



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการความหลากหลายและการสร้างไซเตอโรฟอร์มของ
แอคติโนมัยซีทจากตะกอนชายฝั่งทะเลตะวันออกของไทย

โดย ดร. วสุ ปฐมอารีย์

ธันวาคม ๒๕๕๖

สัญญาเลขที่ MRG5380001

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการความหลากหลายและการสร้างไซเตอโรฟอร์มของ
แอคติโนมัยซีทจากตะกอนชายฝั่งทะเลตะวันออกของไทย

ดร. วสุ ปฐมอารีย์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย

สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

รหัสโครงการ : MRG5380001

ชื่อโครงการ : ความหลากหลายและการสร้างไซโตโรฟอรัสของแอคติโนมัยซีทจากดินตะกอนชายฝั่งทะเลตะวันออกของไทย

ชื่อนักวิจัย : ดร. วสุ ปฐมอารีย์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address : wasu.p@cmu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

แอคติโนมัยซีทเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกวีนินและไซโตซินในสารพันธุกรรมสูง มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดได้ดี โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะ ซึ่งเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตยาปฏิชีวนะที่มีใช้ในปัจจุบัน อีกทั้งยังเป็นแหล่งในการค้นหาสารปฏิชีวนะตัวใหม่ๆ แต่ผลการศึกษานิเวศวิทยาจุลินทรีย์ทางชีววิทยาโมเลกุลแสดงให้เห็นว่ามากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพที่ซ่อนเร้นอยู่นี้เป็นแหล่งที่ดีในการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินตะกอนชายฝั่งทะเลของไทยโดยใช้เทคนิคแบบเพาะเลี้ยง และทำการบ่งชี้ชนิดโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะกับเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวนทั้งหมด 25 ชนิด สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลตคัดเลือกเชื้อที่ได้มาทำการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA จำนวน 16 ไอโซเลตพบว่าจัดเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล จัดอยู่ในสกุล *Jishengella* 1 ไอโซเลต *Microbispora* 5 ไอโซเลต, *Micromonospora* 6 ไอโซเลต และ *Verrucosispora* จำนวน 4 ไอโซเลต ทั้งนี้เชื้อในสกุล *Microbispora* ที่แยกได้จำนวน 3 ไอโซเลต *Verrucosispora* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *Jishengella* 1 ไอโซเลต มีแนวโน้มสูงที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อโดยละเอียดต่อไป จากการศึกษาความสามารถในการผลิตไซโตโรฟอรัสบนอาหาร CAS พบว่า 22 ไอโซเลต (81 %) สร้างวงสีส้ม เมื่อนำมาทดสอบหาชนิดและปริมาณไซโตโรฟอรัสในอาหารเหลวพบว่าทุกไอโซเลตสร้างไซโตโรฟอรัสชนิด catecholate และ hydroxamate ในปริมาณที่ต่ำในช่วง 3.68-35.79 $\mu\text{mol/g}$ และ 11.67 – 85.83 $\mu\text{mol/g}$ ตามลำดับ

คำหลัก : แอคติโนมัยซีท ความหลากหลาย ไซโตโรฟอรัส ดินตะกอนชายฝั่งทะเล

Abstract

Project Code : MRG5380001

Project Title : Diversity and siderophore production of actinomycetes from coastal sediments of eastern Thailand

Investigator : Dr. Wasu Pathom-aree
Faculty of Science Chiang Mai University

E-mail Address : wasu.p@cmu.ac.th

Project Period : 3 years

It is now accepted that actinomycetes are widely distributed in the world's oceans and amongst which are truly indigenous marine taxa. It is also becoming increasingly clear that marine actinomycetes present a major resource for biotechnology search and discovery. Twenty-seven actinomycetes strains were isolated from 2 coastal marine sediments using dilution plate technique and 25 media designed for the selective isolation of specific actinomycetes taxa. A total of 27 isolates were recovered. Sixteen isolates were selected for 16S rRNA gene sequence analysis. Phylogenetic analyses based on a 16S rRNA gene sequences showed that these isolates belonged to the genera *Jishengella* (1), *Microbispora* (5), *Micromonospora* (6) and *Verrucosipora* (4). Three *Microbispora*, 2 *Verrucosipora* and 1 *Jishengella* isolates may represent a novel species. Twenty two isolates (81%) could produce siderophores on CAS assay plate. All of these isolates produced both catecholate and hydroxamate type siderophores. However, siderophore yield was low in the range of 3.68-35.79 $\mu\text{mol/g}$ and 11.67 – 85.83 $\mu\text{mol/g}$ for catecholate and hydroxamate types, respectively.

Keywords : actinomycetes, diversity, siderophore, coastal marine sediment

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

แอกติโนไมยีสเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกวีนีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) ในสารพันธุกรรมสูงกว่า 55 % สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเฉพาะในดิน (Goodfellow and Simpson, 1987) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีส่วนช่วยในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุในสิ่งแวดล้อม ที่สำคัญคือมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ (Bérdy, 1994, 2005; Demain, 2000; Lazzarini *et al.*, 2000) โดยประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของสารปฏิชีวนะที่มีจำนวนมากกว่า 16,500 ชนิดในปัจจุบัน ผลิตมาจากแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนไมยีส โดยมีแอกติโนไมยีสในสกุล *Streptomyces* มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะได้มากเป็นอันดับที่หนึ่ง ส่วนอันดับรองลงมาได้แก่สมาชิกของตระกูล *Micromonosporaceae* (Bérdy, 2005)

