



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทและการผลิตเซลล์  
ปริมาณมาก.

Developmental production of bioactive compounds from actinomycetes and cell  
mass production.

ภายใต้แผนงานวิจัยเรื่อง

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงิน

อุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10803041

สัญญาเลขที่ 160 /2558

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทและการผลิตเซลล์  
ปริมาณมาก.

Developmental production of bioactive compounds from actinomycetes and cell  
mass production.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์  
จันทร์จรัส วัฒนโชติ  
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล

มีนาคม 2559

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนด้านการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 160/2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

## สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
2 ทบทวนเอกสาร	3
3 อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	9
4 ผลการวิจัย	22
5 สรุปและวิจารณ์ผล	37
เอกสารอ้างอิง	39
ผลผลิตโครงการวิจัย	43

## สารบัญตาราง (List of tables)

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่เป็นยารักษาโรคและสร้างขึ้นโดยแอกติโนมัยซีท (Borgos, 2006)	4
2	สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลที่ได้จากฟองน้ำ และแบคทีเรีย(แอกติโนมัยซีท) ที่เป็นสารยับยั้ง	4
3	แอกติโนมัยซีทที่ได้แยกเชื้อเพิ่มเติมจากป่าชายเลน ในจังหวัดนครศรีธรรมราช และฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างได้	14
4	ผลจากการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท จากฟองน้ำ ที่บริเวณเกาะหลัก จังหวัดชุมพร ผลการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบ <i>S. aureus</i> , MRSA 22, และ <i>Candida albicans</i> รวมทั้งคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์	16
5	ผลจากการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท จากป่าชายเลนจังหวัดชุมพร และผลการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์	17
6	แอกติโนมัยซีทที่แยกได้ใหม่จาก ป่าชายเลนปากแม่น้ำพังราด จ. ระยอง คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา บางประการและคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์	18
7	คุณลักษณะทางชีวเคมีบางประการ ของแอกติโนมัยซีทที่สร้าง สารยับยั้งจุลินทรีย์ และ/หรือ สารต้านอนุมูลอิสระ	22
8	ผลการทดสอบการเจริญ และสีของรงควัตถุที่เปลี่ยนไปของแอกติโนมัยซีท บนอาหารชนิดต่าง ๆ	23
9	ผลการศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ที่ดี ในอาหารที่มี ค่า pH ต่าง ๆกัน โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA และ <i>Candida albicans</i>	25

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ค

ตารางที่		หน้า
10	แอกติโนมัยซีทที่แยกได้ใหม่จาก ป่าชายเลนจากจังหวัดชุมพรและคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาบางประการ และทางเคมีของผนังเซลล์	27
11	น้ำหนักเซลล์แอกติโนมัยซีท และสารสกัดที่ได้จากเซลล์ /อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ก่อนที่จะเหนี่ยวนำด้วยแสง UV	28
12	แอกติโนมัยซีทที่ได้คัดเลือกไว้และได้เลี้ยงเชื้อปริมาณมากเพื่อนำส่งโครงการที่ 3 และโครงการที่ 4 เพื่อการวิเคราะห์กรดมัน และสารแอนติออกซิแดนซ์	29
13	น้ำหนักสารสกัดทั้งหมดจากการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทก่อนและหลังที่รืด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต	31
14	แอกติโนมัยซีท ที่จำแนกชนิดด้วยการศึกษาลำดับเบส ของ 16S rRNA gene	32
15	ผลการเลี้ยงเชื้อยีสต์ As1-8 1 และ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ	36

## สารบัญภาพ (List of illustrations)

ง

ภาพที่	หน้า
1 การทดสอบการสร้างสารยับยั้ง ต่อเชื้อทดสอบเบื้องต้น ด้วยวิธี Cross Streak	9
2 a และ b ฟองน้ำที่นำมาแยกเชื้อ c. ฟองน้ำที่ถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนนำมาแยกเชื้อ	12
3 แอคติโนมัยซีทบนจานเพาะเชื้อ จากป่าชายเลนนครศรีธรรมราช เกาะวังนอก และเกาะرابได้เชื้อรา (RB-POR2-1) 1ไอโซเลต	13
4 ภาพจาก ภายใตกล้อง Scanning Electron Microscope ของแอคติโนมัยซีทจากบริเวณต่าง ๆ : บริเวณชายฝั่ง <i>Streptomyces</i> A1-3, A 3-3 (ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ด้วยแสง UV แล้ว), <i>Streptomyces</i> CH54-5, A16-1 ป่าชายเลน PL3-3, PL3-7, NS3-10, NS4-3, NS4-6, NS6-2, NS4-14, และที่ได้จากฟองน้ำ POR02-LK-2, POR02-LK-5, POR03-LK-7, POR03-LK-8, POR03-LK-14	19-21
5 การเจริญและการสร้างสารรงควัตถุ บนอาหารชนิดต่าง ๆ (a=Actinomycetes Isolation Agar, b= ISP2, c=ISP3, d= ISP5, f= Starch Casein) ของ แอคติโนมัยซีท CH 54-5 และ A3-3	24
6. การเจริญและการสร้างสารรงควัตถุ บนอาหารชนิดต่าง ๆ ของ แอคติโนมัยซีท A16-1, a บน ISP2, b บน Actinomycete Isolation Agar, c บน Starch Casein Agar, d บน ISP5	24
7 a, b โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลภายใน whole-cell hydrolysates ของแอคติโน มัยซีทที่แยกเชื้อได้จาก ป่าชายเลนใน จังหวัดระยอง c, จากป่าชายเลนจังหวัดชุมพร	26
8 แอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระ ที่นำมาเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ ด้วยแสง UV : CP-PH 3-2, CP-PH 3-12, CH 54-8, CP 8-4 A, A3-3 และ RY 2-2	30-31
9 การสร้างรงควัตถุ ของแอคติโนมัยซีท A3-3หลังจากเหนี่ยวนำด้วยแสง UV 20 นาที บนอาหาร ISP2	31

## สารบัญภาพ (ต่อ)

๑

ภาพที่	หน้า
10 .ปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากทั้งของเซลล์ และจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนการเหนี่ยวนำ และ หลังการเหนี่ยวนำด้วยแสง UV	32
11 ภาพยีสต์ BS6-2 ภายใต้กล้อง Inverted Microscope เซลล์มีลักษณะกลม/ รูปไข่ขนาดใหญ่	32
12 การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM	33
13 การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยใน SM30	34
14 การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากชานอ้อยใน SM30 ที่ทำการรอกก่อนนำเข้าเครื่องหมักหนึ่ง ความดันอัตโนมัติ	35



## คำย่อ (List of abbreviations)

๑

16S rRNA	16S subunit ribosomal ribonucleic acid
Ara	Arabinose
Bk	Black
BkBn	Blackish brown
BkO	Blackish orange
Bn	Brown
CPD	Critical point drying
DAP	Diamino pimelic acid
DNA	Deoxy-ribonucleic acid
FeSO <sub>4</sub>	Ferrous sulfate
G	Green
Gal	Galactose
ISP	International <i>Streptomyces</i> Project
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-potassium hydrogen phosphate
KNO <sub>3</sub>	Potassium nitrate
LO	light orange
LY	light yellow
mg	milligram
Man	Mannose
MgSO <sub>4</sub>	Magnesium sulfate
MnCl <sub>2</sub>	Manganese chloride
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

## คำย่อ (ต่อ)

NaCl	Sodium Chloride
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammonium sulfate
NRPS	Non-ribosomal peptide synthase
O	Orange
PDA	Potato dextrose agar
PKS	Polyketide synthase
RBn	Reddish brown
Rhm	Rhamnose
RY	Reddish yellow
SCA	Starch Casein Agar
TISTR	Thailand Institute of Scientific and Technological Research
UV	Ultra violet
$\mu\text{l}$	microlitre
Xyl	xylose
YBn	Yellowish Brown
$\text{ZnSO}_4$	Zinc sulfate

## คำย่อ

16S rRNA	16S subunit ribosomal ribonucleic acid
Ara	Arabinose
Bk	Black
BkBn	Blackish brown
BkO	Blackish orange
Bn	Brown
CPD	Critical point drying
DAP	Diamino pimelic acid
DNA	Deoxy-ribonucleic acid
FeSO <sub>4</sub>	Ferrous sulfate
G	Green
Gal	Galactose
ISP	International <i>Streptomyces</i> Project
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-potassium hydrogen phosphate
KNO <sub>3</sub>	Potassium nitrate
LO	light orange
LY	light yellow
mg	milligram
Man	Mannose
MgSO <sub>4</sub>	Magnesium sulfate
MnCl <sub>2</sub>	Manganese chloride
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

## คำย่อ (ต่อ)

NaCl	Sodium Chloride
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammonium sulfate
NRPS	Non-ribosomal peptide synthase
O	Orange
PDA	Potato dextrose agar
PKS	Polyketide synthase
RBn	Reddish brown
Rhm	Rhamnose
RY	Reddish yellow
SCA	Starch Casein Agar
TISTR	Thailand Institute of Scientific and Technological Research
UV	Ultra violet
$\mu\text{l}$	microlitre
Xyl	xylose
YBn	Yellowish Brown
$\text{ZnSO}_4$	Zinc sulfate

## บทที่ 1 บทนำ

เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่มีการสร้างสารไบโอแอคทีฟเมตาโบไลต์ที่มีความหลากหลาย ที่ยังคงมีความสำคัญต่อการค้นหาสารแอนติไบโอติก หรือสารต้านจุลินทรีย์ใหม่ ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อทางการแพทย์และเภสัชวิทยาอย่างต่อเนื่อง ธรรมชาติที่ยังพบว่ามีเชื้อก่อโรคที่ดีอยู่ ที่นับวันมีแต่จะทวีจำนวนมากขึ้นนับเป็นเรื่องที่ยังมีความสำคัญมากขึ้น ในหลาย ๆ รายงานพบว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ดีอย่างแอนติไบโอติกนั้นมีเพิ่มมากขึ้นจริง ในขณะที่อัตราการค้นพบหรือการพัฒนาสารแอนติไบโอติกที่มีประสิทธิภาพนั้นกลับลดลง (Nathan, 2004; Nussbaum, *et al.*, 2006) ในบรรดาสารแอนติไบโอติกที่ใช้ในทางคลินิกนั้น สองในสามของมันก็ได้อันมาจากแหล่งธรรมชาติ และเป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่ดัดแปลงมาจากสารแอนติไบโอติกธรรมชาติอีกทีหนึ่ง (Newman and Cragg, 2007)

สำหรับสารออกฤทธิ์ที่ได้จากธรรมชาตินั้นสิ่งที่สำคัญคือ ก่อนที่จะมีการตรวจสอบชนิดของสารว่าเป็นสารกลุ่มไหน มีโครงสร้างทางเคมีอย่างไร เป็นชนิดใหม่หรือไม่นั้น ต้องการสารสำหรับการทดสอบเป็นปริมาณที่มากพอสมควร ซึ่งต้องมากพอสำหรับการทำให้สารบริสุทธิ์เบื้องต้น สำหรับการนำมาวิเคราะห์โครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุล รวมทั้งนำสารแต่ละองค์ประกอบที่แยกได้จากสารสกัดหยาบมาทดสอบว่า องค์ประกอบใดคือสารที่ออกฤทธิ์ และออกฤทธิ์กับอะไรบ้าง จุลินทรีย์ หรือเซลล์มะเร็ง สารแต่ละองค์ประกอบที่ได้ต้องมากพอสำหรับการทดสอบการออกฤทธิ์แต่ละชนิด เนื่องจากในแต่ละขั้นตอนนั้นก็จะมื่อน้ำหนักมวลสารที่หายไปในแต่ละขบวนการของการวิเคราะห์ จึงต้องการเทคโนโลยีในการเลี้ยงเซลล์เพื่อการสร้างสารออกฤทธิ์ให้ได้ปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์ในแต่ละขั้นตอน

เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียมีขนาดเล็ก ดังนั้นสารเมตาโบไลต์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แต่ละเซลล์จึงมีปริมาณน้อยตามขนาดเซลล์ เฉพาะการจะวิเคราะห์โครงสร้างสารแต่ละชนิดอาจต้องใช้สารประมาณ 1-3 กรัม ขึ้นกับความสามารถของเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้ นั่นหมายความว่าต้องใช้ปริมาณสารสกัดหยาบต่อชนิดเชื้อ ที่อาจมากถึง 2-10 ลิตร เท่าของน้ำหนักเซลล์โดยประมาณหากจะคิดค่า 1 เซลล์หนัก 1  $\mu\text{g}$  ในแบคทีเรียอาจต้องเลี้ยงเชื้อ ถึง 20-25 ลิตร เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ 1 กรัม ในเชื้อบางชนิด ดังนั้นการค้นหาวินิจฉัยที่จะได้เซลล์ปริมาณมากหรือเพื่อให้เซลล์ผลิตสารปริมาณมากจึงมีความสำคัญสำหรับขั้นตอนนี้

สำหรับมารีนีสต์เป็นราในกลุ่ม Ascomycetes หรือบางชนิดอยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes ซึ่งมีคุณค่าอาหารภายในเซลล์ และองค์ประกอบของเซลล์สูง มีทั้งโปรตีน กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามินบีหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ยีสต์ยังประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก รวมทั้งไขมันอื่น ๆ ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะใช้สำหรับเป็นอาหารเสริม และในการเลี้ยงเซลล์ยีสต์นั้นใช้เวลาสั้น และสามารถเลี้ยงได้โดยใช้วัตถุดิบที่อาจหาได้ง่าย เช่นกากน้ำตาล มันสำปะหลัง หางนม (Whey) มารีนีสต์หลายชนิดมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เช่น (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้ เป็นกรดไขมันที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริม และใช้ในทางการแพทย์ โดยเฉพาะกลุ่มไขมันโอเมก้า 3 ควบคุมการทำงานของร่างกายรวมทั้งความดันโลหิต ป้องกันเลือดแข็งตัว การทำงานของระบบสมองและประสาท นอกจากนี้ยังพบว่า EPA และ DHA มีบทบาทในการควบคุมการตอบสนองการอักเสบผ่านการผลิตสารที่เรียกว่า eicosanoids (Oliver *et al* 2010) รวมทั้งยังนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ ปัจจุบันเรามีการผลิตยีสต์ทั้งที่เป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ ซึ่งผลิตได้โดยใช้ยีสต์หลายชนิด เช่น แคนดิดา

*Candida utilis* หรือ *Saccharomyces* sp. การใช้ยีสต์ในอาหารของคนนั้น มักใช้เพื่อปรุงแต่ง เพิ่มกลิ่นรสของอาหาร เช่น ใช้เติมใน อาหารประเภทซूप หรืออาจใช้เป็นสารสกัดจากยีสต์ใช้ทาขนมปัง ส่วนการใช้ยีสต์ในอาหารสัตว์นั้นส่วนใหญ่ ใช้ในรูปอาหารเสริมโปรตีน และหากจะใช้เป็นอาหารของสัตว์ทะเลวัยอ่อน จะเลือกใช้ยีสต์ที่แยกได้จากทะเล หรือมารีน ยีสต์ ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีกรดไขมันที่มี polyunsaturated fatty acids สูง และไม่ทำให้คุณภาพน้ำเสีย (เหมือนการใช้ยีสต์ทำ ขนมปัง) เพื่อให้สัตว์น้ำวัยอ่อนเจริญเติบโตได้ดี เพื่อเป็นแหล่งของอาหารที่มีคุณภาพและมีคุณค่าอาหารสูงต่อสัตว์ ทะเลที่เป็นห่วงโซ่อาหารลำดับต่อไป และเช่นเดียวกันการใช้ประโยชน์เพื่อการนี้ก็ต้องผลิตยีสต์เพื่อให้ได้เซลล์เป็นปริมาณ มากอย่างเพียงพอ

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการผลิตสารแอนติไบโอติกจากแอสคิโนไมซีที่ ที่แยก ได้จากฟองน้ำทะเล และ/หรือแยกได้จากตะกอนชายฝั่ง ให้ได้ปริมาณมากเพื่อใช้ในการวิจัยการวิเคราะห์โครงสร้างสาร และพัฒนาการผลิตเซลล์ของยีสต์ทะเล (marine yeasts) เพื่องานวิจัย และเพื่อการตรวจสอบคุณค่าอาหารและสารที่เป็นประโยชน์อื่น ๆ ของเซลล์ โดยการพัฒนาการผลิตสารแอนติไบโอติกจากแอสคิโนไมซี และการผลิตเซลล์ ในการวิจัยนี้จะมุ่งเน้นที่ สารแอนติไบโอติก และสารที่มีสี (pigment) ที่สร้างจากแอสคิโนไมซีที่แยกได้จากฟองน้ำ ทะเล และ/หรือ จากตะกอนชายฝั่งทะเล บริเวณอ่าวไทยตอนกลาง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างสารในการค้นหาสาร แอนติไบโอติกใหม่ ๆ (ในโครงการวิจัยที่ 3) ที่อาจใช้เป็นองค์ประกอบหนึ่งของผลิตภัณฑ์ยา และการศึกษาองค์ประกอบ ของกรดไขมันภายในเซลล์ (ในโครงการวิจัยที่ 4) รวมทั้งการผลิตเซลล์ยีสต์ที่ได้จากทะเลด้วยวิธีการเลี้ยงกึ่งต่อเนื่อง เพื่อการตรวจสอบคุณค่าอาหารและองค์ประกอบอื่น ๆ เพื่องานวิจัยในเรื่องผลิตภัณฑ์อาหารเสริมของสัตว์น้ำวัยอ่อนใน โครงการที่ 4

## บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร

ปัจจุบันความต้องการใช้ยาแอนติไบโอติกยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ トラบเท่าที่ยังมีเชื้อก่อโรคยังมีชีวิตอยู่ร่วมกันกับเรา และด้วยเหตุนี้การพัฒนาการผลิตสารแอนติไบโอติกจึงยังคงมีความสำคัญ แม้แต่สารแอนติไบโอติกประเภท  $\beta$ -lactam ที่มีใช้มาตั้งแต่สมัยแรกเริ่ม เช่น penicillins และ cephalosporins ก็ยังคงต้องการการพัฒนาสายพันธุ์ให้สามารถสร้างสารได้มากขึ้น การที่ *Penicillium chrysogenum* สามารถผลิตสาร penicillin ได้ประมาณ 200 เท่า ของ *Penicillium notatum* ก็มาจากการปรับปรุงสายพันธุ์ ในสมัย Fleming ที่เริ่มค้นพบ penicillin ครั้งแรกนั้น เชื้อ *Penicillium chrysogenum* ที่เขาใช้ก็สร้างสารไม่ได้มากนัก ต่อมาเมื่อมีการปรับปรุงแล้ว *P. chrysogenum* ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันสามารถสร้างสารได้มากกว่า *P. chrysogenum* ของ Fleming ถึง 1000 เท่า (Veerapagu et al., 2008)

