* TISTR780, *Enterobacter aerogenes* TISTR1540, *Salmonella typhi* TISTR292, *Proteus mirabilis* TISTR100, *Candida albicans* TISTR5779, *Candida tropicalis* TISTR5174 and *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5049. Eleven strains of fungi and 6 of actinobacteria isolates showed antimicrobial activity against test pathogens. Among them, PKA45 and PKA51 showed highest antimicrobial activity against gram-positive bacteria, gram-negative bacteria and yeasts. A total of 17 antimicrobial-producing soil isolates were used for identification of antimicrobial-producing soil microorganisms by internal transcribed spacer (ITS) region and 16S rRNA gene sequences analysis. The result showed that 11 antimicrobial-producing fungi isolates were classified into four genera. The dominant genera found in this area were the genus *Aspergillus* (45.5%). Others were

Penicillium (27.3%), *Talaromyces* (18.2%) and *Clonostachys* (9.1%). Six strains of actinobacteria were assigned into the genus *Streptomyces*. The phylogenetic tree analysis of 16S rRNA gene sequence showed that PKA45 are not clustered with known reference strain, *Streptomyces sioyaensis*. Thus, PKA45 might be suggested a new strain of *Streptomyces sioyaensis*. Based on the results of preliminary screening of antimicrobial activity against test pathogens from antimicrobial-producing soil isolates, PKA45 and PKA51 were more active against all the test pathogens. Thus, they were selected to study the effects of culture media, incubation periods and extraction solvents on antimicrobial activity against test pathogens. The cultivation of actinobacteria with different culture media and different incubation time affected for the antimicrobial activity against test pathogens. PKA45 and PKA51 showed highest antimicrobial activity with MHB medium on 3rd day of incubation time. In addition, the crude ethyl acetate of PKA45 and PKA51 exhibited high activity against gram-positive bacteria, gram-negative bacteria and yeast. In conclusion, antimicrobial-producing actinobacteria, PKA45 and PKA51 exhibited highest antimicrobial activity against test pathogens including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST20654 (MRSA). This study of active compound and purification of active ingredient from these strains might be further used for the treatment of MRSA infection. To our best knowledge, this study constitutes the first antimicrobial properties of *Streptomyces sioyaensis* isolated from soil in Thailand.

School of Preclinic

Academic Year 2017

Student's Signature 

Advisor's Signature 