ทะเลและมหาสมุทรเป็นแหล่งธรรมชาติที่ยังมีการศึกษาน้อยมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านจุลชีววิทยา ถึงแม้ว่าจะมีการค้นพบว่าทะเลและมหาสมุทรเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของเชื้อจุลินทรีย์มากมายหลายชนิดรวมทั้งแอกติโนไมยีส (Pathom-aree *et al.*, 2006; Gontang *et al.*, 2007) ในช่วงเวลาไม่กี่ปีมานี้มีผู้รายงานการค้นพบเชื้อแอกติโนไมยีสสายพันธุ์ใหม่ๆ จากทะเลอยู่เสมอ (Maldonado *et al.*, 2005; Pathom-aree *et al.*, 2006a, b, c; Yi *et al.*, 2007; Lee, 2008; Lee and Lee, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009) แต่ข้อมูลที่มีนั้นที่มาจากต่างประเทศเกือบทั้งหมด โดยในประเทศไทยมีเพียงการรายงานการค้นพบแอกติโนไมยีสสายพันธุ์ใหม่จากดินป่าชายเลนฝั่งทะเลอันดามัน (Thawai *et al.*, 2008) ทำให้ขาดข้อมูลพื้นฐานความหลากหลายของแอกติโนไมยีสในระบบนิเวศทางทะเลของประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทยมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาความหลากหลายของแอกติโนไมยีส

ไซเดอโรฟอรั (siderophore) เป็นสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเพื่อจับธาตุเหล็กในธรรมชาติ ซึ่งมีรายงานว่า จุลินทรีย์หลายชนิดรวมทั้งแอกติโนไมยีสสามารถผลิตสารชนิดนี้ได้ ในทะเลเป็นสภาวะแวดล้อมที่สารอาหารต่างๆอยู่ในสภาวะเจือจาง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าไซเดอโรฟอรัที่แอกติโนไมยีสที่แยกได้จากระบบนิเวศทางทะเล เช่น ตะกอนชายฝั่งทะเล จะมีประสิทธิภาพในการจับเหล็กได้ดีกว่าเชื้อที่เจริญในดินโดยทั่วไป สารไซเดอโรฟอรันี้มีสมบัติสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ รวมทั้งยังเป็นสารส่งเสริมการเจริญของพืชอีกด้วย จึงมีการนำมาใช้ในการเกษตรเพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคพืช และเร่งการเจริญเติบโตของพืช โดยในการศึกษารังนี้ผู้วิจัยจะเก็บตัวอย่างตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกนำมาแยกเชื้อแอกติโนไมยีสและศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อที่แยกได้ รวมทั้งทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มไซเดอโรฟอรั ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ และการนำเชื้อที่มีศักยภาพมาใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทจากตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายของแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ และอนุกรมวิธานของเชื้อสายพันธุ์ใหม่
3. เพื่อทดสอบความสามารถของแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ในการสร้างสารไซเดอโรฟอรั

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้จากผลงานวิจัยนี้ คือได้ข้อมูลความหลากหลายของเชื้อแอกติโนมัยสีทในตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้พบแอกติโนมัยสีทชนิดใหม่ และสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารไซเดอโรฟอรั ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ทางการเกษตรโดยใช้ทดแทนสารเคมี จะช่วยลดอันตรายจากการปนเปื้อนของสารเคมีในระบบนิเวศ

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทยในเขตจังหวัดชลบุรี ระยองและจันทบุรี (ทั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา) นำดินมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและร่อนให้ละเอียดก่อนนำมาแยกเชื้อ

1.2 การแยกเชื้อ

นำตัวอย่างดินตะกอนมาทำการเจือจางแบบลำดับส่วนจนถึงระดับความเจือจางที่เหมาะสมแล้ว ปิเปตสารละลายแขวนลอยของตะกอนดินมาเกลี่ยบนอาหารที่จำเพาะต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีท (Pathom-aree et al., 2005) บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิห้อง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะของแอกติโนมัยซีทมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหารที่เหมาะสม

2. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อ

คัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 16 ไอโซเลตมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อตามวิธีของ Pathom-aree et al. (2005) เพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคโพลีเมอร์เชน รีแอคชัน (Polymerase chain reaction) หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้โดยใช้เครื่อง ABI automated DNA sequencer แล้วเชื่อมต่อลำดับเบสของยีน 16S rRNA ที่ได้ให้สมบูรณ์ และทำ sequence alignment ของยีน 16S rRNA ด้วยโปรแกรม Phydit และสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยโปรแกรม Treecon

3. อนุกรมวิธานของเชื้อสายพันธุ์ใหม่

ในกรณีที่พบเชื้อสายพันธุ์ใหม่จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA นำเชื้อสายพันธุ์ใหม่ดังกล่าวมาทำการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ (genotypic characterization) และฟีโนไทป์ (phenotypic characterization) ด้วยเทคนิคโพลีเฟสิก (polyphasic)

4. การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตไซเดอโรฟอร์

ทดสอบความสามารถของแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ในการสร้างไซเดอโรฟอร์ในอาหาร Chrome Azurol S (CAS) ตามวิธีของ Fiss & Brooks (1991) โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast Extract Agar (GYEA) นาน 7 วัน เจาะชิ้นวัฏบริเวณที่เชื้อเจริญขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm นำไปวางบนอาหารทดสอบ CAS agar plate โดยวางจำนวน 4 จุด บนอาหารทดสอบ (มีเชื้อแอกติโนมัยซีท *Dermacoccus* sp. เป็นเชื้อควบคุมการสังเกตผลบวกของการสร้างไซเดอโรฟอร์) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด นาน 7 วัน แล้วสังเกตและวัดขนาดของวงกลมสีส้ม-เหลืองบริเวณโดยรอบโคโลนีของแอกติโนมัยซีทที่เกิดขึ้น บันทึกขนาดวงสีเหลืองส้มรอบโคโลนีที่สามารถสร้างสารไซเดอโรฟอร์ได้ คัดเลือกเชื้อที่สร้างวงสีเหลืองขนาดใหญ่มาทดสอบหาชนิดและปริมาณไซเดอโรฟอร์ที่ผลิตได้ในอาหารเหลว