ในการสร้างสารแอนติไบโอติกจากแอคติโนมัยซีทก็เช่นเดียวกันได้มีการใช้เทคนิคในการทำให้เกิด mutation เพื่อให้ผลผลิตของการสร้างสารแอนติไบโอติกเพิ่มมากขึ้น (Kai and Weber, 1991; Wu, et al., 2004; ) และจากรายงานของ Kai and Weber (1991) ได้กล่าวถึงวิธีการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV นั้นเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และมักเป็นที่แนะนำให้มีการใช้กันในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อให้ออกฤทธิ์ได้มากขึ้น และในช่วงเวลาจาก 15 ปีที่ได้มีการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยการใช้สารเคมี และรังสี รวม 28 ชนิด พบว่ามีถึง 14 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสารแอนติไบโอติกเพิ่มมากขึ้นหลังจากที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV หรือ ด้วยแสง UV ร่วมกับการใช้สารเคมีที่เป็น mutagen

จากรายงานการวิจัยของ Wang et al. (2009) ก็ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Streptomyces bingchenggensis* ด้วยวิธีใช้แสง UV และสาร N-Methyl-N'-nitroso-N-nitrosoguanidine (NTG) พบว่าสามารถสร้างสาร Milbemycin A3 และ A4 ได้ถึง 1,453  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมก่อนให้แสง UV และสาร NTG ถึง 80% นับว่าเป็นปริมาณที่ประสบผลสำเร็จอย่างมาก

จากรายงานของ Manjula et al.(2009) ได้ทดลองเลี้ยงแอคติโนมัยซีทเพื่อให้ออกสารแอนติไบโอติก จำนวน 6 สายพันธุ์ พบว่า การเลี้ยงแอคติโนมัยซีทแบบตรึง (Immobilized technique) นั้นสร้างสารแอนติไบโอติกออกมาได้ดีกว่า เลี้ยงแบบไม่มีการตรึงเซลล์ สารแอนติไบโอติกที่ถูกสร้างออกมาในอาหารนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งเป็นชนิด multiple-resistant strains ได้ดีกว่า

แอคติโนมัยซีทมีการแพร่กระจายโดยทั่วไปในทะเลตั้งแต่ในน้ำทะเลหรือบริเวณชายฝั่งน้ำตื้น (Ghanem et al., 2000) ไปจนถึงตะกอนก้นทะเลลึก (Pathom-aree et al., 2006) ในช่วงเวลาที่ผ่านมามีรายงานการค้นพบแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่จากทะเลและมหาสมุทรจำนวนมาก เช่น *Marinispora* (Kwon et al., 2006) *Salinibacterium* (Han et al., 2003) *Salinospora* (Maldonado et al., 2005) *Serinicoccus* (Yi et al., 2004) เป็นต้น ทั้งนี้จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลทำให้พบว่าแอคติโนมัยซีทอีกหลายพันชนิดที่ยังรอการค้นพบ (Jensen and Lauro, 2008)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่เป็นยารักษาโรคและสร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยซีท (Borgos, 2006)

Classของสาร Antibiotic	ตัวอย่างสารแอนติไบโอติก	Actinomycete ที่สร้าง
Glycopeptides	Vancomycin	<i>Amycolatopsis orientalis</i>
Aminoglycosides	Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>
Macrolides	Erythromycin	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
Tetracyclins	Chlortetracycline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Chloramphenicol	Chloramphenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Lipopeptides	Daptomycin	<i>Streptomyces roseosporus</i>
Rifamycins	Rifampicin	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>
Polyenes	Nystatin	<i>Streptomyces noursei</i>

จากตารางที่ 1 นอกจากนี้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ หรือไบโอแอคติฟเมตาโบไลต์ ที่ได้จากแอคติโนมัยซีท รวมทั้งจากจุลินทรีย์อื่น ๆ ก็ยังมีอีกเป็นจำนวนมากที่ยังคงอยู่ในกระบวนการทดสอบก่อนที่จะถูกนำออกมาใช้จริง ดังตัวอย่างในตาราง 2 ตารางที่ 2 สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลที่ได้จากฟองน้ำ และแบคทีเรีย (แอคติโนมัยซีท) ที่เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็งที่อยู่ระหว่างการทดสอบ (Jimenez, et al., 2009)

Compound	Probable biosynthetic route or Compound type	Source organism	Clinical phase status
Bryostatin 1	Mixed PKS/NRPS	<i>Bugula neritina</i> (bryozoan)	III
Halichondrin B	PKS2	<i>Lissodendoryx</i> sp. (sponge)	I
Discodermolide	PKS2	<i>Discodermia dissoluta</i> (sponge)	I
Hemiassterlin (HTI-286)	NRPS1	<i>Cymbastella</i> sp. (sponge)	I
Bengamide derivative	Mixed PSK/NRPS (LAF389)	<i>Jaspis</i> sp. (sponge)	I
Agelasphin derivative (KRN-7000)	Glycosphingolipid	<i>Agelas mauritanus</i> (sponge)	I
Laulimalide	PKS2	<i>Cacospongia mycofijiensis</i> (sponge)	preclinical
Sarcodictyin	Terpene	<i>Sarcodictyon roseum</i> (sponge)	preclinical
Peloruside A	PKS2	<i>Mycale hentscheli</i> (sponge)	preclinical
Salicylhalimides A	PKS2	<i>Haliclona</i> sp. (sponge)	preclinical
Thiocoraline	NRPS1	<i>Micromonospora marina</i> (bacteria)	preclinical

NRPS= nonribosomal peptide synthase ; PKS =polyketide synthase



การวิจัยเกี่ยวกับแอกติโนมัยซีทในทะเลนั้น ในประเทศไทยยังมีการศึกษาน้อยมาก เนื่องจากข้อจำกัดหลาย ๆ ด้านหากนักวิจัย ไม่ได้มีห้องปฏิบัติการที่ใกล้ทะเล อย่างไรก็ตามพบว่ามีหลายรายงานที่กล่าวถึงสารไบโอแอกทีฟเมตาโบไลต์ใหม่ ๆ ที่สำคัญที่พบได้จากแอกติโนมัยซีทในทะเล และพบว่าในทะเลนั้น แอกติโนมัยซีทที่เป็นชนิดดั้งเดิม ที่มักพบบ่อย ได้แก่ *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Microphilus*, *Salinispora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium marinum*, *Williamsia maris*, *Micromonospora* และ *Verrucosispora* (Bull et al., 2005; Jensen et al., 2005a; Jensen et al., 2005b; Fiedler, et al., 2005; Magarvey, et al., 2004 และ Stach et al., 2004) และจากรายงานของ Gandhimathia et al.(2008) พบว่า ในบรรดาแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Callyspongia diffusa* นั้น พบถึง 38.46% ที่เป็น แอกติโนมัยซีท และแอกติโนมัยซีทชนิดที่เป็น endophytic นั้น จะเป็นชนิดที่สร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในคนได้ดีกว่าแอกติโนมัยซีททั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Streptomyces* spp.

เป็นที่สังเกตว่าสมัยเมื่อประมาณ 30 ปีที่แล้ว ไม่ค่อยมีใครสนใจแอกติโนมัยซีทที่พบในระบบนิเวศทางทะเลกัน เนื่องจากมีความคิดว่า ทะเลไม่น่าจะเป็นแหล่งที่จะพบได้ ประมาณช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา รายละเอียดด้านความหลากหลายของแอกติโนมัยซีทในระบบนิเวศทางทะเลเริ่มมีมากขึ้น และเริ่มมีผู้สนใจอย่างต่อเนื่องและยาวนาน อันเนื่องมาจากคุณสมบัติด้านความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์และสารออกฤทธิ์อื่น ๆ ที่ใช้ทางการแพทย์ที่โดดเด่น แต่อย่างไรก็ตามก็ยังคงเป็นที่ถกเถียงกันว่า การแพร่กระจายและธรรมชาติของแอกติโนมัยซีทในระบบนิเวศทางทะเลนั้น แท้ที่จริงแล้วแอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ดั้งเดิมในทะเล หรือว่าเป็นเพียงแบคทีเรียที่ถูกชะมาจากบนบกชายฝั่ง ทำให้เรามักจะเรียกว่าแอกติโนมัยซีทในสิ่งแวดล้อมทางทะเลมากกว่าที่จะเรียกว่าแอกติโนมัยซีททะเล

บริเวณชายฝั่งอาณาเขตที่เป็นท้องทะเล เป็นบริเวณระบบนิเวศที่เชื่อมต่อกับผิวน้ำรวมทั้งเชื่อมต่อกับแนวป่าชายเลนจึงเป็นอีกบริเวณหนึ่งที่นักวิจัยนิยมค้นหาแอกติโนมัยซีทชนิดใหม่ ๆ ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพต่าง ๆ เนื่องจากการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารปฏิชีวนะจากแอกติโนมัยซีทที่แยกจากดินทั่วไป มักจะพบสารชนิดที่เคยพบแล้วเป็นส่วนมาก และจากรายงานของ Kelman และคณะ (Kelman et al., 2005) พบว่า แอกติโนมัยซีทในสิ่งแวดล้อมทางทะเลมีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความหลากหลายมากกว่าที่พบจากบริเวณแหล่งอื่น ดังนั้นนักวิจัยส่วนใหญ่จึงมุ่งหาบริเวณระบบนิเวศทางทะเลอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากแหล่งเดิม ๆ บนบก เช่นชายฝั่งทะเลหรือในทะเลซึ่งมีพื้นที่ถึง 3 ใน 4 ของพื้นที่โลกเป็นแหล่งค้นหาแอกติโนมัยซีทชนิดใหม่ ๆ และค้นหาสารใหม่ ๆ จากแอกติโนมัยซีทเหล่านี้ (Das, et al., 2008; Ismet, et al., 2004; Jensen, et al., 1991; Solanki, et al., 2008) เนื่องจากในสิ่งแวดล้อมที่เป็นทะเลก็มีหลายรายงานวิจัยทั้งในอดีตเรื่อยมาจนถึงทุกวันนี้ และเรายังสามารถพบแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีทได้หลากหลายชนิดเช่นกัน (Weyland, 1986; Maldonado, et al., 2005a; Maldonado, et al., 2005b; Bull, et al., 2005; Bredholt, et al. 2007; Anzai, et al., 2008; Solano, et al, 2009; Hong, et al., 2009; Prieto-Davo, et al, 2013) โดยเฉพาะที่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญบนงานเพาะเชื้อได้มักอยู่ใน ชั้นคลาส *Actinobacteridae* โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอกติโนมัยซีทที่อยู่ในออร์เดอร์ *Actinomycetales* ซึ่งเป็นเป้าหมายในการค้นหาสารทุติยภูมิใหม่ ๆ ที่ออกฤทธิ์ต่อไป (Kumar, et al., 2011, Zotchev, 2012)

ในงานวิจัยนี้ ได้มีการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากดินตะกอนจากระบบนิเวศป่าชายเลน ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื่อมต่อกับทะเล และน้ำทะเลท่วมถึง มีน้ำขึ้นและน้ำลงวันละ 2 ครั้ง รวมทั้งจากที่อยู่กับฟองน้ำทะเล ควบคู่ไปกับการพัฒนาการผลิตเซลล์เพื่อให้ได้แอคติโนมัยซีทที่มากเพียงพอต่องานวิจัย ในโครงการที่ 3 และโครงการที่ 4 ของแผนงานวิจัย

## 2.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพในแอคติโนมัยซีท

ในการเลี้ยงแอคติโนมัยซีทเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ปริมาณมากนั้น นอกจากจะขึ้นกับชนิด และสายพันธุ์ของแต่ละเชื้อแล้ว ยังขึ้นกับปัจจัยสิ่งแวดล้อมทางกายภาพอีกหลาย ๆ ปัจจัย รวมทั้งชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับแอคติโนมัยซีทชนิดนั้น ๆ (Karuppiyah, et al., 2013; Jung, HM., et al., 2007) จากการศึกษาของ Jung et al., (2007) นั้นได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง Vancomycin ของ *Amycolatopsis orientalis* (ชื่อเดิมคือ *Nocardia orientalis*, *Streptomyces orientalis*) เนื่องจากในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมนั้นยังได้ปริมาณที่น้อยอยู่ คือ ประมาณ 3.7 g/l และในหลาย ๆ วิธีของการผลิตก็ยังคงไม่เป็นที่เปิดเผย เขาพบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กันไป การเลี้ยงด้วย เดกตริน ให้ผลผลิต Vancomycin มากที่สุดคือ  $6.2 \pm 0.4$  g/l รองลงมาคือ soluble starch ให้ผลผลิต  $5.6 \pm 0.3$  g/l และอันดับต่อไปคือ เลี้ยงด้วย Corn starch ให้ผลผลิต  $5.2 \pm 0.3$  g/l ด้วยการเลี้ยงที่  $34^{\circ}\text{C}$  ในระดับ plant scale มีการเขย่าที่ ความเร็วรอบ 260-480 rpm pH ที่เหมาะสมคือ pH 7 และ ค่าออกซิเจนละลาย อยู่ที่  $\text{DO} = 20\text{-}30\%$  tension ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นของ *Amycolatopsis orientalis* และถ้าต้องการทราบสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสาร ก็ต้องศึกษาปัจจัย สภาวะที่เหมาะสมกันเป็นชนิด ๆ ไปเนื่องจากแอคติโนมัยซีทแต่ละชนิดมีความชอบต่อชนิดอาหาร และปัจจัยต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน

นอกจากนี้ การสร้างสารเมตาโบไลต์ของแอคติโนมัยซีท โดยเฉพาะใน *Streptomyces* ยังเป็นเรื่องของยีนที่ควบคุมการสร้างสารที่อยู่ภายใน จะแสดงออกมากหรือน้อย รวมทั้งการควบคุมจาก Quorum Sensing ซึ่งเป็นการสื่อสารภายในประชากรของแอคติโนมัยซีท ระหว่างการเลี้ยง เพื่อให้มีการสร้างสาร หรือไม่มีการสร้างสารอีกด้วย (Shapiro, 1998) ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่ต้องศึกษาเป็นแต่ละชนิด ๆ ไป เช่นกัน

## 2.3 การเหนี่ยวนำ แอคติโนมัยซีทด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์หมายถึง การเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม ที่ก่อให้เกิดลักษณะใหม่ซึ่งต่างไปจากลักษณะเดิมที่มีอยู่ และลักษณะดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ สิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิมเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ เรียกว่า สายพันธุ์กลาย (mutant) (<http://www.biology.science.cmu.ac.th/lectures/202231/Mutation.html>) การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์นั้น เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยทำให้จุลินทรีย์ที่กลายพันธุ์นั้นมีการสร้างสารในปริมาณที่มากขึ้นจากเดิม อย่างเห็นได้ชัดเจน และมีหลายวิธีที่จะสามารถทำให้จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์

การเกิดการกลายพันธุ์ จะมีการเปลี่ยนแปลงที่สารพันธุกรรม (DNA) ในระดับต่างๆ หลายระดับ ได้แก่

1. Point mutation หรือ gene mutation เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดในระดับโมเลกุลหรือยีน ได้แก่ การขาดหาย เพิ่ม หรือ แทนที่ของเบสเพียง 1-2 เบส
2. Chromosome mutation เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นกับโครงสร้างโครโมโซม ได้แก่ อินเวอร์ชัน (inversion) ทรานสโลเคชัน (translocation) อินเซอร์ชัน (insertion) ดีลชัน (deletion) เป็นต้น

3. Genomic mutation เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากจำนวนโครโมโซมขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นมา ได้แก่ ยูพลอยดี (euploidy) และแอนยูพลอยดี (aneuploidy)

ชนิดของการกลายพันธุ์

สามารถจำแนกตามชนิดของเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็น 2 แบบ คือ

1. การกลายพันธุ์ของเซลล์ร่างกาย (somatic mutation) เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นกับเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ลักษณะที่กลายพันธุ์ไม่สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปได้
2. การกลายพันธุ์ของเซลล์สืบพันธุ์ (germinal mutation) เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นกับเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell) ลักษณะที่กลายพันธุ์จะสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปได้

ปัจจัยที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ มีหลายปัจจัย ได้แก่

1. รังสี (radiation) รังสีที่กระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์มี 2 ชนิดคือ
  1. Ionizing Radiation เช่น รังสีบีตา, รังสีแกมมา, รังสีเอกซ์
  2. Non-Ionizing Radiation เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต
2. สารเคมี เช่น สารโคลชิซิน (colchicine) มีผลทำให้มีการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม ผลดังกล่าวนี้ทำให้ผลผลิตพืชเพิ่มขึ้น สารไดคลอวอส (dichlovos) ที่ใช้กำจัดแมลงและพาราควอต (paraquat) ที่ใช้กำจัดวัชพืช ก็สามารถทำให้เกิดการผิดปกติของโครโมโซมในคนและสัตว์ได้ สิ่งก่อกลายพันธุ์หรือมิวทาเจนหลายชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) เช่น สารอะฟลาทอกซิน (aflatoxins) จากเชื้อราบางชนิดทำให้เกิดมะเร็งที่ตับ เป็นต้น
3. การจัดเรียงเบสในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA replication) ผิดพลาด มีผลทำให้เกิดการเพิ่มหรือลดจำนวนเบสในคู่สาย และทำให้เกิดการเลื่อน (shift) ของสาย DNA

ในแบบที่เรียกรกลายพันธุ์นั้นเกิดขึ้นในระดับ DNA ซึ่งสามารถถ่ายทอดลักษณะไปยัง generation ต่อไปได้ จากการศึกษาวิจัยของ Tanaka (2013) ซึ่งได้ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่ควบคุมการสร้างแอนติไบโอติกในแอคติโนมัยซีทหลายชนิด เช่น *Streptomyces*, *Streptopolyspora* และใน *Amycolatopsis* โดยปกติแล้วในแอคติโนมัยซีทมีกลุ่มของ Gene cluster หลายชนิดที่ควบคุมการสร้างสารเมตาโบไลต์ที่เป็น unknown เช่น ใน *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces griseus*, *Saaachaopolyspora erythraea* เป็นต้น

