

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแยกและคัดกรองแอกติโนไมซีสต์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ
จากดินในลำธารลอด

ผู้เขียน นายภูวศล เหล่าอากาศกุล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร. วสุ ปฐมอารีย์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ศ. ดร. สายสมร ถ้ายอง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร. อุษณีย์ อนุกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

แอกติโนไมซีสต์เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบได้ทั่วไปและมีจำนวนมากในดิน มีคุณสมบัติสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ จึงทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์จากดินในลำธารลอดอำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรีโดยวิธี dilution spread plate บนอาหาร 4 ชนิดได้แก่ starch casein agar, 1/100 starch casein agar, glucose yeast extract agar และ 1/100 glucose yeast extract agar สามารถแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์ได้ทั้งหมดจำนวน 50 ไอโซเลท นำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะโดยวิธี cross streak บนอาหาร glucose yeast extract agar กับเชื้อทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Paenibacillus larvae* ATCC 13537 และ *Staphylococcus aureus* TISTR029 พบว่ามีเชื้อจำนวน 17 ไอโซเลทผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด โดยในจำนวนนี้มี ไอโซเลท No. 8 และ No. 32 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทุกชนิด นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท No. 4 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ได้ดีที่สุดในวิธี antibiosis assay จึงนำไอโซเลท No. 4 มาเลี้ยงในอาหารเหลวหมัก yeast protein soluble starch เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารปฏิชีวนะ ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าเกิดวงใสกว้างที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวโพด 1.5% เป็นแหล่งคาร์บอน, soybean meal 0.4%

เป็นแหล่งไนโตรเจน, $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.5% และ K_2HPO_4 0.1% ที่ระดับ pH เท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C และเชื้อสร้างสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุดในวันที่ 14 โดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้น 5% คัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดี จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท No.4, No. 6, No. 8, No. 9, No. 13, No. 16, No. 27 และ No. 32 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าทุกไอโซเลทเป็นเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในสกุล *Streptomyces* โดยไอโซเลท No. 4 มีความคล้ายคลึงกับ *S. tendae* ATCC 19812^T ไอโซเลท No. 6 มีความคล้ายคลึงกับ *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* NBRC 12789^T ไอโซเลท No. 8 มีความคล้ายคลึงกับ *S. lucensis* NBRC 13056^T ไอโซเลท No. 9 มีความคล้ายคลึงกับ *S. cavourensis* NBRC 13026^T ไอโซเลท No. 13 มีความคล้ายคลึงกับ *S. angustmycinicus* NBRC 3934^T ไอโซเลท No. 16 มีความคล้ายคลึงกับ *S. albolongus* NBRC 13465^T ไอโซเลท No. 27 มีความคล้ายคลึงกับ *S. griseus* subsp. *griseus* KCTC 9080^T และไอโซเลท No. 32 มีความคล้ายคลึงกับ *S. griseoplanus* AS 4.1868^T ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าถ้าธารลดเป็นแหล่งอันอุดมไปด้วยเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้

Thesis Title	Isolation and Screening of Antibiotic Producing Actinomycetes from Thanlod Cave Soils	
Author	Mr. Puwadon Lawapakull	
Degree	Master of Science (Biotechnology)	
Thesis Advisory Committee		
	Dr. Wasu Pathom-aree	Advisor
	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Co-advisor
	Dr. Usanee Anukool	Co-advisor

ABSTRACT

Actinomycetes are Gram positive bacteria that widely distributed in soils. In this study, actinomycetes were isolated from Thanlod cave soils by dilution spread plate technique on 4 selective media namely, starch casein agar, 1/100 starch casein agar, glucose yeast extract agar and 1/100 glucose yeast extract agar. A total of 50 actinomycetes were isolated and tested for their antibiotic production by cross streak method against 5 test organisms; *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Paenibacillus larvae* ATCC 13537 and *Staphylococcus aureus* TISTR029. The results showed that 17 isolates (34%) were able to inhibit the growth of at least 1 test organism. Among these, 2 isolates designated as No. 8 and No. 32, could inhibit the growth of all test organisms. In addition, isolate No. 4 was found to inhibit the growth of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by antibiosis assay. Isolate No.4 was grown in yeast protein soluble starch broth to determine the optimum conditions for its antibiotic production using paper disc diffusion method. Isolate No. 4 gave the widest zone of inhibition when it was grown in liquid media containing 1.5% corn starch, 0.4% soybean meal, 0.5% MgSO₄.2H₂O and 0.1% K₂HPO₄, pH 7.0 at 30°C. The maximum antibiotic production was reached on the 14th day

of cultivation using 5% inoculum. Eight isolates with good inhibitory activity isolates namely No. 4, No. 6, No. 8, No. 9, No. 13, No. 16, No. 27 and No. 32 were selected for morphological, chemotaxonomic and 16S rRNA gene sequence analysis. All isolates were found to be members of the genus *Streptomyces*. Isolates No. 4 was closely related to *S. tendae* ATCC 19812^T, isolate No. 6 to *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* NBRC 12789^T, No. 8 to *S. lucensis* NBRC 13056^T, No. 9 to *S. cavourensis* NBRC 13026^T, No. 13 to *S. angustmycinicus* NBRC 3934^T, No. 16 to *S. albolonus* NBRC 13465^T, No. 27 to *S. griseus* subsp. *griseus* KCTC 9080^T and No. 32 to *S. griseoplanus* AS 4.1868^T. These results show that Thanlod cave is a rich source of antibiotic producing actinomycetes.