5. การทดสอบชนิดและปริมาณของไฮเดอโรฟอรัส

นำแอกติโนไมซีสต์ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหาร King B agar (ดัดแปลง ตามวิธีของ King *et al.*, 1954) เป็นเวลา 7 วัน ใช้ปลาย Pasteur's pipette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. เจาะชั้นวุ้นที่มีการเจริญของโคโลนีแอกติโนไมซีสต์ จำนวน 1 ชั้น ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร King B broth ปริมาตร 10 มล. นำไปปั่นบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวนที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำมาทดสอบต่อในข้อ 5.1 และ 5.2

5.1 การหาปริมาณ Hydroxamate siderophore โดยวิธี Iron-perchlorate assay (Atkin *et al.*, 1970)

นำอาหารเหลวที่มีการเจริญของเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ใช้ auto pipette ตูดน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 0.5 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำละลาย ferric perchlorate 2.5 มล. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ถ้าเชื้อสามารถผลิต hydroxamate siderophore ได้ สีน้ำเลี้ยงจะเปลี่ยนจากสีใสเป็นสีส้มแดง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเหลว King B 0.5 มล. ผสมกับสารละลาย ferric perchlorate 2.5 มล. เป็น blank (กรณีน้ำเลี้ยงมีเชื้ออาหารเหลว King B 0.5 มล. ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2.5 มล. เป็น blank จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ 0.5 มล. ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2.5 มล. เพื่อหาผลต่างของค่านี้ และค่าที่ได้จากการผสมกับ ferric perchlorate) นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณความเข้มข้นของ hydroxamate โดยใช้ Desferrioxamine mesylate เป็นสารมาตรฐาน

5.2 การหาปริมาณ Catecholate siderophore โดยวิธี Arnow's method (Arnow, 1937)

นำอาหารเหลวที่มีการเจริญของเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ใช้ auto pipette ตูดน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำ 0.5 M HCl 1 มล. และ nitrite-molybdate reagent 1 มล. ผสมให้เข้ากัน เมื่อสารละลายเป็นสีเหลือง เติมน้ำ 1 M NaOH 1 มล. และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ถ้าเชื้อสามารถผลิต catecholate siderophore ได้ สีน้ำเลี้ยงจะเปลี่ยนจากสีใสเป็นสีแดง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเหลว King B 1.0 มล. ผสมกับ nitrite-molybdate reagent 1 มล. และ 1 M NaOH 1 มล. เป็น blank (กรณีน้ำเลี้ยงมีเชื้ออาหารเหลว King B 1.0 มล. ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2.0 มล. เป็น blank จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ 1.0 มล. ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2.0 มล. เพื่อหาผลต่างของค่านี้ และค่าที่ได้จากการผสม nitrite-molybdate reagent 1 มล. และ 1 M NaOH 1 มล.) นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณความเข้มข้นของ catecholate siderophore โดยใช้ 2,3-dihydroxybenzoic acid เป็นสารมาตรฐาน

6. การเก็บรักษาเชื้อ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ เก็บเซลล์หรือสปอร์ที่ได้ในสารละลายกลีเซอรอล 20% และรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ผลการทดลอง

1. ตัวอย่างที่นำมาศึกษา

ตัวอย่างดินตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในเขตจังหวัดระยองจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1 (ปากคลองตากวน) และตัวอย่างที่ 3 (หนองแพบ) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา) นำดินมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและร่อนให้ละเอียดก่อนนำมาแยกเชื้อ

2. การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำตัวอย่างดินตะกอนมาทำการเจือจางแบบลำดับส่วนจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-1} นำไปเขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารแขวนลอยที่ได้มาเกลี่ยบนอาหารแยกเชื้อจำนวน 25 ชนิด ได้แก่ Marine agar, Marine agar + catalase, Marine agar + catalase + super oxide dismutase, R2A agar, R2A agar + artificial seawater, Tryptic soy agar, Tryptic soy agar + catalase + superoxide dismutase, Water-proline agar, Water-proline agar + artificial seawater, Water-proline gellan gum, Raffinose-histidine agar, Raffinose-histidine gellan gum, Gauze No.2 agar, Gauze No.2-gellan gum, Gauze No.2 agar + catalase, Gauze No.2 agar + catalase + superoxide dismutase, Waksman agar, Waksman agar + catalase, Waksman agar + catalase + superoxide dismutase, Nutrient agar, Nutrient agar + catalase + superoxide dismutase, Water agar, Glucose-peptone-meat extract agar + ascorbic acid, Glucose-peptone-meat extract agar + rutin และ Glucose-peptone-meat extract agar + artificial seawater อาหารทุกชนิดเติมสารยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-4 สัปดาห์ จึงนำมาเขี่ยโคโลนีของแอคติโนมัยซีทมาทำให้บริสุทธิ์

จากการศึกษาพบว่าหลังจากบ่มจานอาหารไว้เป็นเวลา 1-4 สัปดาห์ จะพบการเจริญของแอคติโนมัยซีทบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยด้วยสารแขวนลอย (รูปที่ 1) เก็บโคโลนีแอคติโนมัยซีทที่เจริญขึ้นมา นำมาทำให้บริสุทธิ์พบว่าสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมดจำนวน 27 ไอโซเลต(ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยสีทจากดินตะกอนตัวอย่าง 1 บนอาหาร Gauze No.2 agar เมื่อปมไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 สัปดาห์

3. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อ

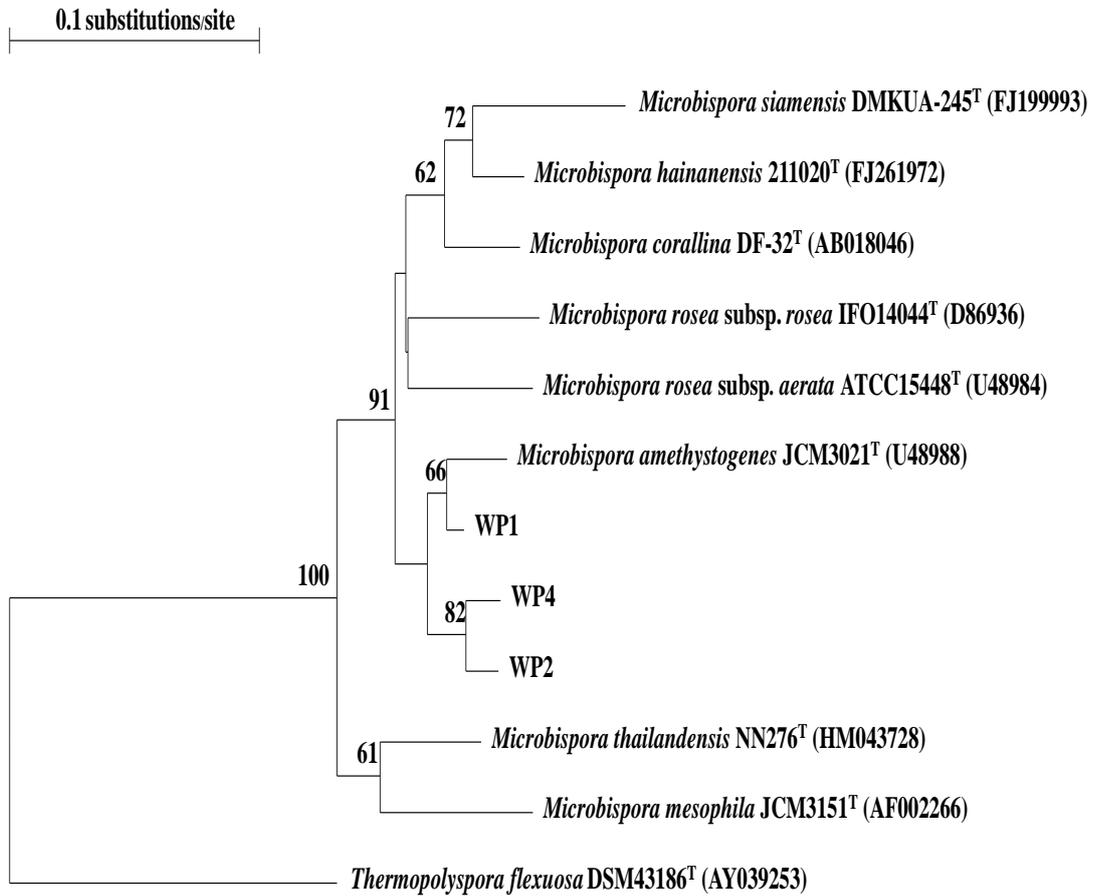
คัดเลือกแอกติโนมัยสีทจำนวน 16 ไอโซเลตมาจัดจำแนกชนิดของเชื้อโดยหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าจัดอยู่ในสกุล *Microbispora* 5 ไอโซเลต สกุล *Verrucosipora* 4 ไอโซเลต และสกุล *Jishengella* 1 ไอโซเลต ส่วนอีก 6 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* เมื่อนำลำดับของยีน 16S rRNA มาสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับเชื้อใกล้เคียงได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 จะเห็นได้ว่าในกรณีของเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุล *Microbispora* ที่แยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลต คือ WP1, WP2 และ WP4 มีแนวโน้มที่จะเป็นเชื้อชนิดใหม่ในสกุล *Microbispora* โดยมีค่า similarity value ในช่วง 98.69 – 99.42% และตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (รูปที่ 2) ที่แยกแขนงออกมาจากเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุด โดยเฉพาะไอโซเลต WP2 และ WP4 ซึ่งต้องทำการศึกษานุกรมวิธานโดยละเอียดแบบ polyphasic ต่อไปเพื่อยืนยันสถานะความเป็นเชื้อใหม่ ในทำนองเดียวกันสำหรับเชื้อในสกุล *Jishengella* (ไอโซเลต WP11) และ *Verrucosipora* ที่แยกได้ 2 ไอโซเลต คือ WP15 และ WP17 มีแนวโน้มที่จะเป็นเชื้อชนิดใหม่ในสกุล *Verrucosipora* โดยมีค่า similarity value ในช่วง 99.06 – 99.63% (ตารางที่ 2) และตำแหน่งบนแผนภูมิต้นไม้ (รูปที่ 3) ที่แยกแขนงออกมาจากเชื้อที่ใกล้เคียงที่สุด ซึ่งต้องมีการศึกษานุกรมวิธานโดยละเอียดแบบ polyphasic ต่อไปเพื่อยืนยันสถานะความเป็นเชื้อใหม่ของไอโซเลตดังกล่าว