ในการเพิ่มปริมาณการสร้างสารแอนติไบโอติก นั้นการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ บางการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* จะสามารถเพิ่มปริมาณ RNA polymerase (RNAP)  $\beta$ -subunit และบางการกลายพันธุ์ของยีน *rpsL* จะสามารถเพิ่มปริมาณของ ribosomal protein S12 ซึ่งจะสามารถทำให้ยีนที่ควบคุมการสร้าง สารทุติยภูมิ ที่ไม่ทำงาน (silent) อยู่ นั้น ให้สามารถทำงานได้ (active) และในที่สุดก็นำไปสู่การค้นพบสารแอนติไบโอติกใหม่ ๆ

### บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

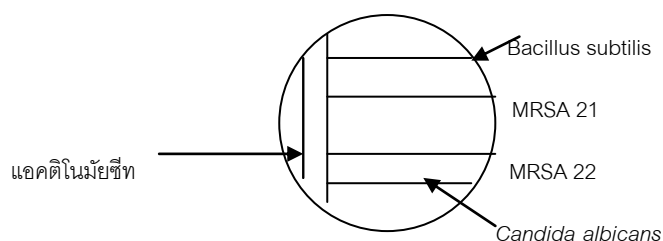
สถานที่ในการดำเนินการวิจัย /เก็บข้อมูล : สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา สถานที่เก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเพิ่มเติม: ป่าชายเลนภาคตะวันออกบริเวณปากแม่น้ำพังราด จังหวัดระยอง-ลักษณะตัวอย่างเป็นทราย (8 ตัวอย่าง) และป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนกลางของจังหวัด ชุมพร บริเวณบ้านนาทุ่ง บ้านนาชะอัง และบริเวณปากคลองอุทยาน ฯ ทะเลชุมพรซึ่งลักษณะตัวอย่างเป็นทรายปนโคลน (9 ตัวอย่าง) รวมทั้งฟองน้ำจากบริเวณเกาะวังนอก เกาะราบ ดินตะกอนป่าชายเลนจังหวัดนครศรีธรรมราช (7 ตัวอย่าง) และฟองน้ำจากเกาะหลัก จังหวัดชุมพร (5 ตัวอย่าง)

วิธีดำเนินการวิจัย มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

#### 3.1 การแยกเชื้อและการทดสอบฤทธิ์สารแอนติไบโอติกจากเซลล์แอคติโนมัยซีทที่ได้จากฟองน้ำและ/หรือ จากตะกอนทะเล (ตัวอย่างฟองน้ำ ได้จากการเก็บตัวอย่างจากแผนโครงการ)

3.1.1 แยกเชื้อจากฟองน้ำทะเล และ/หรือ ตะกอนชายฝั่ง โดยใช้ selective medium 3 ชนิด Actinomycete Isolation Agar(Difco), ISP2 ( International *Streptomyces* Project 2) และ Starch Casein Agar(SCA) แยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*(Hospital strains), *Candida albicans* TISTR 5239) ก่อนนำมาเลี้ยงให้เจริญและสร้างสปอร์บนจานเพาะเชื้อ ในอาหาร ISP 2 (ที่มีน้ำทะเล 50%) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4-7 วัน

3.1.2 ตรวจสอบความสามารถในการสร้างสาร แอนติไบโอติกยับยั้ง MRSA และ/ หรือ *Candida albicans* ด้วยวิธี Cross streak โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีททุกไอโซเลตที่แยกได้ใหม่ลงบนจานอาหาร ISP2 ที่ด้านใดด้านหนึ่งของจานแล้วบ่มเชื้อให้เจริญ ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วนำเชื้อทดสอบ (*Bacillus subtilis*, MRSA 21, MRSA 22 และ *Candida albicans*) ที่เลี้ยงให้เจริญในอาหารเหลว อายุ 18-24 ชม ที่มีความขุ่น ที่เทียบได้กับสารละลาย McFarland หมายเลข 0.5 มา streak ที่ด้านขวามือ ให้ตั้งฉากกับแนวการเจริญของเชื้อ แล้วบ่มเชื้อต่อไปที่อุณหภูมิเดิมอีก 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจดู Clear zone ที่เกิดขึ้น (ที่ห่างจากแนวการเจริญของแอคติโนมัยซีท) ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การทดสอบการสร้างสารยับยั้ง ต่อเชื้อทดสอบเบื้องต้น ด้วยวิธี Cross Streak

3.1.3 ตรวจสอบลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ สายโซ่สปอร์ เพื่อตรวจสอบลักษณะรูปร่างเชื้อ และเก็บรักษาเชื้อไว้ โดยนำแอสไคน้อยซีททุกไอโซเลตที่แยกได้มา เลี้ยงให้เจริญบนจานเพาะเชื้อ ที่  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 4-7 วัน แล้วตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

3.1.4 เลี้ยงแอสไคน้อยซีทที่สร้างสปอร์ออกฤทธิ์ที่ดี /หรือสร้างสปอร์ได้ดี ได้มาก มาศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีบางประการ ด้วยการเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน ต่าง ๆ กัน โดยเลือกมาศึกษาทั้งหมด 15 ชนิดคือ A16-1, CH54-8, NS2-2, NS2-3, NS2-5, NS3-1, NS3-1, NS4-2, NS4-6, NS5-1, NS5-3, NS6-2, NS7-3, NS3-10, WN-POR-06

3.1.5 เลี้ยงเชื้อชนิดที่สนใจที่สร้างสปอร์ออกฤทธิ์ /หรือสร้างสปอร์ได้ดี ได้มาก มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่พบว่าเหมาะสมโดยเลี้ยงเชื้อเพื่อสังเกตการเจริญและการสร้างสปอร์ในอาหารชนิดต่าง ๆ แล้วเลือกใช้อาหารที่เหมาะสมที่สุดใน การเลี้ยงปริมาณมาก เติมน้ำทะเล 25-30% บ่มในตู้ Shaker ที่  $30^{\circ}\text{C}$  และเขย่า ที่ 110 rpm เป็นเวลา 7-10 วัน แล้วเก็บเซลล์ด้วยวิธีปั่นเหวี่ยง ล้างด้วย Normal saline ก่อนนำเซลล์ไป freeze dry เพื่อ ตรวจวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันในโครงการที่ 4 และเก็บเซลล์และน้ำเลี้ยงเพื่อการศึกษาสารแอนติออกซิแดนซ์ และการศึกษาโครงสร้างสารในโครงการที่ 3

3.1.6 การเหนี่ยวนำแอสไคน้อยซีท ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultra violet, UV) ตามวิธีของ Ekwealor and Obeta (2006) และวิธีของ Veerapagu *et al.*, (2008) โดยนำสปอร์ของแอสไคน้อยซีทที่คัดเลือกไว้ 6 สายพันธุ์ใส่ใน tube ที่มี น้ำกลั่นปลอดเชื้อ เขย่า (vortex) ให้เข้ากัน แล้วนำไปวางภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 15, 20 และ 25 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเจือจางสปอร์(10-fold dilution) ที่แขวนลอยใน 24 Microwell plate แล้วเปิดสปอร์ของเชื้อ 100  $\mu\text{l}$  ของ ความเจือจางที่  $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  มาเกลี่ยลงบนจานอาหาร ISP2 (ทำ 3 ซ้ำ) บ่มเชื้อที่  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3-4 วัน สังเกตลักษณะ โคลนินที่เจริญบนจานอาหาร คัดเลือกโคลนินที่สร้างสปอร์สีเข้มที่สุดของการส่องแสง UV ที่เวลาต่าง ๆ มาเก็บไว้ในอาหารร่วน เย็น และใน 20% glycerol เพื่อการตรวจสอบในขั้นต่อไป และเพื่อการเก็บรักษาเชื้อระยะยาว

3.1.7 ทดสอบการสร้างสปอร์ออกฤทธิ์จากเชื้อที่กลายพันธุ์จาก treatment ต่าง ๆ ด้วยการถ่ายเชื้อที่เลือกแล้วจากการ ทำให้กลายพันธุ์ และเชื้อดั้งเดิม มาเลี้ยงในอาหารเหลว ISP 2 (ที่มีน้ำทะเล 50%) ใน flask ขนาด 1000 ml บ่มเชื้อในตู้ บ่มที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7-14 วัน สกัดด้วย ethyl acetate และ methanol หรือ solvent ที่เหมาะสมอื่น ตรวจสอบปริมาณสาร (ขณะเดียวกันเลี้ยงเซลล์อีกส่วนหนึ่ง เพื่อเก็บไว้ทดสอบคุณสมบัติทาง เคมี ด้วย) การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ ทดสอบตามวิธีของ Lechevalier and Lechevalier (1980)

3.1.8 เตรียมเซลล์เพื่อศึกษา ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน เลี้ยงเชื้อที่ให้สปอร์ออกฤทธิ์ หรือให้สปอร์ที่ดี ในอาหารเหลว บ่มเชื้อให้เจริญที่  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อเชื้อเจริญแล้ว เก็บเซลล์ด้วยวิธี centrifuge แช่เซลล์ใน absolute ethanol ก่อนนำไปสกัด DNA เพิ่มปริมาณ DNA และทำ DNA ให้บริสุทธิ์ด้วย Test Kit และ run gel ด้วยเครื่อง autosequencer และวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rRNA ยีนของแอสไคน้อยซีท หรือของยีสต์ (26S rRNA) ที่ต้องการศึกษา

## 3.2 การศึกษาการเจริญของยีสต์ และการผลิตเซลล์ยีสต์

การศึกษากการเจริญ และการผลิตเซลล์ยีสต์ โดยเลือกใช้ยีสต์ BS 6-1, BS 6-2 และ AS1-8 ซึ่งแยกได้จากทะเล ที่มีอยู่เดิม มาทดสอบการเจริญในอาหารสังเคราะห์และอาหารธรรมชาติ (กากชานอ้อย) โดยเลี้ยงและศึกษาการเจริญใน

อาหาร YM และกากขานอ้อย รวมทั้งการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดอื่น ๆ เช่น PDA, Czapek Dox, Corn meal เป็นต้น เพื่อเลี้ยงปริมาณมาก ในปัจจุบันการเลี้ยงที่เหมือนกัน คือ ที่ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน เพื่อการศึกษาปริมาณ และชนิดกรดไขมันตามความต้องการของโครงการที่ 3

หมายเหตุ: อาหาร ISP ( International *Streptomyces* Project) เป็นอาหารที่ใช้ศึกษาคุณลักษณะการเจริญ ของแอสคิตินอัยซีท

Starch Casein Agar ประกอบด้วย Soluble Starch 10.0 g, Casein 1.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, Agar 15.0 g และ Trace salt solution 1 ml ต่ออาหาร 1 ลิตร

ISP2 ประกอบด้วย Yeast Extract 4.0 g, Malt Extract 10.0 g Glucose 4.0 g น้ำกลั่น 1000 ml และ Agar 15.g

ISP3 ประกอบด้วย ข้าวโอ๊ต 20 g, Trace salt solution 1 ml( FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0.1 g, MnCl<sub>2</sub>· 4H<sub>2</sub>O 0.1 g, ZnSO<sub>4</sub>· 7H<sub>2</sub>O 0.1 g), Agar 15 g น้ำกลั่น 1000 ml

ISP4 ประกอบด้วย Soluble starch 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 1g, NaCl 1 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, trace salt solution 1 ml, Agar 20 g, น้ำกลั่น 1000 ml

ISP5 ประกอบด้วย Glycerol 10 g, L-Asparagine 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, Trace salt solution 1 ml (เหมือน ISP3) Agar 15 g, น้ำกลั่น 1000 ml pH 7.0-7.4

ISP7 (Tyrosine agar), L-Asparagine 1 g, L-Tyrosine 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, NaCl 0.5 g, Trace salt solution 1 ml, Agar 20 g, น้ำกลั่น 1000 ml

ISP8 ประกอบด้วย Beef extract 3 g, Peptone 5 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, Agar 15-20 g น้ำกลั่น 1000 ml, pH 7.0

## บทที่ 4. ผลการวิจัย

จากการที่ได้เก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทเพิ่มเติม เพื่อใช้สำหรับโครงการวิจัยที่ 3 และโครงการที่ 4 ของแผนการวิจัยที่เกาะراب(ฟองน้ำ) เกาะวังนอก(ฟองน้ำ) และป่าชายเลน (ดินตะกอน) ในอำเภอนนอม จังหวัด นครศรีธรรมราช (ปี 2556) บริเวณปากแม่น้ำพังราดจังหวัดระยอง ที่ป่าชายเลนจังหวัดชุมพร(ดินตะกอน) (ปี2557) และ เกาะหลัก(ฟองน้ำ)จังหวัดชุมพร (ปี 2558) ได้ผลดังนี้

### 1 แยกเชื้อแอกติโนมัยซีท จากฟองน้ำทะเล และ จาก ตะกอนป่าชายเลน อ. นนอม จ. นครศรีธรรมราช

1.1 ได้ทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากฟองน้ำทะเลและจากตะกอนป่าชายเลนชายฝั่งของ อ. นนอม จังหวัด นครศรีธรรมราช โดยเก็บฟองน้ำจากเกาะراب 23 ตัวอย่าง เกาะวังนอก 16 ตัวอย่าง และจากป่าชายเลน อ. นนอม 7 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อบนอาหาร 3 ชนิดคือ ISP2, SCA และ Actinomycete Isolation Agar พบ แอกติโนมัยซีทจาก ฟองน้ำเกาะراب 2 ไอโซเลต จากเกาะวังนอกพบ 2 ไอโซเลต และป่าชายเลนพบแอกติโนมัยซีท 52 ไอโซเลต จากนั้นทำ ซ็อบให้บริสุทธิ์ และ เก็บรักษาเชื้อทั้งใน อาหารรูนเฉียง (slant culture) และที่  $-40^{\circ}\text{C}$  ฟองน้ำจากเกาะرابที่พบแอกติโนมัยซีท คือฟองน้ำครกท่อมสีม่วง และฟองน้ำสีแดง ส่วนฟองน้ำจากเกาะวังนอกที่พบแอกติโนมัยซีท คือฟองน้ำกิ่งสีม่วง และฟองน้ำหนามสีเทา นอกจากนี้ยังพบราทะเลด้วยอีก 1 ชนิดจากฟองน้ำสีแดงของเกาะراب



a. ฟองน้ำครกท่อมสีม่วง จากเกาะวังนอก



b. ฟองน้ำสีแดงจากเกาะراب



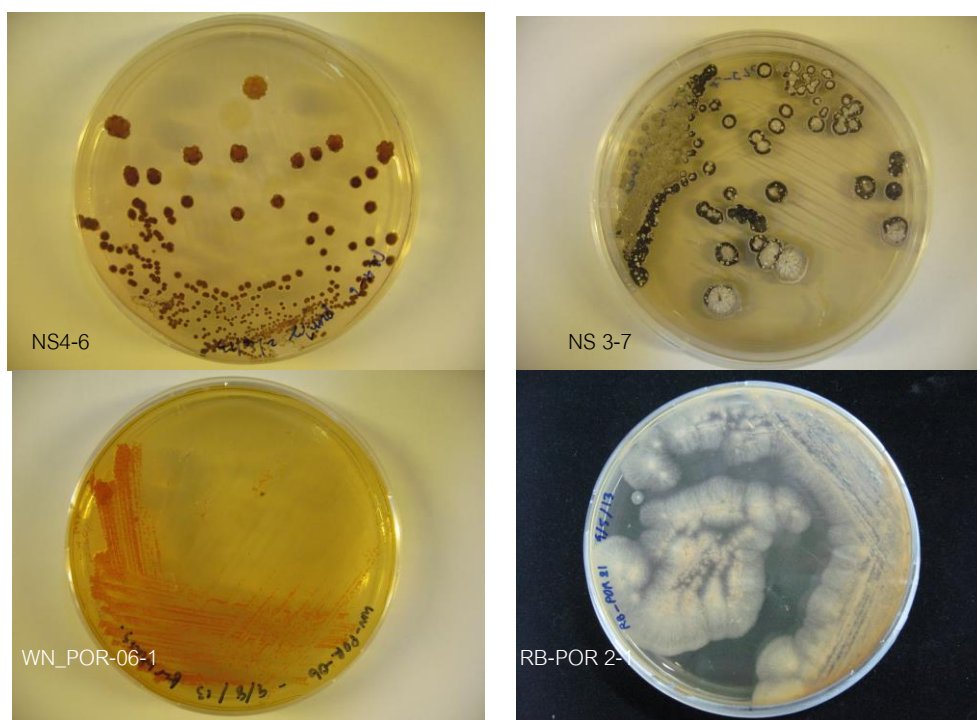
c

ภาพที่ 2: a และ b ฟองน้ำที่นำมาแยกเชื้อ

c. ฟองน้ำที่ถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนนำมาแยกเชื้อ

### 1.2. ศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของเชื้อที่แยกได้

เชื้อแอสเพอไรเชียทุกไอโซเลตที่พบ ทุกชนิด รวมทั้งเชื้อรา จะนำมาศึกษาออกฤทธิ์ชีวภาพเบื้องต้น โดยเฉพาะ สารต้านจุลินทรีย์ และ ต้าน *Candida albicans* เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ เช่น MRSA, *B. subtilis*, *C. albicans* เป็นเชื้อที่ได้จากสถาบันเก็บรักษาเชื้อ Thailand Institute of Sciences and Technology Research (TISTR) ด้วยการเลี้ยงเชื้อแอสเพอไรเชียที่ให้เจริญเติบโตบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 5-7 วัน ที่ 30° C ก่อนการทดสอบด้วยวิธี cross streak technique



ภาพที่ 3 แอสเพอไรเชียที่พบงานเพาะเชื้อจากป้าชายเลนนครศรีธรรมราช เกาะวังนอกและเกาะราบใต้เชื้อรา(RB-POR2-1) *Aspergillus tubigensis*

นำเชื้อแอสเพอไรเชียทุกไอโซเลตที่พบ มาทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้ง เชื้อแบคทีเรีย และ ยีสต์ *Candida albicans* โดยมีเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 008, Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA 22, Hospital strains), *Candida albicans* (TISTR 5239) ด้วยการเลี้ยงเชื้อแอสเพอไรเชียที่ให้เจริญเติบโตบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 5-7 วัน ที่ 30° C ก่อนการทดสอบด้วยวิธี cross streak technique ผลที่ได้จากทั้ง 3 จังหวัดให้ผลดัง ตารางที่ 3, 4 และ ตารางที่ 5พบว่าแอสเพอไรเชียที่แยกได้จากป้าชายเลนจังหวัดนครศรีธรรมราชค่อนข้างมีความหลากหลายและพบว่าส่วนใหญ่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เชื้อที่แยกได้ใหม่ค่อนข้างเป็นแอสเพอไรเชียที่หายาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่พบจากจังหวัดระยอง และชุมพร ซึ่งพบแอสเพอไรเชียใน Family *Micromonosporaceae* เป็นส่วนใหญ่ และส่วนมากเป็นโคโคเนียที่มีสีส้ม หรือ ส้ม ดำ ซึ่งเป็นลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ของแอสเพอไรเชียกลุ่มนี้



ตารางที่ 3 แอคติโนมัยซีท์ที่ได้แยกเชื้อเพิ่มเติมจากป่าชายเลน ในจังหวัดนครศรีธรรมราช คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาบางประการ คุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ และฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ที่สังวงได้

Isolate ID	Aerial hyphae	Substrate hyphae	Color of Spore mass	Color of Substrate	Spore chain type	Cell wall DAP	Sugar Pattern	Antibiosis to (diameter of zone, cm)				Identified
								<i>B. subtilis</i>	MRSA 21	MRSA 22	<i>C. albicans</i>	
NS1-1								-	-	-	-	Unidentified
NS1-2	+	+	W	Bn		Meso-DAP		1.5	0.5	-	-	<i>Thermoactinomyces</i>
NS1-3						LL-DAP		-	-	-	-	<i>Streptomyces</i>
NS1-4	+	+	G	O		LL-DAP	Ara, Gal	2.6	2.2	2.2	1.5	<i>Streptomyces</i>
NS1-5	+	+	W	Bn		Meso-DAP		1.2	-	-	-	<i>Thermoactinomyces</i>
NS1-6	-	+	G	D Bn		Meso-DAP		-	-	-	-	<i>Micromonospora</i>
NS1-7						Meso-DAP	Xyl, Ara	-	-	-	-	<i>Micromonospora</i>
NS1-8						LL-DAP	-	-	-	-	-	<i>Streptomyces</i>
NS1-9	+	+	G	Y		LL-DAP	-	2.0	-	-	-	<i>Streptomyces</i>
NS2-1						LL-DAP	-	-	-	-	-	<i>Streptomyces</i>
NS2-2	+	+	W	Bn		Meso-DAP		-	0.5	0.3		<i>Nocardiosis</i>
NS2-3	+	+	G	Bn		LL-DAP	-	-	0.5	0.3	-	<i>Streptomyces</i>
NS2-4								-	-	-	-	
NS2-5	+	+	G	Bn			Xyl, Gal	0.5	0.5	0.5	-	
NS3-1	+	+	W	DY	S	Meso-DAP	Gal	2.0	-	2.0	-	<i>Streptoalloteichus</i>
NS3-2	+	+	W	Y	S	LL-DAP	Gal	2.2	-	1.6	-	<i>Streptomyces</i>
NS3-3	+	+	W	YBn	S	LL-DAP	-	3.0	-	-	0.5	<i>Streptomyces</i>
NS3-4								-	-	-	-	
NS3-5	+	+	BkBn	YBn		LL-DAP	-	-	-	-	2.8	<i>Streptomyces</i>
NS3-6						Meso-DAP	Gal	-	-	-	-	
NS3-7	-	+	-	BkBn		Meso-DAP	Xyl, Ara	-	-	-	0.2	<i>Micromonospora</i>
NS3-8	+	+	W	P		Meso-DAP		-	-	2.0	-	<i>Nocardiosis</i>
NS3-9	+	+	W	C		Meso-DAP		1.5	-	-	-	<i>Nocardia</i>
NS3-10	+	+	W	PY		LL-DAP	Gal, Ara	-	-	2.2	-	<i>Streptomyces</i>
NS3-11	+	+	W	Bn		Meso-DAP		-	-	-	-	<i>Thermoactinomyces</i>
NS3-12	-	+		Bn		Meso-DAP	Xyl, Ara	-	-	-	-	<i>Micromonospora</i>
NS4-1	+	+	WBn	LY		LL-DAP	-	-	-	-	2.8	<i>Streptomyces</i>

Isolate ID	Aerial hyphae	Substrate hyphae	Color of Spore mass	Color of Substrate	Spore chain type	Cell wall DAP	Sugar Pattern	Antibiosis to				Identified
								<i>B. subtilis</i>	MRSA 21	MRSA 22	<i>C. albicans</i>	
NS4-2	+	+	W	BnPk		Meso-DAP	Gal,,Man, Rhm	1.0	-	-	-	<i>Streptoalloteichus</i>
NS4-3	+	+	DBn	DBn	h, R	LL-DAP	-	-	-	-	-	<i>Streptomyces</i>
NS4-4	+	+	G	WG		LL-DAP	Gal, Man	1.5	-	-	1.2	<i>Streptomyces</i>
NS4-5								-	-	-	-	
NS4-6	+	+	W- >G	Bn	R,h,l	LL-DAP	-	2.0	1.5	1.0	0.2	<i>Streptomyces</i>
NS4-7	+	+	WG	Y		LL-DAP	-	-	-	-	-	<i>Streptomyces</i>
NS4-8	+	+	G	G		LL-DAP	-	-	-	-	-	<i>Streptomyces</i>
NS4-9								-	-	-	-	
NS4-10	-	+	W	W	R, ZZ	Meso-DAP		3.5	2.0	-	-	<i>Nocardiopsis</i>
NS4-11								-	-	-	-	
NS4-12	-	+						2.5	2.5	1.0	-	
NS4-13								-	-	-	-	
NS4-14	+	+	G	Bn	R, h	LL-DAP		-	1.0	1.0	1.0	<i>Streptomyces</i>
NS5-1	+	+	GBn					-	-	-	-	
NS5-2								-	-	-	-	
NS5-3	+	+	W	PkO	R, h	LL-DAP		1.9	1.5	-	-	<i>Streptomyces</i>
NS5-4	+	+	WBn	Bn	S	LL-DAP	Gal	3.2	2.0	-	-	<i>Streptomyces</i>
NS5-5								-	-	-	-	
NS5-6								-	-	-	-	
NS5-7								-	-	-	-	
NS6-1	+	+	W	Bn		Meso-DAP		1.0	1.0	1.0	-	<i>Nocardiopsis</i>
NS6-2	+	+	LG	YBn	R, S	LL-DAP	-	-	-	-	0.3	<i>Streptomyces</i>
NS7-1								-	-	-	-	
NS7-2								-	-	-	-	
NS7-3	+	+	W- >G	WY	R,h	LL-DAP	-	1.0	1.5	1.5	0.5	<i>Streptomyces</i>
NS7-4								-	-	-	-	
NS7-5								-	-	-	-	
WN- POR06-1	-	+	O- >Bk		single	Meso-DAP	Ara, Xyl					<i>Micromonospora</i>

## 2. แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากฟองน้ำทะเลบริเวณเกาะหลัก และจากป่าชายเลนในจังหวัดชุมพร การสร้างสารออกฤทธิ์ และการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์

นำตัวอย่างฟองน้ำที่เก็บได้จากเกาะหลัก จังหวัดชุมพร จำนวน 5 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อบนอาหาร 3 ชนิดคือ ISP2, SCA และ Actinomycete Isolation Agar ด้วยการล้างฟองน้ำด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อ และฆ่าเชื้อผิวนอกของฟองน้ำด้วยอัลกอฮอล์ 70% 30 วินาที นำชิ้นส่วนฟองน้ำ ประมาณ 1 กรัม เติมน้ำทะเลที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 ml บดให้ละเอียดด้วยครกบดยาที่นิ่งฆ่าแล้ว เมื่อชิ้นส่วนที่ละเอียดตกตะกอน ใช้ไปเปิด ขนาด 100  $\mu$ l ดูดส่วนใสชั้นบนมา inoculate ลงบนจานอาหารทั้ง 3 ชนิด (triplicate) เกลี่ยให้ทั่วจาน แล้วนำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยสังเกตเชื้อบนจานอาหารทุกสัปดาห์ เชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนจานจะนำมา แยกให้บริสุทธิ์ และ เก็บรักษาเชื้อทั้งใน อาหารวุ้นเอียง (slant culture) เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป และที่ -40 °C เพื่อเก็บรักษาในระยะยาว

ตารางที่ 4 แอคติโนมัยซีทจากฟองน้ำเกาะหลัก จังหวัดชุมพร ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งและคุณสมบัติทางเคมีของเซลล์

Isolate ID	Aerial hyphae	Substrate hyphae	Color of Spore mass	Color of Substrate	Spore chain type	Cell wall DAP	Sugar Pattern	Antibiosis to			Identified
								<i>S. aureus</i>	MRSA 22	<i>C. albicans</i>	
POR01_LK_1	-	+	OBn	OBn	S	Meso-	-	-	-		
POR01_LK_5	-	+	C	RO	S	Meso-	Ara,Man,Xyl	-	-	-	
POR02_LK_3	-	+			S	Meso-	Ara,Man,Xyl	-	-	-	
POR02_LK_4	-	+	O	O	S	Meso-	Ara,Man,Xyl	-	-	-	
POR02_LK_5	-	+	CO	CO	S	Meso-	Rhm,Glu,Xyl	-	-	-	
POR03_LK_2	-	+	OBn	BnBk	S	Meso-	Gal, Glu	-	-	-	
POR03_LK_3	-	+	OBn	BnBk	S	Meso-	Gal	-	-	-	
POR03_LK_4	-	+	OBn	OBn	S	Meso-	-	-	-	-	
POR03_LK_7	-	+	OBk	OBk	S	Mes-	Man,Gal,Xyl	-	-	-	
POR03_LK_8	-		OBk	OBk	S	Meso-	Gal	-	-	-	
POR03_LK_9	-	+	OBn	OBn	S	Meso-	Gal	0.2	-		
POR03_LK_10	-	+	O	O	S	Meso-	Gal, Man,Xyl	-	-	-	
POR03_LK_11	-		OBn	OBn	S	Meso-	Ara, Gal	-	0.04	-	
POR03_LK_12	-	+	OBn	OBn	S	Meso-	-		-	-	
POR03_LK_14	-	+	LO	LO	S	Meso-	Rhm, Gal,Xyl	-	-	-	
POR04_LK_1	-	+	DO	DO	S	Meso-	?	-	-	-	
POR05_LK_3	-	+	O	O	S	Meso-	Gal, Xyl	-	-	-	
POR05_LK_5	-		OBn	OBn		L-	Gal, Xyl	-	-	0.2	
POR05_LK_6	-	+	OBn	OBn	S	Meso	Ara, Man	-	-	-	

จากการนำแอสโคสปอร์ที่แยกได้นี้มาศึกษาลักษณะรูปร่าง ทางสัณฐานวิทยา ลักษณะสีของเส้นใยและสีของ กลุ่ม สปอร์ เห็นได้ชัดเจนว่า ส่วนมากแล้วแอสโคสปอร์ที่แยกได้จากฟองน้ำบริเวณเกาะหลักนี้ เป็นแอสโคสปอร์ที่อยู่ในแฟมิลี *Micromonosporaceae* เป็นส่วนใหญ่ และเมื่อนำมาศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น ด้วยวิธี Cross streak technique ก็พบว่า ไม่ค่อยพบฤทธิ์ยับยั้ง เฉพาะไอโซเลต POR03\_LK\_9, POR03\_LK\_11 และ POR05\_LK\_5 ที่สามารถแสดงฤทธิ์สารยับยั้งได้เล็กน้อย

ตารางที่ 5 ผลจากการแยกเชื้อแอสโคสปอร์จากป่าชายเลนจังหวัดชุมพรครั้งที่ 2 และผลการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อ จุลินทรีย์

Actinomycetes ID	Isolation medium	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment	Spore chain	Cell wall DAP	Sugar in whole cell	Antibiosis against				
								<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA 22	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
CP-PH 2-2	SCA	-	+			Meso-DAP		-	-	-		-
CP 3-1	M4	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP 3-7	M4	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP-PH 3-2	SCA	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP-PH 3-8	SCA	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP-PH 3-9	SCA	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP-PH 3-12	SCA	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP-PH 3-13	SCA	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP-PH 3-14	SCA	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP-PH 3-15	SCA	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP-PH 3-16	SCA	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP-PH 3-17	HV	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP-PH 3-18	HV	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP-PH 3-19	HV	-	+		Single	Meso-DAP		-	-	-		-
CP 8-4A	M4		+	Bn	Spiral	LL-DAP		+	+	+		+
CP 8-4B	M4		+	Bn	Spiral	LL-DAP		+	+	+		+

ผลการศึกษาสารออกฤทธิ์จากแอสโคสปอร์ และการเลี้ยงในอาหารเหลว ของเชื้อที่ได้จากจังหวัดชุมพรพบว่า มีเฉพาะ ไอโซเลต CP8-4A และ CP8-4B เท่านั้นที่ให้ฤทธิ์ยับยั้ง แบคทีเรียแกรมบวกและ *C. albicans* ที่นำมาทดสอบ จึงได้นำมาเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์ และสารปริมาณมากก่อน ไอโซเลตที่ไม่สร้างจะถูกคัดเลือกมาตรวจสอบภายหลัง

### 3. ผลการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินตะกอนป่าชายเลนปากแม่น้ำในจังหวัดระยองและการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์

ตารางที่ 6 แอคติโนมัยซีทที่แยกได้ใหม่จาก ป่าชายเลนปากแม่น้ำพังราด จ. ระยอง คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาบางประการและคุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์

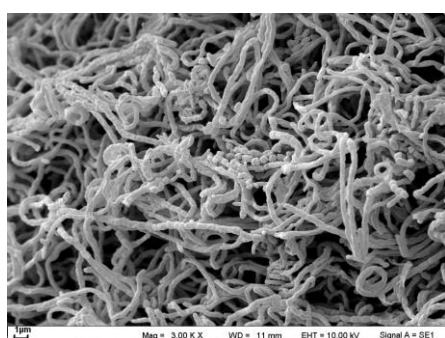
Actinomycete ID	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment	Cell wall DAP	Sugar in whole cells	Identified
RY 2-20	-	O	-	Meso-DAP	Ara, Xyl, Rham, Man	<i>Virgisporangium</i>
RY 2-21	-	O	-	Meso-DAP	Ara,Xyl	<i>Micromonospora</i>
RY 2-22	-	O	-	Meso-DAP	Ara, Xyl, Rham, Man	<i>Virgisporangium</i>
RY 2-23	-	O	-	Meso-DAP	Ara, Xyl	<i>Micromonospora</i>
RY 2-24	-	O	-	Meso-DAP	Ara, Xyl, Rham, Man	<i>Virgisporangium</i>
RY 2-25	-	O	-	Meso-DAP	Gal, Xyl, Ara, Rhm	<i>Virgisporangium</i>
RY 2-31	-	LY	-	Meso-DAP	Ara, Gal, Xyl	<i>Salinispora</i>
RY 3-32	-	LO	-	Meso-DAP	Gal, Ara, Xyl	<i>Salinispora</i>
RY 3-33	-	O	-	Meso-DAP	Gal, Xyl	<i>Spirilliplanes</i>
RY 3-37	-	O	-	Meso-DAP	Ara, Xyl	<i>Micromonospora</i>
RY 3-43	-	Bk	-	Meso-DAP	Gal, Xyl	<i>Spirilliplanes</i>
RY 7-86	-	O	-	Meso-DAP	Gal, Xyl	<i>Spirilliplanes</i>
RY7-87	-	O	-	Meso-DAP	Gal, Xyl	<i>Spirilliplanes</i>
RY8-80 A1	-	YBn	-	Meso-DAP	Xyl, Ara	<i>Micromonospora</i>
RY8-80 A2	-	YBn	YBn	Meso-DAP	Xyl, Ara	<i>Micromonospora</i>
RY 8-80 B1	WG	WG	YBn	Meso-DAP		
RY 8-80 B2	Bn	YBn	YBn	Meso-DAP		
RY 8-81-B1	G	YBn	YBn	Meso-DAP	Gal, Xyl	
RY 8-83-A	G	YBn	YBn	Meso-DAP	Gal , Xyl	
RY 8-83B1	G	Bn	Bn	Meso-DAP	Gal, Xyl	
RY 8-83-B21	RBn	Bn	Bn	Meso-DAP	Gal, Xyl	
RY 8-83-B22	DBn	Bn	Bn	Meso-DAP	Gal, Xyl	
RY 8-83-B31	BkBn	RBn	RBn	Meso-DAP	Gal, Xyl	
RY 8-83-B32	BkBn	RBn	RBn	Meso-DAP	Gal, Xyl	

หมายเหตุ: Bk= Black, Bn= Brown, BkBn= Blackish brown, DBn = Dark brown, G= Gray, LBn = Light brown, O= Orange, LO= Light orange, LY= Light yellow, RBn= Reddish brown, Meso-DAP= Meso- Diaminopimelic acid, Ara= Arabinose, Gal – Galactose, Man= Mannose, Rhm= Rhamnose, Xyl= Xylose

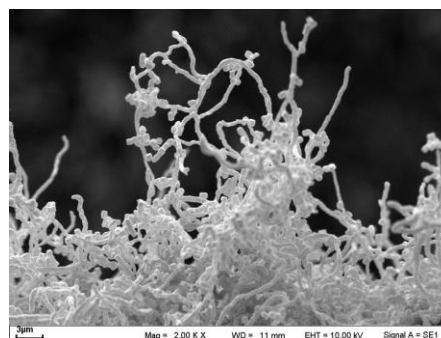
ผลจากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ และการตรวจดูลักษณะรูปร่างของโครงสร้างของแอสคิตินอไมซ์ซีทที่แยกได้ใหม่ ทั้งที่ได้จากบริเวณป่าชายเลน จังหวัดชุมพร และจังหวัดระยองพบว่าส่วนมากแล้ว เป็นแอสคิตินอไมซ์ซีท ในกลุ่ม Family *Micromonosporaceae* (Maldonado, 2005a) ยกเว้นไอโซเลตที่ CP-8-4A และ CP-8-4B ที่เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Streptomyces* และสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรียและ *Candida albicans* ได้ดีมาก