ตารางที่ 1 ตัวอย่างดินตะกอนและจำนวนแอกติโนมัยสีทที่แยกได้

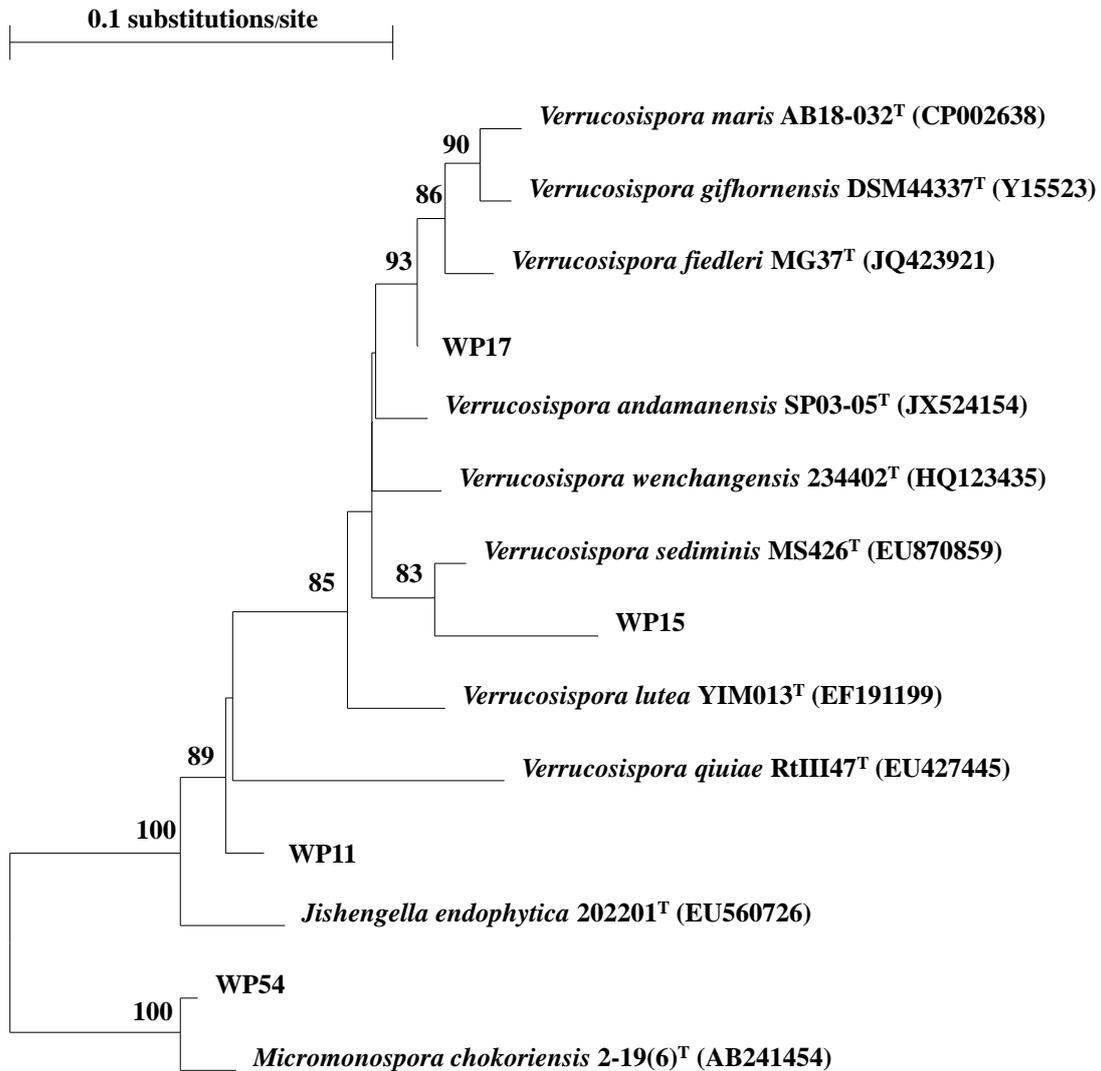
No	Code	Sample	Selective media
1	WP1	1	R2A
2	WP2	1	R2A
3	WP3	3	R2A
4	WP4	1	Tryptic Soy Agar (TSA)
5	WP5	3	TSA+Superoxide dismutase+Catalase
6	WP6	1	Water-proline
7	WP7	3	Water-proline
8	WP8	3	Water-proline
9	WP9	1	Raffinose-Histidine-gellan gum
10	WP10	3	Raffinose-Histidine-gellan gum
11	WP11	3	Gauze No.2-gellan gum Glucose Peptone Meat extract Agar + Superoxide dismutase+Catalase
12	WP12	1	dismutase+Catalase
13	WP13	1	Nutrient Agar + Superoxide dismutase+Catalase
14	WP14	1	Nutrient Agar + Superoxide dismutase+Catalase
15	WP15	3	Gauze No.2
16	WP16	3	Nutrient Agar
17	WP17	3	Gauze No.2+ Superoxide dismutase+Catalase
18	WP18	1	Raffinose-Histidine-gellan gum
19	WP19	3	Gauze No.2-gellan gum
20	WP20	3	TSA+ Superoxide dismutase+Catalase
21	WP51	1	Glucose Peptone Meat extract Agar+ascorbic acid
22	WP52	3	Glucose Peptone Meat extract Agar+ascorbic acid
23	WP53	3	Glucose Peptone Meat extract Agar+ascorbic acid
24	WP54	3	Glucose Peptone Meat extract Agar +rutin
25	WP55	3	Water-proline-gellan gum
26	WP56	3	Water-proline-Artificial Seawater
27	WP57	3	R2A-Artificial Seawater

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอสคิตินีมัยสีท

No	Isolates code	Length (bp)	Nearest type strain	Accession No.	Sequence identity (%)
1	WP1	1376	<i>Microbispora amethystogenes</i> JCM3021 ^T	U48988	99.42
2	WP2	1371	<i>Microbispora hainanensis</i> 211020 ^T	FJ261972	98.69
3	WP4	1377	<i>Microbispora amethystogenes</i> JCM3021 ^T	U48988	98.76
4	WP5	687	<i>Micromonospora olivasterospora</i> DSM43868 ^T	X92613	99.56
5	WP8	1379	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2- 19/6 ^T	AB241454	99.49
6	WP9	1381	<i>Microbispora mesophila</i> JCM3151 ^T	AF002266	99.42
7	WP10	490	<i>Micromonospora tulbaghia</i> TVU1 ^T	EU196562	99.80
8	WP11	1374	<i>Jishengella endophytica</i> 202201 ^T	EU560726	99.13
9	WP12	1378	<i>Microbispora amethystogenes</i> JCM3021 ^T	U48988	99.35
10	WP15	1171	<i>Verrucospora sediminis</i> MS426 ^T	EU870859	99.06
11	WP16	614	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC27029 ^T	CP002162	99.84
12	WP17	1368	<i>Verrucospora fiedleri</i> MG-37 ^T	JQ423921	99.63
13	WP19	761	<i>Verrucospora gifhornensis</i> DSM44337 ^T	Y15523	99.87
14	WP51	708	<i>Micromonospora sediminicola</i> SH2-13 ^T	AB609325	100.00
15	WP54	1370	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2- 19/6 ^T	AB241454	99.63
16	WP57	591	<i>Verrucospora wenchangensis</i> 234402 ^T	HQ123435	99.83