#### 4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ/ชีวเคมีบางประการ

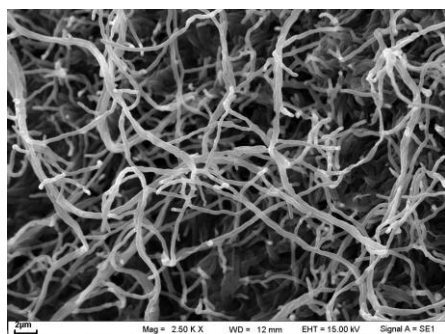
ผลการตรวจดูลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิตินอไมซ์ซีทที่เลือกไว้ ซึ่งตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) ในเบื้องต้น และเตรียมตัวอย่าง โดยเลี้ยงให้เจริญบนจานอาหาร ISP2 ที่ 30 °C เป็นเวลา 5-7 วัน ก่อน fix ด้วย gluteraldehyde เป็นเวลา 1 คืน(ห่อด้วยอลูมิเนียมฟอล์ยเพื่อไม่ให้ถูกแสง) แล้ว dehydrate น้ำออกด้วยอัลกอฮอล์ เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ (30%, 50%, 70%, 85%, 95% และ absolute ethanol ) แล้วทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry หรือวิธี Critical point drying (CPD) ก่อนเคลือบด้วยทองคำ แล้วตรวจดูด้วยกล้อง Scanning electron microscope (ภาพที่ 4)



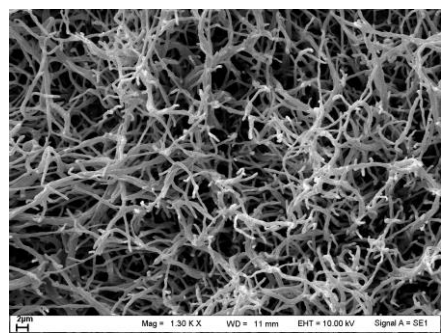
NS 3-3



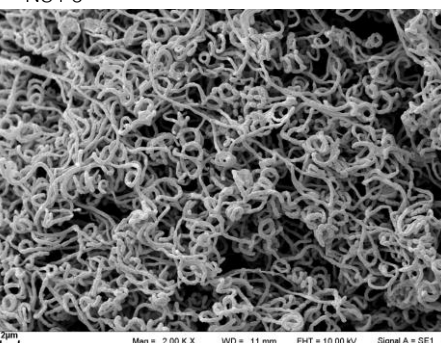
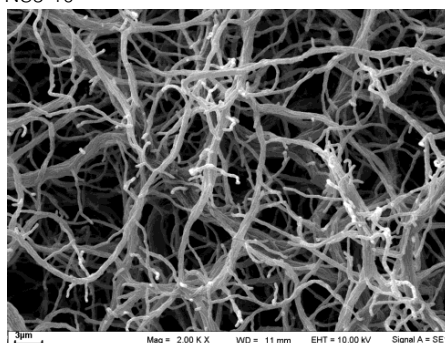
NS3-7

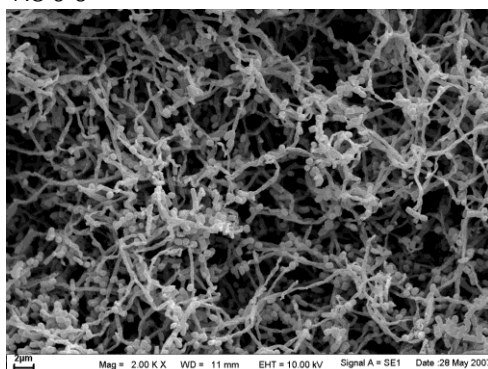
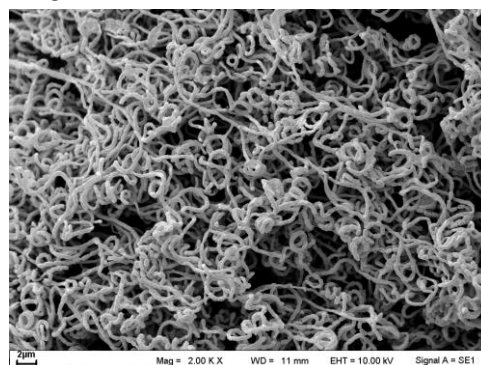
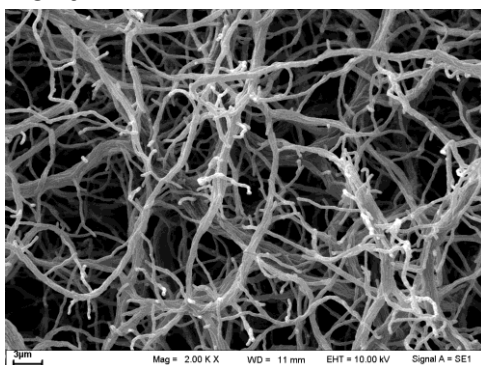
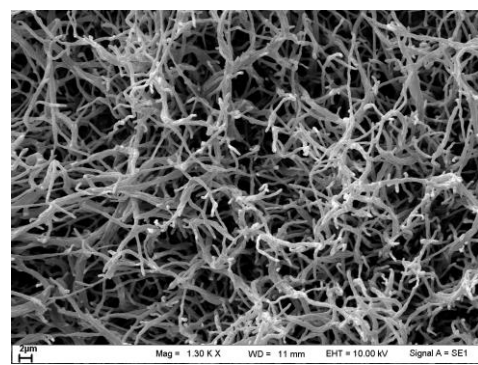
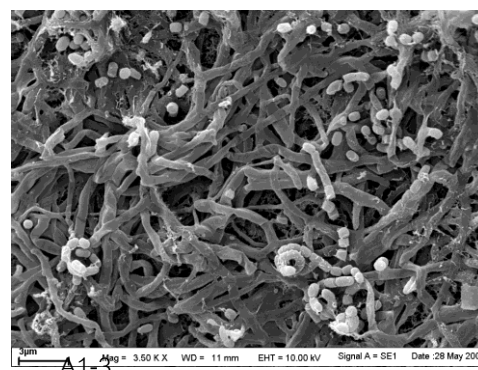
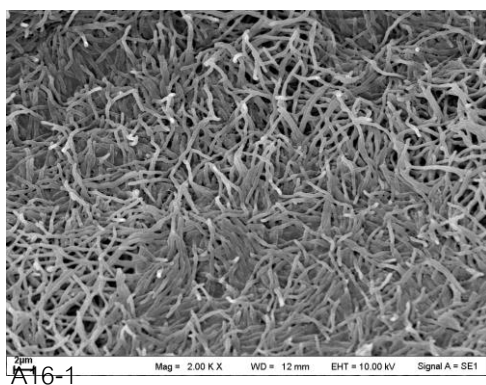


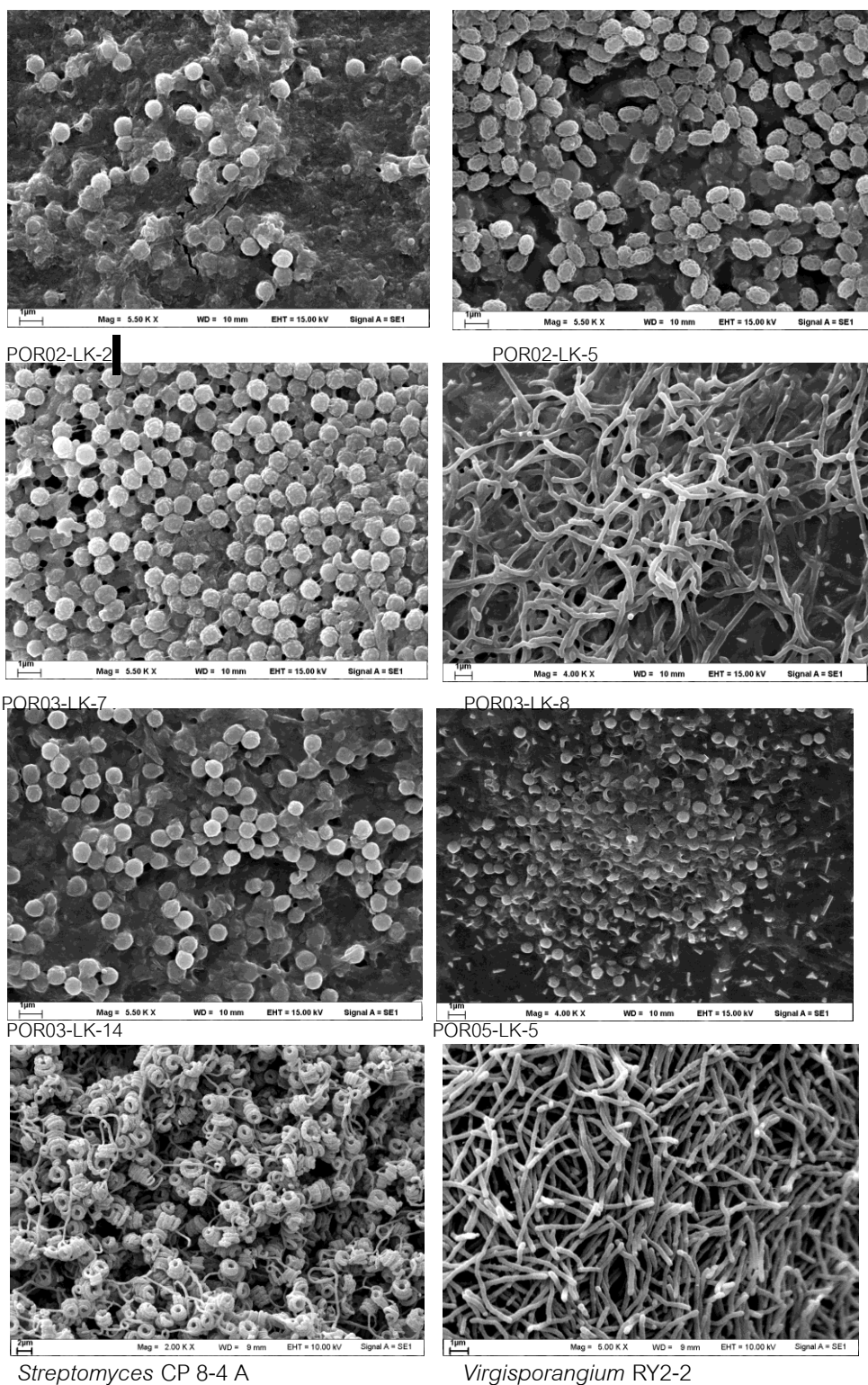
NS3-10



NS4-3







ภาพที่ 4 ภาพจากภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope ของแอดติโนมัยซีทจากบริเวณต่าง ๆ : บริเวณชายฝั่ง *Streptomyces* A1-3, A 3-3 (ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ด้วยแสง UV แล้ว), *Streptomyces* CH54-5, A16-1 ป่าชายเลน NS3-3, NS3-7, NS3-10, NS4-3, NS4-6, NS6-2, NS4-14, CP8-4 A,RY2-2 และที่ได้จากฟองน้ำ POR02-LK-2, POR02-LK-5, POR03-LK-7, POR03-LK-8, POR03-LK-14, และ POR 05-LK-5



การตรวจสอบแอคติโนมัยซีทที่ให้สารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดี และ/หรือสร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี จาก ทั้งเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีอยู่เดิม และแอคติโนมัยซีทที่แยกเชื้อได้ใหม่ในจังหวัดนครศรีธรรมราช ได้คัดเลือกมาศึกษา คุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ และคุณลักษณะชีวเคมีบางประการ ได้ผลดังตารางผลการทดลองที่ 7 และภาพที่ 7 ภาพที่ 8 แสดงผลวิเคราะห์ทางเคมีผนังเซลล์ของเชื้อที่ได้จากฟองน้ำ บริเวณเกาะหลัก เพื่อให้ได้ข้อมูลมากขึ้นสำหรับการ บ่งบอชนิดในระดับสกุล

#### 4.1 ผลการตรวจสอบคุณลักษณะ ทางทางชีวเคมีบางประการ ของแอคติโนมัยซีทที่สร้าง สารยับยั้งจุลินทรีย์

ตารางที่ 7 คุณลักษณะทางทางชีวเคมีบางประการ ของแอคติโนมัยซีทที่สร้าง สารยับยั้งจุลินทรีย์ และ/หรือ สารต้านอนุมูล อิศระ

Character	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Production of diffusible pigments	Red	Yellow	Yellow-brown												
Growth on sole carbon source (1% w/v)															
L-Arabinose	+	w	+	-	+	-	-	+	+	+	-	w/+	w/+	+	+
D-Fructose	w/-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	w/+	-	w/+	+
Meso-Inositol	+	w	+	-	+	w/-	-	+	+	+	-	w/-	w/+	+	w/+
D-Mannitol	W	w	+	W	+	w/-	w/-	+	+	+	-	w/+	w/+	+	+
D-Raffinose	W	+	+	-	+	w/-	w/+	+	+	+	-	w/-	w/-	-	-
D-Rhamnose	-	+	+	-	+	w/-	w/+	+	+	+	w/+	w/+	-	w/+	+
D-Sucrose	+	+	+	W	+	+	w/-	w/+	+	+	-	W+	+	+	w/+
D-Xylose	w	+	+	-	+	-	-	w/+	+	+	-	W+	-	+	+

หมายเหตุ : w= weak, 1= A16-1; 2= CH54-8; 3= NS2-2; 4= NS2-3; 5= NS2-5; 6= NS3-1; 7= NS3-1; 8= NS4-2; 9= NS4-6; 10= NS5-1; 11= NS5-3; 12= NS6-2; 13= NS7-3; 14= NS3-10; 15= WN-POR-06

#### 4.2 ผลของการศึกษาความเหมาะสมของอาหารชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญ / สารรงควัตถุ ของแอคติโนมัยซีท

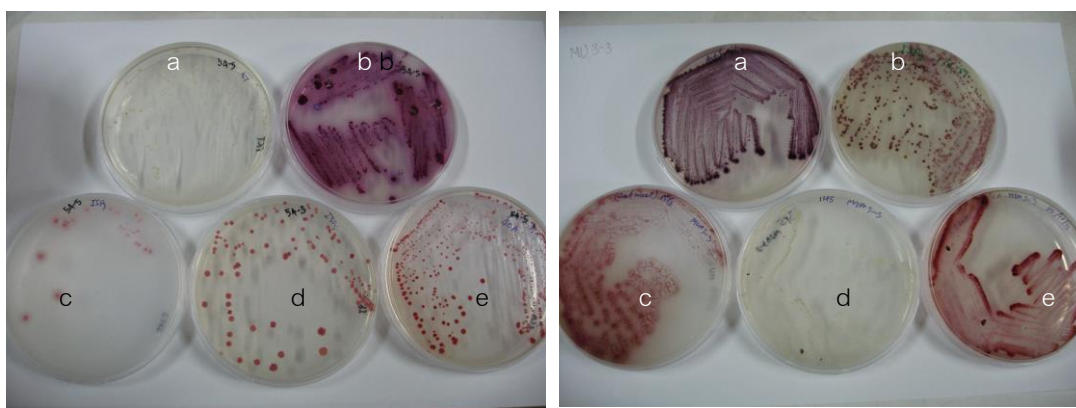
แอคติโนมัยซีทที่สร้างรงควัตถุ และสารออกฤทธิ์ที่ดี จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ เพื่อศึกษาความเหมาะสมในการเจริญในอาหารชนิดนั้น ๆ รวมทั้งศึกษาการสร้างรงควัตถุ โดยคัดเลือกจากแอคติโนมัยซีทที่มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันมาเลี้ยงในอาหาร Glucose-Yeast, ISP2, ISP3 (Oat meal agar), ISP4 (Inorganic Salt Starch), ISP5 (Glycerol-Asparagine), ISP7 (Tyrosine Agar) และ ISP8 ได้ผลดังตารางที่ 8 โดยเลือกศึกษาจากแอคติโนมัยซีท A1-3, A3-3, CH554-8 และ A16-1 ซึ่งเป็นแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินชายฝั่ง จ. ชลบุรี และที่แยกได้ใหม่จากป่าชายเลน จังหวัดนครศรีธรรมราช รวมทั้งอีกหนึ่งไอโซเลตที่ได้จากเกาะวังนอก การศึกษาการเจริญนี้ จะทำให้ทราบถึงอาหารที่เหมาะสมกับการเลี้ยงแอคติโนมัยซีทที่สุด ก่อนที่จะมีการเลี้ยงปริมาณมากขึ้น เพื่อศึกษาสารแอนติออกซิ

แดนที่ ซึ่งเชื้อที่เลือกไว้ส่วนใหญ่ ถ้าไม่มีสีแดง หรือสีของมัยซีเลี่ยมสดใส เด่นชัด ก็เป็นแอสโคดิโนมัยซีที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งที่ดีมากหรือทั้งมีสีสดใส และมีฤทธิ์ยับยั้งด้วย (ภาพที่ 5, 6)

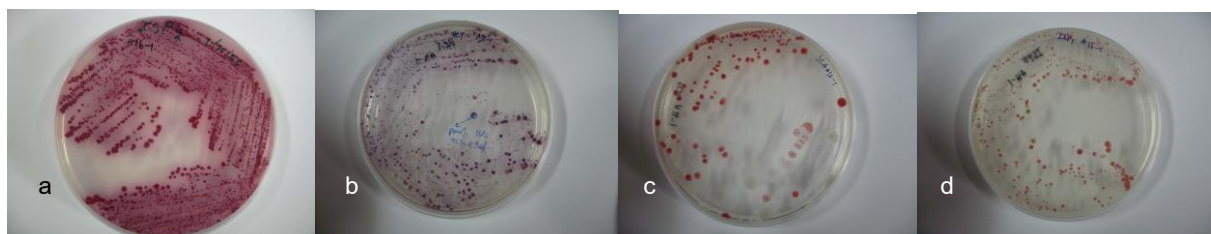
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบการเจริญ และสีของรวงควัดที่เปลี่ยนไปของแอสโคดิโนมัยซีที่ บนอาหารชนิดต่าง ๆ