รูปที่ 2 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ในสกุล *Microbispora*



รูปที่ 3 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ในวงศ์ *Micromonosporaceae*

4. การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตไซเดอโรฟอรั

นำแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 27 ไอโซเลตมาศึกษาความสามารถในการสร้างสารไซเดอโรฟอรัในระดับห้องปฏิบัติการ ในการคัดกรองเบื้องต้นบนอาหาร CAS พบว่า 22 ไอโซเลตมีการสร้างวงสีส้ม-เหลือง (แสดงการสร้างสารไซเดอโรฟอรั) ที่มีขนาดรัศมีของวงสีส้ม-เหลืองวัดจากขอบของโคโลนีไปจนถึงขอบนอกสุดของวงสีส้ม-เหลือง แตกต่างกันออกไป โดยแอคติโนมัยสีทที่มีขนาดรัศมีมากที่สุดสามอันดับแรกคือ ไอโซเลต WP54 (รัศมี 7.25 มม.) WP16 มีขนาดรัศมี 6.75 มิลลิเมตร รองลงมาเป็น WP2 และ WP57 (รัศมี 6.0 มม.) ตามลำดับ และแอคติโนมัยสีทไอโซเลทที่ตรวจไม่พบการสร้างไซเดอโรฟอรับนอาหาร CAS โดยตรวจไม่พบการเกิดวงกลมสีส้ม – เหลือง เลย คือ ไอโซเลต WP13 WP14 WP17 WP18 และ WP56 การทดสอบชนิดของไซเดอโรฟอรัของเชื้อที่สร้างวงสีส้มบนอาหารแข็งพบว่า ทุกไอโซเลต

สามารถผลิตไซเดอโรฟอร์ได้ทั้งชนิด Hydroxamate และ Catecholate ในปริมาณไม่สูงมาก ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอร์ของแอกติโนมัยสีทที่แยกได้

No	Code	ขนาดวงดิสสัมบนอาหาร CAS (มม.)	ปริมาณไซเดอโรฟอร์ ($\mu\text{mol/g}$)	
			Hydroxamate	Catecholate
1	WP1	4.0	24.17	16.67
2	WP2	6.0	25.0	13.68
3	WP3	5.25	43.33	23.51
4	WP4	4.0	27.50	21.40
5	WP5	4.75	30.00	20.70
6	WP6	3.0	53.33	10.35
7	WP7	3.5	20.83	20.35
8	WP8	4.0	64.17	25.96
9	WP9	3.75	41.67	35.79
10	WP10	5.0	35.0	23.68
11	WP11	3.25	43.33	21.23
12	WP12	3.75	47.50	20.88
13	WP13	0	0	0
14	WP14	0	0	0
15	WP15	5.0	12.50	28.60
16	WP16	6.75	85.83	22.11
17	WP17	0	0	0
18	WP18	0	0	0
19	WP19	5.75	53.33	3.68
20	WP20	5.50	30.0	27.02
21	WP51	4.25	45.0	34.04
22	WP52	3.75	18.33	33.68
23	WP53	5.25	11.67	25.79
24	WP54	7.25	39.17	32.63
25	WP55	2.75	32.5	28.42
26	WP56	0	0	0
27	WP57	6.0	65.0	30.35

สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทจากตัวอย่างดินชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก สามารถแยกเชื้อได้ทั้งสิ้น 27 ไอโซเลต ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อจำนวน 16 ไอโซเลต พบว่าทุกไอโซเลตจัดเป็นแอสโคดิโนมัยซีทหายาก จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* 6 ไอโซเลต สกุล *Microbispora* 5 ไอโซเลต สกุล *Verrucosipora* 4 ไอโซเลต และสกุล *Jishengella* 1 ไอโซเลต จากข้อมูลที่ศึกษามีความเป็นไปได้สูงมากกว่าเชื้อ *Microbispora* sp. WP1, *Microbispora* sp. WP2, *Microbispora* sp. WP4, *Jishengella* sp. WP11, *Verrucosipora* sp. WP15 และ *Verrucosipora* sp. WP17 เป็นเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ จากการทดสอบความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอรินในเชื้อที่แยกได้ พบว่าทุกไอโซเลตสามารถสร้างไซเดอโรฟอรินได้ทั้งชนิด Hydroxamate และ Catecholate จะเห็นได้ว่าดินบริเวณชายฝั่งทะเลของไทยเป็นแหล่งทางธรรมชาติที่มีความหลากหลายของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทสูงเหมาะแก่การศึกษาและวิจัยเพื่อหาเชื้อชนิดใหม่ และความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่สำหรับการประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Arnou, L.E. (1937). Colorimetric estimation of the components of 3,4-dihydroxy phenylalanine tyrosine mixtures. *The Journal of Biological Chemistry* 118: 531-535.
- Atkin, C.L., Neilands, L.B. and Phaff, H.J. (1970). Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* and *Sporobolomyces* and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. *Journal of Bacteriology* 103: 722-733.
- Bérdy, J. (1994). Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? *Biotechnologia* 7-8: 13-34.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* 58:1-26.
- Bernan, V.S., Greenstein, M. and Carter, G.T. (2004). Mining marine microorganisms as a source of new antimicrobials and antifungals. *Current Medical Chemistry-Anti-Infective Agents* 3, 181-195.
- Bull, A.T. and Stach, J.E.M. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in Microbiology* 15: 491-499.
- Bull, A.T., Stach, J.E.M., Ward, A.C. and Goodfellow, M. (2005). Marine actinobacteria: perspectives, challenges and future directions. *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 65-79.
- Demain, A. L. (2000). Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances* 18, 499-514.
- Dimkpa, C., Svatos, A., Merten, D., Buchel, G. And Kothe, E. (2008). Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Canadian Journal of Microbiology* 54: 163-172.
- Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. and Fenical, W. (2003). Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angewante Chemie International Edition* 42: 355-357.
- Fenical, W. and Jensen, P.R. (2006). Developing a new resource for drug discovery: Marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology* 2: 666-673.
- Fiedler, H.P., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M. and Mihm, G. (2005). Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek* 87, 37-42.