Isolate ID	Glucose-Yeast extract	ISP2	ISP3 (Oatmeal)	ISP4	ISP5	ISP7 (Tyrosine)	ISP8
A16-1	+++ P/P	++++ P/R	++ W/W	++ CW/C	++C/P	++ W/P	++++ G/PBn
CH54-8	++ CW/LY	++++Bn/BnY	+++ WP/WP	+ C/C	++ C/C	+++ BnR/BnR	++ W/LY
NS2-2	++++ LBn/Bn	++++W/BnY	++++ Gn/LBn	++I- C/C	+++Bn/Bn	++++ Bn/DBn	++++Bn D ring/ same
NS2-3	++++ W/BnY	+++ W/LY	+++ LG/LG	+ C/C	++ W/LG	+++ G/ LG	++ W/W
NS2-5	++++ W/BnY	++++ GBn/BnY	+++ CBn/CBn	+ C/C	++ W/LG	+++ W/ LG	+++ W/W
NS3-1	++++ LY/LY	+++ C/ LBnY	+ C (no aerial)	NA	++ WC/WC	+++ CY/CY	++++ LY/LY
NS3-2	++++ W/BnY	++++ W/ WY	+ C (no aerial)	NA	++ WC	+++ CY/CY	++++ WLY/LY
NS4-2	+++ LBn/Bn	+++ Bn/ BnY	++ Bn/.Bn	+ C/C	+ C/C	+++ BnP/BnP	+++ Bn/Bn
NS4-4	NA	++++ Bn/BnY	NA	NA	NA	NA	NA
NS4-6	++++ LBn/ LBnY	NA	+ C/C	+ C	+++ CLBn	+++ PBn/PBn	+++ Bn/Bn
NS5-1	++++YLbn/same	+ C/C	+++ WC/C	+ C	+ C	NA	++++ LBn/LBn
NS5-3	+++ W/Y	+ W/C	++ W/W	NA	+ W/W	++ W/W	++++ W/LY
NS5-4	NA	++++ W/LBn	NA	NA	NA	NA	NA
NS6-2	++++ W/Y	+++ WC/C	+++ C no aerial	NA	+++ C	+++ LY	++++ CLBn
NS7-3	++++W/Y	++++W/Y	+++ w/C	NA	+++ C	+++ LY/LY	++++ LY/LY
NS3-10	++++ W/BnY	++++ W/WY	+++ WC	NA	++ W/WC	NA	++++ LBn/LBn
NS4-14	+++ C	+++ C	NA	NA	NA	NA	++++ W->LY/LY
WN-POR-06-1	++ Bn no aerial	++++ OBk	+++ BnY	NA	++ LBn	+++ OLBn	++++ O->Bk

หมายเหตุ: + ไม่ค่อยเจริญ ++ เจริญไม่ดี +++ เจริญปานปานกลาง ++++ เจริญดี และดีมาก Bk=black, Bn= brown, C= cream, CY= cream yellow, G= gray, LG= light gray, LBn= light brown, W= white, WC= whitish cream, LBn= light brown, O=orange, P=pink, Y=yellow, NA= not applicable



ภาพที่ 5 การเจริญและการสร้างสารรงควัตถุ บนอาหารชนิดต่าง ๆ (a=Actinomycetes Isolation Agar, b= ISP2, c=ISP3, d= ISP5, f= Starch Casein)ของ แอคติโนมัยซีท CH 54-5 และ A3-3



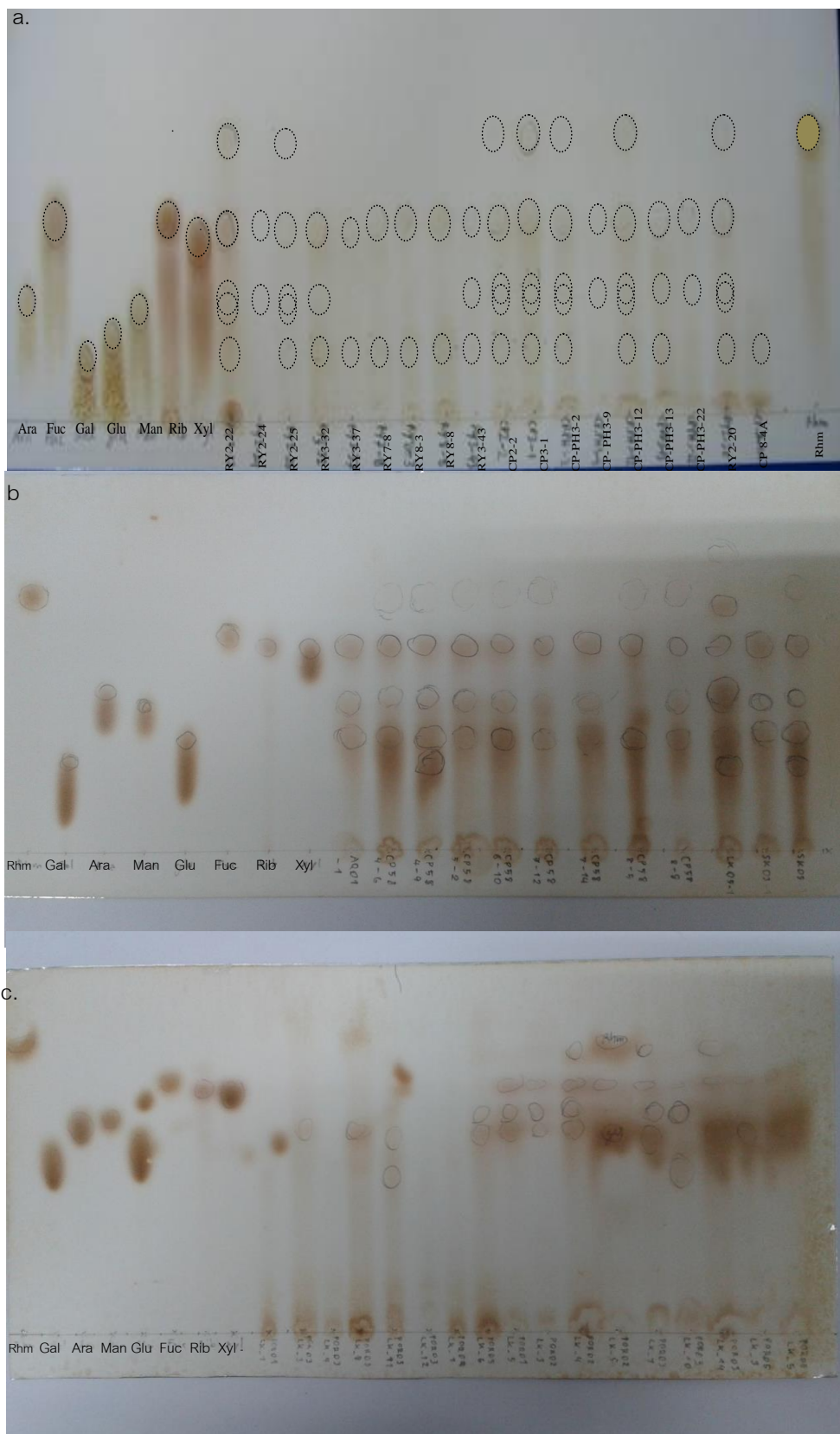
ภาพที่ 6 การเจริญและการสร้างสารรงควัตถุ บนอาหารชนิดต่าง ๆ ของ แอคติโนมัยซีท A16-1, a บน ISP2, b บน Actinomycete Isolation Agar, c บน Starch Casein Agar, d บน ISP5

จะเห็นได้ชัดเจนว่า ชนิดของอาหาร หรืออีกนัยหนึ่งองค์ประกอบของธาตุอาหารที่มีในอาหารแต่ละชนิด มีผลต่อการเจริญเติบโตและกักการสังเคราะห์รงควัตถุของแอคติโนมัยซีท

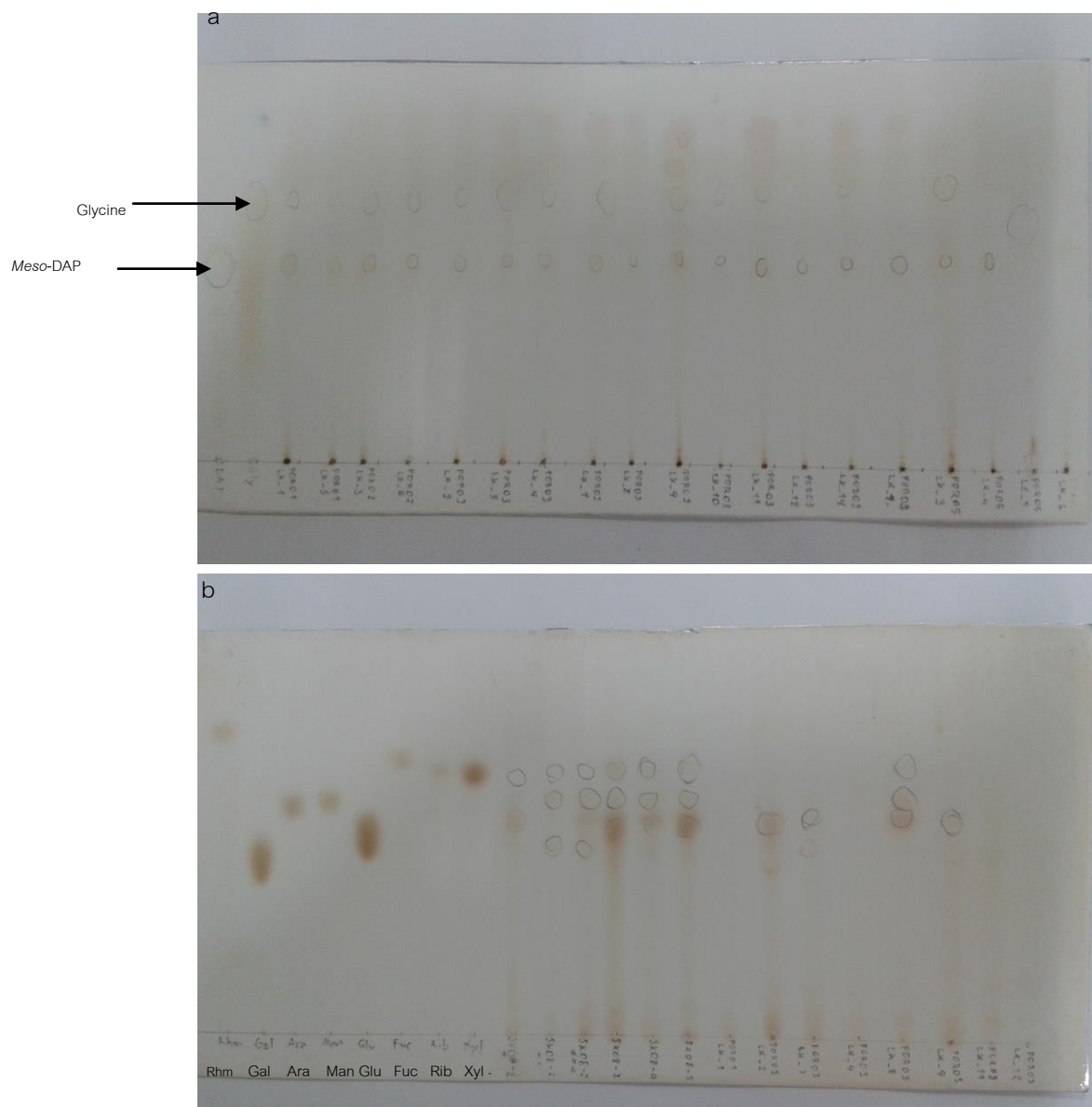
#### 4.3 ผลจากการศึกษาการเจริญ และการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ pH ต่าง ๆ

จากที่ได้คัดเลือกเชื้อที่สร้างสารออกฤทธิ์/ รงควัตถุ ที่ดี มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ MRSA 21, MRSA 22, MRSA 39 และ *C. albicans* ที่ pH 7, pH 7.5, pH 8.0 และ pH 9.0 เพื่อศึกษาความเหมาะสมของ pH ต่อการเจริญและการสร้างสารออกฤทธิ์ ยับยั้ง ได้ผลดังตารางที่ 9 ผลที่ได้พบว่าแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่เจริญได้ดีในหลาย ๆ pH รวมทั้งการสร้างสารออกฤทธิ์ซึ่งภาพด้วย ที่ pH ที่มีค่าเป็นเบส ก็ไม่ส่งผลต่อการสร้าง แต่ยังคงสร้างได้ดี แม้ pH จะสูงถึง 8.0





ภาพที่ 7 a, b โคโรมาโทแกรมของการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลภายใน whole-cell hydrolysates ของแอคติโนมัยซีท์ที่แยกเชื้อได้จาก ป่าชายเลนใน จังหวัดระยอง จังหวัดชุมพร และ c บางส่วนจากฟองน้ำบริเวณเกาะหลัก จังหวัดชุมพร



ภาพที่ 8 a, โครมาโตแกรม ของการวิเคราะห์ DAP ที่พบที่ ผงแห้งเซลล์ของแอสคิโนไมซีที่จากเกาะหลัก b, โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์น้ำตาลที่พบใน whole-cell hydrolysates ของเซลล์แอสคิโนไมซีที่จากเกาะหลัก

ผลจากโครมาโตแกรมในภาพ ที่ 8a และภาพที่ 7c จะเห็นได้ว่าแอสคิโนไมซีที่แยกได้จากฟองน้ำบริเวณ เกาะหลักนั้น มี Diaminopimelic acid ที่เป็นองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ชนิด Meso-DAP และมี glycine และมีน้ำตาลเป็น องค์ประกอบหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง น้ำตาล Xylose, Arabinose, Mannose และ Galactose ซึ่งเป็นคุณสมบัติ ของผนังเซลล์ของแอสคิโนไมซีในกลุ่ม *Micromonosporaceae*

ตารางที่ 10 แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากป่าชายเลนจังหวัดชุมพรครั้งแรกและคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาบางประการ และทางเคมีของผนังเซลล์

Actinomycete ID	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment	Cell wall DAP	Sugar Pattern	Identified
CP 2-2	-	O	-	Meso-DAP	Ara, Xyl	<i>Micromonospora</i>
CP 3-7	-	LO	-	Meso-DAP	Aa, Xyl, Gal	<i>Salinispora</i>
CP 3-8	-	LY	-	Meso-DAP	Ara, Xyl	<i>Micromonospora</i>
CP3-9	-	BkO	-	Meso-DAP	Ara, Xyl,	<i>Micromonospora</i>
CP3-12	-	BkO	-	Meso-DAP	Ara, Xyl, Rham, Man	<i>Virgisporangium</i>
CP3-13	-	LO	-	Meso-DAP	Gal, Ara, Xyl	<i>Salinispora</i>
CP3-14	-	O	-	Meso-DAP	Ara, Xyl	<i>Micromonospora</i>
CP3-15	-	OBn	-	Meso-DAP	Ara, Xyl	<i>Micromonospora</i>
CP3-16	-	O	-	Meso-DAP	Ara, Xyl	<i>Micromonospora</i>
CP3-17	-	LO	-	Meso-DAP	Ara, Xyl, Gal	<i>Salinispora</i>
CP3-18	-	O	-	Meso-DAP	Ara, Xyl	<i>Micromonospora</i>
CP-PH-3-22	-	O	-	Meso-DAP	Ara, Xyl, Rham, Man	<i>Virgisporangium</i>
CP8-4A	DBn	Bn	Bn	LL-DAP	Gal	<i>Streptomyces</i>
CP8-4B	DBn	Bn	Bn	LL-DAP	Gal	<i>streptomyces</i>

5. การเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทปริมาณมากเพื่อการสกัดสาร เพื่อส่งเซลล์ต่อให้กับโครงการที่ 3 และที่ 4 สำหรับการทดสอบฤทธิ์ชีวภาพอื่น ๆ (antioxidant) และวิเคราะห์กรดไขมัน (ตารางที่ 11)

แอคติโนมัยซีทที่ถูกคัดเลือกเพื่อผลิตเซลล์ปริมาณมากเพื่อส่งต่อโครงการที่ 4 และที่ 3 โดยจะนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 หรือ Glucose yeast extract เป็นเวลา 10-14 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าเชื้อเพื่อให้อากาศที่ 110 rpm เก็บเซลล์ ด้วยวิธี centrifuge แยกเซลล์ และส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากกัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน และ สารแอนติออกซิแดนท์ โดยส่งเป็นเซลล์เปียก ซึ่งได้แก่แอคติโนมัยซีทต่อไปนี้ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แอคติโนไมซีที่ที่ได้คัดเลือกไว้และได้เลี้ยงเชื้อปริมาณมากเพื่อนำส่งโครงการที่ 3 และโครงการที่ 4 เพื่อการวิเคราะห์กรดไขมัน และสารแอนติออกซิแดนซ์

Isolate ID	Fatty acid analysis	Antioxidant analysis	Crude extract(g wet wt/ medium (ml))
แอคติโนไมซีที่ จากจันทบุรี			
CH 54-5	Cell	Cell and medium	88.74/2,250
CH54-8		Cell and medium	75.55/1,500
แอคติโนไมซีที่ จากชลบุรี			
C15-1	Cell	Cell and medium	35.30/700
A16-1	Cell	Cell and medium	18.56/1,000
แอคติโนไมซีที่ จาก นครศรีธรรมราช			
NS1-2	Cell	Cell and medium	14.22/500
NS2-2	Cell	Cell and medium	73.15/500
NS2-3	Cell	Cell and medium	5.56/500
NS2-5	Cell	Cell and medium	12.33/250
NS3-6	Cell	Cell and medium	17.91/250
NS3_7	Cell	Cell and medium	NA/250
NS3-10	Cell	Cell and medium	14.28/400
NS4-2	Cell	Cell and medium	12.78/250
NS4-4	Cell	Cell and medium	5.44/250
NS4-6	Cell	Cell and medium	67.5/2,250
NS4-10	Cell	Cell and medium	7.57/250
NS4-14	Cell	Cell and medium	41.64/1,000
NS5-1 (Glucose-Yeast extract)	Cell	Cell and medium	29.51/250
NS5-3	Cell	Cell and medium	6.54/250
NS6-1	Cell	Cell and medium	1.95/250
NS6-2	Cell	Cell and medium	33.2/250
NS7-3	Cell	Cell and medium	16.19/250
NS7-4	Cell	Cell and medium	35.8/1,000
แอคติโนไมซีที่แยกจากฟองน้ำ			
WN-POR -2-1 ACT	Cell	Cell and medium	27.82/250
WN-POR-06-1 SCA	Cell	Cell and medium	142.19/1,250
RB-POR-02-1 ( <i>Aspergillus</i> )	Cell	Cell and medium	49.53/1,250



## 5.1 การเลี้ยงแอกติโนมัยซีทปริมาณมาก และการศึกษาปริมาณสารสกัดหยากก่อนการกลายพันธุ์

การเลี้ยงแอกติโนมัยซีทในปริมาณมากขึ้น สำหรับชนิดที่พบว่าให้ฤทธิ์ยับยั้งที่ดี ไม่ว่าจะต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะต่อเชื้อ MRSA เชื้อยีสต์ *Candida albicans* หรือออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้ออย่างใดอย่างหนึ่ง รวมทั้งแอกติโนมัยซีทที่ให้แรงควัดหรือสารสี หรือมี soluble pigment ละลายออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณมาก จะถูกเลือกมาทดสอบการเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ เพื่อศึกษาการเจริญและการสร้างสารทุติยภูมิเช่นสารสีที่สร้างขึ้น ก่อนที่จะเลี้ยงในปริมาณมากมากขึ้น โดยเลือกชนิดที่สร้างสารได้มากมาเลี้ยงในอาหาร ISP2 อาหาร Oatmeal และอาหาร Starch Casein Agar โดยเลี้ยง ที่ 30° C บ่มเชื้อไว้ 7 วัน พบว่า อาหาร ISP2 เป็นอาหารที่เชื้อทุกตัวสามารถเจริญได้ดี และสร้างสารออกฤทธิ์ได้มากกว่าอาหาร Oatmeal และอาหาร Starch Casein ดังนั้นการเลี้ยงปริมาณมากขึ้นเพื่อสกัดสารออกมาสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัยซีทซึ่งมีทั้งแอกติโนมัยซีทที่คัดเลือกไว้เดิม และที่แยกเชื้อได้ใหม่ คือ A3-3, CP-PH 3-2, CP-PH3-12, และ CP8-4 A (20.6 g/ 3l) จะเลี้ยงในอาหาร ISP2 (Malt extract-Yeast extract) เขย่าเพื่อให้อากาศที่ความเร็วรอบ 110 rpm เป็นเวลา 7-10 วัน เก็บเซลล์ ด้วยวิธี centrifuge แยกเซลล์ และส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากกัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน และ สารแอนติออกซิแดนท์ โดยส่งเป็นเซลล์เปียกไปยังโครงการที่ 3 และ 4 (ตารางที่ 12) ตารางที่ 12 นำหนักเซลล์แอกติโนมัยซีท และสารสกัดที่ได้จากเซลล์ /อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ก่อนที่จะเหนี่ยวนำด้วยแสง UV

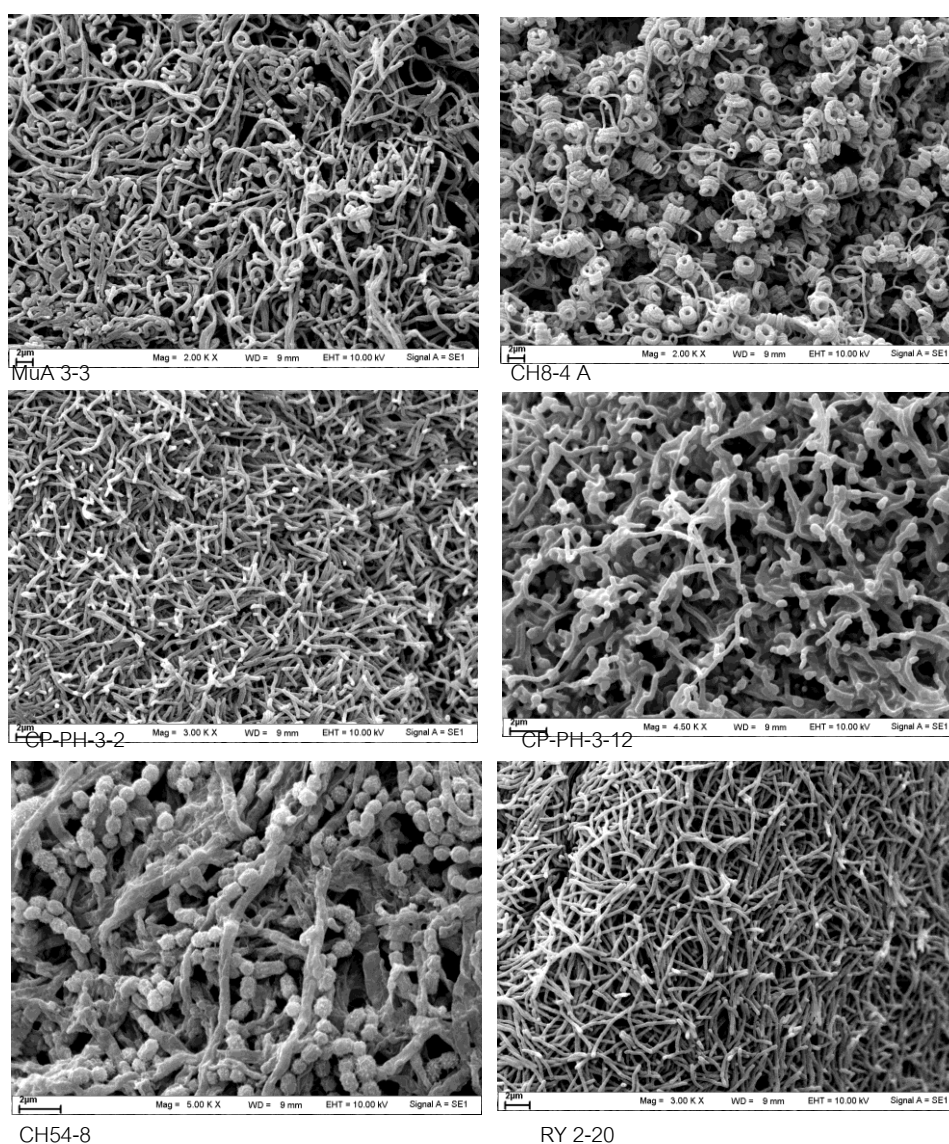
Actinomycete ID	น้ำหนัก เซลล์ (g) (wet wt.)	น้ำหนักสารสกัดที่ได้	
		เซลล์ (mg)	medium (mg)
CH 54-8	23.4 g	27.3 mg	19.7 mg
CP -PH-3-2	5.7 g	31.2 mg	20.3 mg
CP-PH-3-12	5.0 g.	30.0 mg.	22.2 mg
CP 8-4-A	28.1 g	170 mg	54.6 mg
RY 2-20	8.4 g	170 mg	54.6 mg
A3-3	1 l culture medium	0.7977 g	NA

## 5.2 การเหนี่ยวนำแอกติโนมัยซีทให้กลายพันธุ์ ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultra violet, UV)

วิธีการชักนำให้เชื้อกลายพันธุ์ด้วยแสง UV จะนำ สปอร์ของเชื้อมา expose ต่อแสง UV ในระยะ 30 ซม. ที่เวลา 15, 20 และ 25 นาที แล้วนำสปอร์ที่ expose แสง UV (Ekwealor and Obeta, 2006; Veerapagu *et al.*, (2008) แล้วมาเลี้ยงบนจานอาหารที่เหมาะสมที่สุด (ISP2) หลังจากบ่มเชื้อให้เจริญที่ 32 °C แล้ว จึงตรวจสอบคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่สร้าง สารสีเข้มที่สุด (ในระยะเวลาที่เลี้ยงเท่า ๆ กัน) ซึ่งสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า แล้วเลี้ยงเพื่อการสกัดสารเมตาโบไลต์ในปริมาณ 250 ml (3 ขั้ว) ทั้งจากเซลล์ และจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วย methanol และ ethyl acetate ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับ การสร้างสารจากแอกติโนมัยซีทก่อนที่จะ expose ด้วยแสง UV ได้ผลดังตารางที่ 13

จากการกระตุ้นให้เชื้อแอคติโนมัยซีท 6 สายพันธุ์ กระจายพันธุ์โดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 15, 20 และ 25 นาที แล้วคัดเลือกโคโลนีที่เชื้อมีการสร้างสีเข้มที่สุด ได้แก่ MUCP-PH-3-2 ที่ 25 นาที, MUCP-PH-3-12 ที่ 25 นาที, MUCP-8-4-A ที่ 15 นาที, MUCH54-8 ที่ 25 นาที, MUA3-3 ที่ 20 นาที และ MURY2-20 ที่ 15 นาที นำมาเลี้ยงบนอาหาร ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

แอคติโนมัยซีทที่ได้นำมาเหี่ยวนำไปให้กระจายพันธุ์ จะถูกเลือกมาเตรียมเซลล์เพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยการเลี้ยงแอคติโนมัยซีทที่จะศึกษา ให้ถึงระยะที่สร้างสปอร์ บนอาหาร ISP2 หลังจากนั้น fix ด้วยสารกลูเทรลดีไฮด์ 1 คืน ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ดิ้งน้ำออกจากเซลล์ด้วย อัลกอฮอล์ 30%, 50%, 70%, 85%, 95% และ absolute alcohol นำไปทำให้เซลล์แห้ง (freeze dry) แล้วจึงฉายด้วยทองคำก่อนศึกษาภายใต้กล้อง ดังในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระ ที่นำมาเหี่ยวนำไปให้กระจายพันธุ์ ด้วยแสง UV : CP-PH 3-2, CP-PH 3-12, CH 54-8, CP 8-4 A, A3-3 และ RY 2-2

ตารางที่ 13 น้ำหนักสารสกัดทั้งหมดจากการเลี้ยงเชื้อแอสคิตินอไมซีทาก่อนและหลังที่รีทด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

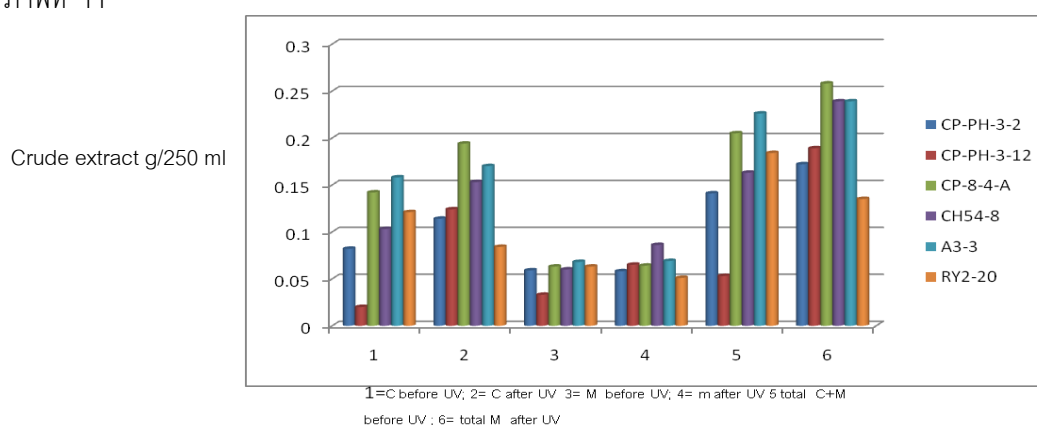
เชื้อแอสคิตินอไมซีท	น้ำหนักสารสกัดจากเซลล์ (g/250ml)		น้ำหนักเฉลี่ยสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (g/250 ml)		รวมน้ำหนักสารสกัดทั้งหมด (g/250 ml)	
	ก่อนที่รีท UV	หลังที่รีท UV	ก่อนที่รีท UV	หลัง ที่รีท UV	ก่อนที่รีท UV	หลัง ที่รีท UV
CP-PH-3-2	0.082	0.114	0.059	0.058	0.141	0.172
CP-PH-3-12	0.020	0.124	0.033	0.065	0.053	0.189
CP-8-4-A	0.142	0.194	0.063	0.064	0.205	0.258
CH54-8	0.103	0.153	0.060	0.086	0.163	0.239
A3-3	0.158	0.170	0.068	0.069	0.226	0.239
RY2-20	0.121	0.084	0.063	0.051	0.184	0.135



ภาพที่ 10 การสร้างรงควัตถุ ของแอสคิตินอไมซีท A3-3

หลังจากเหนี่ยวนำด้วยแสง UV 20 นาที บนอาหาร ISP2

จากการทดสอบนี้ เชื้อแอสคิตินอไมซีท 6 ชนิด ที่นำมาเหนี่ยวนำด้วยแสง UV ส่วนมากแล้วสร้างสารได้เพิ่มขึ้น ในระดับหนึ่ง ยกเว้นชนิดเดียวคือ RY 2-22 ที่ สร้างสารลดลง เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างเป็นกราฟแท่ง แสดงดังในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 .ปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากทั้งของเซลล์ และจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนการเหนี่ยวนำ และหลังการเหนี่ยวนำด้วยแสง UV



ตารางที่ 15 แสดงองค์ประกอบของสารสกัดหยาบของแอดดีโนมายซีท์ก่อนเหนียวน้ำ เทียบกับเชื้อที่เหนียวน้ำด้วยแสง UV  
แล้วของ CP-8-4-A, MUCP-8-4-A, CH54-8 และ MUCH54- 8

component	ค่า $R_f$ ของ components							
	CP-8-4-A		MUCP-8-4-A		CH54-8		MUCH54-8	
	เซลล์	น้ำเลี้ยง	เซลล์	น้ำเลี้ยง	เซลล์	น้ำเลี้ยง	เซลล์	น้ำเลี้ยง
1	0.2763	0.3882	0.1710	0.3816	0.2361	0.3403	0.2500	0.2222
2		0.7368	0.2763	0.7237	0.3611	0.4167	0.3611	0.2986
3		0.8421	0.5658	0.8421		0.4861		0.3403
4			0.6316			0.5694		0.4306
5			0.6842					0.4861
6			0.7434					0.5694
7			0.8158					

ตารางที่ 16 แสดงองค์ประกอบของสารสกัดหยาบของแอดดีโนมายซีท์ก่อนเหนียวน้ำ เทียบกับเชื้อที่เหนียวน้ำด้วยแสง UV  
แล้วของ A3-3, MUA3-3, RY2-20 และ MU RY2-20

component	ค่า $R_f$ ที่คำนวณได้							
	A3-3		MUA3-3		RY2-20		MURY2-20	
	เซลล์	น้ำเลี้ยง	เซลล์	น้ำเลี้ยง	เซลล์	น้ำเลี้ยง	เซลล์	น้ำเลี้ยง
1	0.4306	0.1528	0.4167	0.1667	0.0667	0.2533	0.0533	0.2667
2	0.6389	0.2222	0.6389	0.2222	0.1400	0.3933	0.1333	0.4000
3	0.7361	0.3194	0.7292	0.3194	0.8267	0.4400	0.8133	0.4533
4		0.4028		0.4167		0.5067		
5		0.4861		0.5000		0.7333		
6		0.7361		0.7500		0.8267		

## 6. การศึกษาลำดับเบส ของ 16S rRNA gene เพื่อจำแนกชนิด

ได้เลือกแอสโคดิโนมัยซีทที่ให้ฤทธิ์ ทั้งการสร้างสารแอนติไบโอติกที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ได้มาก หรือสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด หรือมีการสร้างสารแอนติออกซิแดนซ์ที่น่าสนใจ มาสกัด DNA เพื่อหาลำดับเบส ของ 16S rRNA ยีน ได้แก่ A1-3, A3-3, A16-1, CH54-5, CP-8-4 A, CP58-4-21, NS3-2, NS3-10, NS1-4, NS7-3, และยีสต์ BS 6-2, AS1-8 พบว่าแอสโคดิโนมัยซีทส่วนมากเป็นแอสโคดิโนมัยซีทในจีนัส *Streptomyces* ทั้งหมดยกเว้น SK 08-5 และ ยีสต์ A1-8 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Rhodotorula mucilaginosa* (ดังตารางที่ 17) ซึ่งลำดับเบส ยังไม่ได้เผยแพร่ ตารางที่ 17 แอสโคดิโนมัยซีท และยีสต์ที่จำแนกชนิดด้วยการศึกษาลำดับเบส ของ 16S rRNA gene,

Isolate ID	Length of nucleotide	Score		% identity Plus/plus	Description
		Bit	Raw		
A1-3	Full sequence	-	-	99.79	<i>Streptomyces indiaensis</i> NBRC 13964 <sup>T</sup>
A3-3	Full sequence	-	-	99.85	<i>Streptomyces indiaensis</i> NBRC 13964 <sup>T</sup>
A16-1	Full sequence	-	-	99.101	<i>Streptomyces indiaensis</i>
CH54-5	Full sequence	-	-		<i>Streptomyces indiaensis</i>
CP8-4A	1512	2665	1443	100	<i>Streptomyces lannensis</i> strain TA4-8 16S rRNA gene, partial sequence.
CP58-4-21	1472	2706	1465	100	<i>Streptomyces parvulus</i> strain HY 026 16S rRNA gene, partial sequence.
NS 3-2	1487	2719	1472	100	<i>Streptomyces qinglanensis</i> strain 172205 16S rRNA gene, partial sequence.
NS3-10	1487	2689	1456	100	<i>Streptomyces qinglanensis</i> strain 172205 16S rRNA gene, partial sequence.
NS1-4	1518	2702	1463	100	<i>Streptomyce</i> sp. 13(2013) 16S rRNA gene, partial sequence.
NS7-3	1487	2695	1459	99	<i>Streptomyces qinglanensis</i> strain 172205 16S rRNA gene, partial sequence.
SK08-5	1508	2680	1451	100	<i>Micromonospora</i> sp. NEAU-CF28 16S rRNA gene, partial sequence.
Yeast A1-8	628	1112	602	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain KDLYC24-1 internal transcribed spacer 1, ,partial sequence; 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer 2, ,partial sequence
Yeast BS 6-2	577	1035	560	99%	<i>Pichia jadinii</i> CBS1600 <sup>T</sup> partial sequence

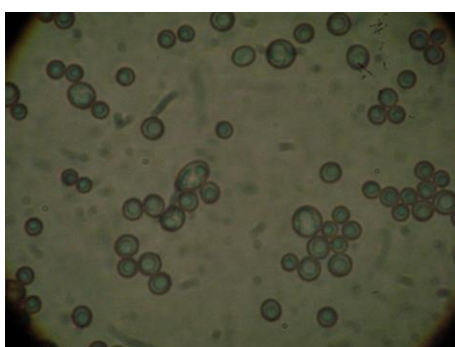
หมายเหตุ SK08-5 เป็นเชื้อที่ได้ใหม่จากเกาะซาก ในโครงการ 3, NS 4-1 ไม่มีข้อมูล เนื่องจาก primer หลุดอ่านข้อมูลไปก่อน