- Fiss, E. and Brooks, G. F. (1991). Use of a siderophore detection medium, ethylene glycol degradation, and beta-galactosidase activity in the early presumptive differentiation of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and rapidly growing *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology* 29(7): 1533–1535.
- Gontang, E.A., Fenical, W. and Jensen, P.R. (2007). Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 3272-3282.
- Goodfellow, M. and Simpson, K.E. (1987). Ecology of streptomycetes. *Frontiers in Applied Microbiology* 2: 97-125.
- Hernandez, I.L.C., Macedo, M.L., Berlinck, R.G.S., Ferreira, A.G. and Godinho, M.J.L. (2004). Dipeptide metabolites from the marine derived bacterium *Streptomyces acrymicini*. *Journal of The Brazillian Chemical Society* 15: 441-444.
- Hong, S.G., Lee, Y.K., Yim, J.H., Chun, J. and Lee, H.K. (2008). *Sanguibacter antarcticus* sp. nov., isolated from Antarctic sea sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 50–52.
- Huang, Y., Dai, X., He, L., Wang, Y-N., Wang, B-J., Liu, Z. and Liu, S-J. (2005). *Sanguibacter marinus* sp. nov., isolated from coastal sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1755–1758.
- Jensen, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G. and Fenical, W. (2005). Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 43-48.
- Kageyama, A., Haga, T., Kasai, H., Shizuri, Y., Omura, S. and Takahashi, Y. (2008). *Marihabitans asiaticum* gen. nov., sp. nov., a meso-diaminopimelic acid-containing member of the family *Intrasporangiaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2429–2432.
- Kageyama, A., Takahashi, Y., Yasumoto-Hirose, M., Kasai, H., Shizuri, Y. and Omura, S. (2007). *Janibacter corallicola* sp. nov., isolated from coral in Palau. *Journal of General and Applied Microbiology* 53: 185-189.
- King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Lazzarini, A., Toppo, C.G. and Marinelli, F. (2000). Rare genera of actinomycetes as Potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 399-405.
- Lee, D.W., Lee, J.M., Seo, J.P., Schumann, P., Kim, S.J. and Lee, S.D. (2008).

- Phycicola gilvus* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from living seaweed. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 785–789.
- Lee, D.W. and Lee, S.D. (2008). *Tessaracoccus flavescens* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 785–789.
- Lee, S.D. (2007). *Marmoricola aequoreus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1391–1395.
- Lee, S.D. (2008). *Brevibacterium marinum* sp. nov., isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 500–504.
- Leong, J. (1986). Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Reviews in Phytopathology* 24: 187-209.
- Maldonado, L., Fenical, W., Goodfellow, M., Jensen, P.R., Kauffman, C.K. and Ward, A.C. (2005). *Salinispora* gen nov., sp. nov., *Salinispora arenicola* sp. nov., and *S. tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1759-1766.
- Matsumoto, A., Kasai, H., Matsuo, Y., Omura, S., Shizuri, Y. and Takahashi, Y. (2009). *Ilumatobacter fluminis* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from the sediment of an estuary. *Journal of General and Applied Microbiology* 55: 201-205.
- Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A. and Fenical, W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5005–5011.
- Pathom-aree, W., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. and Goodfellow, M. 2005. Diversity of actinomycetes isolated from the Challenger Deep sediment (10898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* 10:181-189.
- Pathom-aree, W., Nogi, Y., Sutcliffe, I.C., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. and Goodfellow, M. (2006a). *Williamsia marianensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Mariana Trench. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1123–1126.
- Pathom-aree, W., Nogi, Y., Sutcliffe, I.C., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. and Goodfellow, M. (2006b). *Dermacoccus abyssii* sp. nov., a novel piezotolerant

- actinomycete isolated from the Mariana Trench. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1233-1237.
- Pathom-aree, W., Nogi, Y., Sutcliffe, I.C., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. and Goodfellow, M. (2006c). *Dermacoccus barathri* sp. nov. and *Dermacoccus profundus* sp. nov., novel actinomycetes isolated from deep sea mud of the Mariana Trench. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2303-2307.
- Riedlinger, J., Reicke, A., Krismer, B., Zähler, H., Bull, A.T., Maldonado, L.A., Goodfellow, M., Bister, B., Bischoff, D., Süßmuth, R.D. & Fiedler, H.P. (2004). Abyssomicins, inhibitors of *para*-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain Ab-18-032. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* 57: 271-279.
- Romero, F., Espliego, F., Baz, J.P., de Quesada, T.G., Grávalos, D., la Calle, F. and Fernández-Puentes, J.L. (1997). Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* 50: 734–737.
- Schneider, K., Rose, I., Vickineswary, S., Jones, A.L., Goodfellow, M., Nicholson, G., Beil, W., Süßmuth, R.D. and Fiedler H.P. (2007). Biosynthetic capacities of actinomycetes. 39. Nocardichelins A and B, siderophores from *Nocardia* strain Acta 3026. *Journal of Natural Products* 70: 932-935.
- Tamura, T. and Sakane, T. (2005). *Asanoa iriomotensis* sp. nov., isolated from mangrove soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 725–727.
- Thawai, C., Tanasupawat and Kudo, T. (2008). *Micromonospora pattaloongensis* sp. nov., isolated from a Thai mangrove forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1516–1521.
- Ward, A.C. and Bora, N. (2006). Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology* 9: 279-286.
- Yi, H., Schumann, P. and Chun, J. (2007). *Demequina aestuarii* gen.nov., sp. nov., a novel actinomycete of the suborder *Micrococcineae*, and reclassification of *Cellulomonas fermentans* Bagnara *et al.* 1985 as *Actinotalea fermentans* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 151–156.

ภาคผนวก
สูตรอาหารแยกเชื้อ

Gauze No.2

Glucose	10	g
Peptone	5	g
Tryptone	3	g
NaCl	5	g
Agar	15	g
Distilled water	1000	ml

pH 7.0

Nutrient agar

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Agar	15	g
Distilled water	1000	ml

pH 6.8 ± 0.2

Raffinose-histidine agar

Raffinose	10	g
L-histidine	1	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	g
K ₂ HPO ₄	1	g
Agar	15	g
Distilled water	1000	ml

pH 7.0-7.4

R2A agar (Difco)

Yeast extract	0.5	g
Proteose peptone No.3	0.5	g
Casamino acid	0.5	g
Dextrose	0.5	g
Soluble starch	0.5	g
Sodium pyruvate	0.3	g
Dipotassium phosphate	0.3	g
Magnesium sulfate	0.05	g
Agar	15	g
Distilled Water	1000	ml

pH 7.2

Tryptic soy agar (TSB 30g/l)

Pancreatic digest of casein	17	g
Papaic digest of soybean	3	g
Dextrose	2.5	g
Sodium chloride	5	g
Dipotassium phosphate	2.5	g
Agar	15	g
Distilled water	1000	ml

pH 7.3 ± 0.2

Waksman agar/ Glucose Peptone Meat extract agar

D-glucose	10	g
Peptone	5	g
Meat extract	5	g
NaCl	3	g
Agar	15	g
Distilled Water	1000	ml

pH 7

Water agar

Peptone	1	g
Yeast extract	0.2	g
Agar	15	g
Tap water	1000	ml

pH 7.0

Water proline agar

L-proline	10	g
Agar	15	g
Tap water	1000	ml

pH 7.0

สูตรอาหาร CAS agar (King B)

A: King B agar

Proteose peptone No.3	10.0	g
Magnesium sulfate in 7 H ₂ O	1.5	g
Dipotassium hydrogen phosphate	1.15	g
Glycerol	1.5	%
Agar	15.0	g
Distilled water	900	ml
pH	7.0	

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดแล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรดต่าง pH 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยเครื่อง Autoclave ที่ 121° C นาน 15 นาที ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปผสมกับ CAS Solution ปริมาตร 100 ml ผสมให้เข้ากัน (ระวังการเกิดฟอง) แล้วนำไปเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

CAS solution

CAS	60.5	mg
Hexadecyltrimethylammonium	72.9	mg

ละลายผง CAS ในน้ำที่ไม่มีไอออน (Deionize) ปริมาตร 50 ml ผสมกับสารผสมระหว่าง iron (III) solution (1 mM FeCl₃·6H₂O, 10 mM HCl) โดยทำการกวนให้สารผสมให้เข้ากันอยู่ตลอดเวลา จากนั้นเติมสารละลายของ HDTMA (HDTMA) ละลายในน้ำที่ไม่มีไอออนปริมาตร 40 ml) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยเครื่อง Autoclave ที่ 121° C นาน 15 นาที

สารเคมี

1. Superoxide dismutase (Wako Code No. 195-10291, 8,500 unit/mg)

Dissolve all content in 1 ml of sterile MilliQ water = 15,000 unit/1000 ml. Filter through 0.22 mm, Keep -20°C, Spread 100 μl /plate = 1,500 units/plate

2. Catalase (Sigma C-9322, 2,100 unit/mg)

Dissolve 0.07 g (70 mg) in 3,500 μl SDW = 0.02 mg/ μl , Filter through 0.22 mm, Keep -20°C, Spread 50 μl /plate = 2,100 units/plate

3. Rutin hydrate (Sigma R5143, 120 $\mu\text{g/l}$)

Dissolve 0.024 g of rutin in 1 ml DMSO = 24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Dilute 10 times 100 μl of 24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ + 900 μl DMSO = 2.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ = Add 9 ml DMSO in 1 ml of 24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Filter through 0.22 mm, Keep at -20°C

Spread 50 μl /plate = 120 $\mu\text{g}/\text{plate}$

4. Ascorbic acid (Sigma A5960, 200 $\mu\text{g/l}$) **Light sensitive**

Dissolve 0.02 g of ascorbic acid in 1 ml SDW = 20 mg/ml = 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Dilute 10 times 100 μl of 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ + 900 μl SDW = 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ = Add 9 ml of SDW in 1 ml 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Keep at -20°C

Spread 100 μl /plate = 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
 - **Pathom-aree, W.**, K. Duangmal, Y. Inahashi, A. Matsumoto, Y. Takahashi, S. Lumyong and M. Goodfellow. 2014. Selective isolation of cultivable actinobacteria from Thai coastal marine sediments and their siderophore production. Chiang Mai Journal of Science (in preparation)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆทั้งในและต่างประเทศ
 1. Professor Dr. Kui Hong, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan, PR China
 2. Professor Dr. Yoko Takahashi, Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, Tokyo, Japan
 3. ผศ.ดร.กรรณิการ์ ดวงมัลย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 4. นางสาวรัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ
การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ
 - **Pathom-aree, W.**, K. Duangmal, Y. Inahashi, A. Matsumoto, Y. Takahashi, S. Lumyong and M. Goodfellow. 2011. Cultivable actinomycete diversity in coastal marine sediments of Thailand. The 13th Congress of Bacteriology and Applied Microbiology 6-11 September, Hokkaido, Japan.
 - **Pathom-aree, W.**, K. Duangmal, Y. Inahashi, A. Matsumoto, Y. Takahashi, S. Lumyong and M. Goodfellow. 2011. Cultivable actinomycete diversity in coastal marine sediments of Thailand. The 2011 Annual Meeting of The Society for Actinomycetes Japan 7-9 September, Hokkaido, Japan.

การประชุมวิชาการระดับชาติ

- **Pathom-aree, W.**, K. Duangmal, Y. Inahashi, A. Matsumoto, Y. Takahashi, S. Lumyong and M. Goodfellow. 2012. Selective isolation of cultivable actinobacteria from Thai coastal marine sediments and their siderophore producton. Thailand Research Fund Annual Meeting 10-12 October 2012, Cha-Am, Thailand