## 2. ยีสต์

### ศึกษาการเจริญของเซลล์ยีสต์

คัดเลือกยีสต์ สายพันธุ์ BS6-1 และ BS6-2 ซึ่งแยกได้จากชายฝั่งทะเล (บางแสน) เป็นต้นแบบในการเริ่มศึกษาการเลี้ยงเซลล์โดยนำมาเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน โดยเลี้ยงทั้งในอาหาร Synthetic (Yeast Malt Extract Medium, YM) และอาหารธรรมชาติ ซึ่งในระยะเริ่มต้นนี้คือกากขาน้อย ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้ง

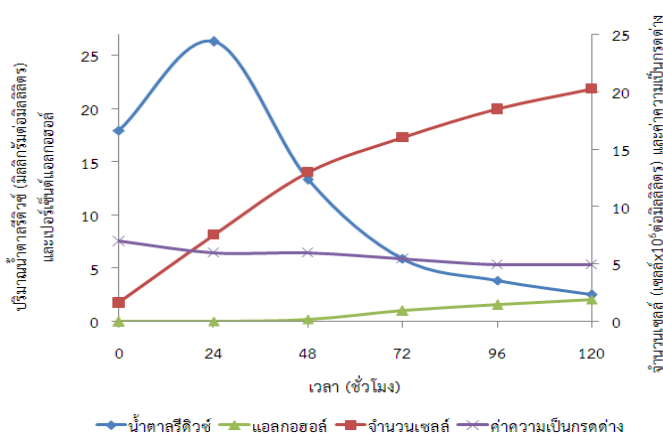
#### 2.1. การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM



ภาพที่ 13 ภาพยีสต์ BS6-2 ภายใต้กล้อง

Inverted Microscope เซลล์มีลักษณะกลม/ รูปไข่  
ขนาดใหญ่

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM โดยติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์นับจำนวนเซลล์ พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่าง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 14



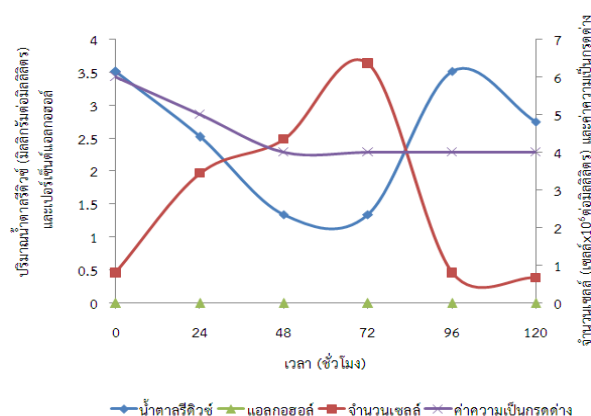
ภาพที่ 14 การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM

จากการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 24 เป็นต้นไปเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยลดลงสูงที่สุดชั่วโมงที่ 120 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $2.536 \pm 0.02$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงระยะเวลาที่น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงนั้นเป็นระยะเวลามีจำนวนเซลล์เริ่มเพิ่มขึ้น โดยจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น ซึ่งเพิ่มขึ้นสูงสุดชั่วโมงที่ 120 โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ  $2.025 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

สำหรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และยิ่งลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรดต่างลดลงต่ำสุดชั่วโมงที่ 96-120 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างที่ 5 ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์นั้น พบว่ามีปริมาณสูงสุดชั่วโมงที่ 120 โดยมีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับร้อยละ  $2.13 \pm 0.01$

## 2.2. การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 โดยติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์ นับจำนวนเซลล์ พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่าง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30

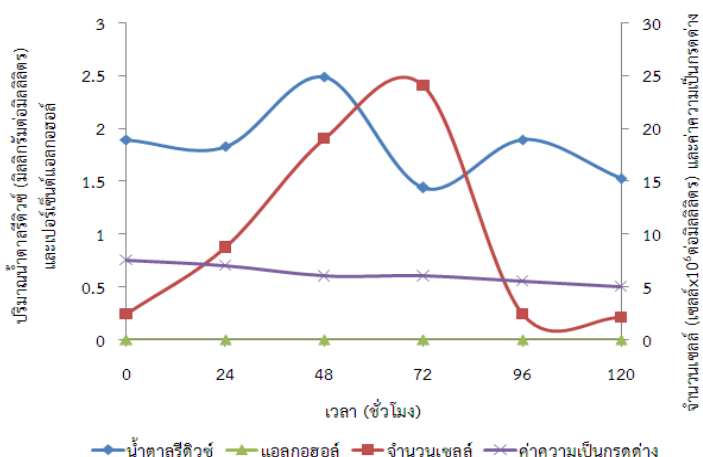
จากการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงสูงสุดชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $1.343 \pm 0.01$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนจะเริ่มเพิ่มขึ้นในระยะเวลาต่อมา โดยระยะเวลาที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่ำสุดนั้นเป็นระยะเวลาเดียวกันกับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นสูงสุด ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง  $6.35 \times 10^6$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนเซลล์เริ่มลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น

สำหรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และยิ่งลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรดต่างลดลงต่ำสุดชั่วโมงที่ 48-120 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างที่ 4 ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์ของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 นั้นไม่พบปริมาณแอลกอฮอล์ตั้งแต่ชั่วโมงแรกถึงชั่วโมงที่ 120

## 2.3. การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการรอกก่อนนำเข้าเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการรอกเอากากขานอ้อยออกก่อนนำเข้าเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ โดยติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์ นับจำนวนเซลล์ พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่าง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 16





ภาพที่ 16 การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการกรองก่อนนำเข้าเครื่องหมักหนึ่งความดันอัตโนมัติ

จากการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นสูงสุดชั่วโมงที่ 48 โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $2.486 \pm 0.09$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนที่จะเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่ำสุดถึง  $1.434 \pm 0.03$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลาเดียวกันที่จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุด โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ  $2.4 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ค่อยๆ ลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น

สำหรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และยิ่งลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรดต่างลดลงต่ำสุดชั่วโมงที่ 120 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างที่ 5 ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์ของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการกรองก่อนนำเข้าเครื่องหมักหนึ่งความดันอัตโนมัติ นั้นไม่พบปริมาณแอลกอฮอล์ตั้งแต่ชั่วโมงแรกถึงชั่วโมงที่ 120

จากความแตกต่างขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลให้การเจริญของเซลล์แตกต่างกัน โดยเชื้อ BS 6-2 มีจำนวนเซลล์สูงที่สุดชั่วโมงที่ 72 ซึ่งเป็นระยะเวลาเดียวกับที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่ำ และเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้นค่าความเป็นกรดต่างเริ่มลดลง จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อครบ 120 ชั่วโมงพบว่าจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการกรองกากขานอ้อยออกก่อนนำเข้าเครื่องหมักหนึ่งความดันอัตโนมัติให้จำนวนเซลล์สูงสุด โดยเชื้อ BS 6-2 มีจำนวนเซลล์  $2.06 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยทั้ง 2 สูตรและอาหารเลี้ยงเชื้อ YM มีจำนวนเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

### การเลี้ยงเซลล์ยีสต์ปริมาณมาก

เนื่องจากการทดลองเลี้ยงยีสต์ในวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร เช่น กากขานอ้อย ไม่ได้ให้ปริมาณเซลล์มากนัก เนื่องจากกากขานอ้อยมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่น้อย รวมทั้งยีสต์ไม่มีเอ็นไซม์ที่จะย่อยเซลลูโลสในกากขานอ้อยได้ จึงได้คัดเลือกยีสต์ที่คัดเลือกได้จากบริเวณชายฝั่งทะเล 2 ชนิด คือ BS 6-2 (*Pichia jadinii*) และ AS1-8 (*Rhodotorula*) มาทดลองเลี้ยงใหม่ในอาหารสำเร็จ Czapek Dox broth และ อาหารธรรมชาติ PDB (Potato dextrose broth) น้ำข้าวโพด (Corn meal) และอาหารที่เตรียมจากสารสกัดจากถั่วดำ (Black lentil) บ่มที่อุณหภูมิ  $30^\circ\text{C}$  เช้าที่ความเร็วรอบ 105

rpm เป็นเวลา 3 วัน โดยใช้ จำนวนเซลล์ตั้งต้นความเข้มข้น  $3.0 \times 10^7$  /ml ปริมาณ 100 ml ผลที่ได้คือ อาหาร Corn meal เป็นอาหารที่ยีสต์ ทั้ง 2 ชนิดเจริญได้ดี และรวดเร็ว ภายในเวลา 3 วันได้น้ำหนักเฉลี่ยมากกว่าอาหารที่เตรียมจากถั่วดำ ถึง ประมาณ 6-7 เท่า แต่อาหาร PDB ก็เป็นอาหารที่ยีสต์ชอบเช่นกัน ยีสต์ BS 6-2 สามารถเจริญได้ดี แต่ยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* ไม่ค่อยเจริญในอาหาร Czapek Dox และการเลี้ยงด้วย Corn Meal และ PDB ให้กรดไขมันที่เป็นประโยชน์โดยเฉลี่ย แล้วมากกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดอื่น (ข้อมูล ตามโครงการ 4)

ตารางที่ 18 ผลการเลี้ยงเชื้อยีสต์ As1-8 1 และ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

Yeast Isolate	PDB	Czapek Dox	Corn Meal (เฉลี่ย)	Black lentil(เฉลี่ย)
AS 1-8	NA	No growth	27.5988 g/ L	4.5064 g/ L
BS 6-2	30.8424 g/L	23.5196 g/L	20.5164 g/ L	2.7880 g/ L

NA= ไม่มีผลการทดสอบ

การเลี้ยงปริมาณมากในการศึกษาวิจัยนี้ จะมุ่งเน้นการเลี้ยงเพื่อเก็บเซลล์แห้ง ไว้ใช้เป็นส่วนประกอบของการสร้างสูตรอาหารใหม่ ๆ สำหรับเลี้ยงสัตว์น้ำทะเลวัยอ่อน เช่น ลูกกุ้ง ลูกปลา การเลี้ยงด้วยโมลาสก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ซึ่งได้ปริมาณเซลล์มาก (ไม่ได้รายงาน) แต่เซลล์ที่ได้จะมีสีน้ำตาลเข้ม

### การประดิษฐ์ถังหมักอย่างง่าย สำหรับเลี้ยงมารินยีสต์

ถังหมักที่มีขนาดใหญ่ ที่สะดวกทดลองเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ สามารถประดิษฐ์ได้จากขวดน้ำกลั่นที่เป็นวัสดุทนร้อน (PET) ขนาด 20 ลิตร ก่อนใช้งานฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ให้ทั่วถึงหมัก รวมทั้งฝาขวด แล้วตามด้วยน้ำเดือด แช่ไว้ประมาณ 20 นาที (อาจใช้น้ำเดือด 1/4 ของปริมาตรขวดแล้วค่อย ๆ ล้างซ้ำขวา ให้ทั่วขวด) และอุดปากขวดด้วยจุกสำลี ที่ขนาดปิดปากขวดได้พอดี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้ปิดจุกขวด การให้อากาศสามารถทำได้ 2 ลักษณะ หากไม่มีสายให้อากาศแบบที่ใช้ในอ่างเลี้ยงปลา (นึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้) ก็สามารถใช้ magnetic bar ขนาด 3- 4 นิ้ว สำหรับกวนให้อากาศขณะเลี้ยง ถ้าเลือกใช้สายให้อากาศทางสายออกซิเจน ต้องเจาะฝาขวด 2 รู ให้พอดีกับแท่งแก้วระบายอากาศ และ แท่งแก้วที่จะต่อเข้ากับสายยางให้อากาศ ถ้าใช้ magnetic bar ในการให้อากาศ จะใช้จุกสำลีที่ปิดอุดเพื่อปิดจุกขวดแทน



Starter 1% สามารถเลี้ยงในขวดขนาด 2 ลิตร

เลี้ยงยีสต์เพื่อเป็นหัวเชื้อ (starter)

2-3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง



ขวดน้ำกลั่น 20 ลิตร เลี้ยงได้ครั้งละ 13-15 ลิตร

ภาพที่ 17 แสดงการเลี้ยงยีสต์ปริมาณมากขึ้น ในขวดภาชนะบรรจุขนาด 20 ลิตร

เมื่อพบว่าอาหารธรรมชาติให้ผลผลิตของเซลล์ และให้คุณค่าอาหาร เช่นกรดไขมัน โปรตีน ที่ดีกว่าอาหารสังเคราะห์ หรืออาหารสำเร็จรูป ซึ่งมีราคาแพง อาหารจากส่วนประกอบธรรมชาติ เช่นมันฝรั่ง หรือ ข้าวโพด ก็เป็นวัสดุที่ราคาไม่แพงมาก เราสามารถเตรียม PDB (Potato Dextrose) ได้โดยใช้มันฝรั่ง หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก 200 กรัม (ต้มจนเดือดประมาณ 30 นาที กรองกากมันฝรั่งออก ใช้แต่น้ำมันฝรั่ง) น้ำตาล Dextrose (อาจใช้น้ำตาลกลูโคส แทน) 10 กรัม เติมน้ำกลั่น ที่มีน้ำทะเล 25 % ให้ครบ 1 ลิตร ปรับ pH ที่ 5.5- 6.0 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 30-32 °C หากต้องการเตรียม 10 ลิตร หรือ 12 ลิตร สามารถเพิ่มองค์ประกอบตามส่วน แล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วจึงนำมาเติมลงในขวดบรรจุ 20 ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ถึงหมักทั้ง 2 แบบสามารถเติมอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วได้เรื่อย ๆ หลังการเลี้ยง 3 วัน หรือจนได้ปริมาณยีสต์หนาแน่นมากขึ้น โดยหยุดให้อากาศ ตั้งทิ้งไว้ 1- 2 ชั่วโมงให้เซลล์ค่อย ๆ ตกตะกอนลงมา แล้วไขก็อก ปล่อยให้เซลล์ที่แก่เต็มที่ออก แล้วเติมอาหารใหม่ด้านบน โดยไม่ต้องฆ่าเชื้อ ถึงหมักใหม่ เช็ด ฆ่าเชื้อก็อกที่ไขเซลล์ออกด้วย อัลกอฮอล์ 70% เซลล์ที่ได้แต่ละรอบของการเลี้ยง หรือที่ไขออกแต่ละครั้งสามารถ เก็บเซลล์แห้งโดยการปั่นเหวี่ยง เอาอาหารออกไป แล้วนำไป freeze dry ถ้ายีสต์ตกตะกอนได้หมด ก็สามารถลดขั้นตอนปั่นเหวี่ยงได้เช่นกัน เซลล์ยีสต์ที่ freeze dry แล้วสามารถเก็บได้นาน หรือแม้แต่เมื่อนำไปทำเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ อาหารนั้นก็มีการเก็บได้นานโดยไม่มีกลิ่นของยีสต์

#### หมายเหตุ

กรณีที่ไม่มีเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) เนื่องจากถังหมักมีขนาดใหญ่ไป และถังหมักอาจไม่สามารถทนร้อน ได้ถึง 121 °C ได้นานถึง 15-20 นาทีหรือมากกว่านั้นได้ เนื่องจากอุณหภูมิของเครื่องจะค่อย ๆ ลดลง ไม่ได้ลดลงทันทีทันใด สามารถฆ่าเชื้ออาหารพร้อมภาชนะบรรจุด้วยการลดอุณหภูมิและความดันลงเหลือ 110 °C 10 นาที แล้วจึงนำมาใช้เลี้ยง

## บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผล

จากการเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อเพิ่มเติมจากป่าชายเลนและจากฟองน้ำได้แอสคิตินอไมซีที่ไม้มากนัก ใน จังหวัดนครศรีธรรมราช ( 52 ไอโซเลต ได้จากฟองน้ำ 2 ไอโซเลต) จากป่าชายเลนจังหวัดระยอง (24 ไอโซเลต) และใน จังหวัดชุมพร (16 ไอโซเลต) และจากฟองน้ำบริเวณเกาะหลัก ในจังหวัดชุมพร ( 19 ไอโซเลต)รวมทั้งหมด 111 ไอโซเลต ป่าชายเลนในจังหวัดนครศรีธรรมราชเป็นป่าชายเลนที่อยู่ห่างจากฝั่งทะเลประมาณ 1 กิโลเมตร และยังได้รับอิทธิพลจาก กระแสน้ำขึ้นและกระแสน้ำลงในแต่ละวัน พื้นดินจะมีระยะเวลาที่น้ำทะเลท่วมซัง และเวลาที่แห้งสลับกันไป พบแอสคิตินอไมซีที่ค่อนข้างหลากหลายชนิดมากกว่า และพบว่ามีการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ 27 ไอโซเลต ที่สามารถสร้าง สารออกฤทธิ์ได้ ไม่ทั้งต่อจุลินทรีย์แกรมบวก และ *C. albicans* ก็ยับยั้งอย่างใดอย่างหนึ่ง คิดเป็น 51.92 % นับว่าเป็น เปอร์เซนต์ที่สูงพอควร ไอโซเลตที่สร้างสาร รงควัตถุถูกเลือกไว้เลี้ยงปริมาณมาก ประมาณ 20 ไอโซเลต และจากฟองน้ำ บริเวณเกาะวังนอก 2 ไอโซเลต คือ WN-POR-2-1 และ WN-POR 6-1 เพื่อการทดสอบฤทธิ์แอนติออกซิแดนซ์

ส่วนแอสคิตินอไมซีที่แยกได้จากป่าชายเลนของจังหวัดระยอง ซึ่งเป็นบริเวณปากแม่น้ำพังราด และจากป่าชายเลนจังหวัดชุมพรก็เช่นกัน มีอาณาบริเวณติดชายฝั่งทะเล มีน้ำทะเลท่วมถึงตามเวลาน้ำขึ้นในแต่ละวัน และมีพื้นดิน ตะกอนค่อนข้างเป็นดินทราย มีพืชป่าชายเลนขึ้นอยู่ห่าง ๆ กัน ประกอบกับวิธีการแยกเชื้อ ใช้วิธีที่ต้องทำ pretreatment ตัวอย่างก่อนเพื่อให้ได้แอสคิตินอไมซีที่หายาก โดยนำตัวอย่างดินตะกอนไปอบที่ 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อน ทำให้ออสคิตินอไมซีที่มักพบบ่อย ๆ ทั่ว ๆ ไป เช่น *Streptomyces* บางส่วนตายไปบ้าง แอสคิตินอไมซีจากทั้งสองบริเวณแต่ก็ยังมีพบ 2 ไอโซเลตจากป่าชายเลนในจังหวัดชุมพร คือ CP 8-4 A และ CP 8-4 B แอสคิตินอไมซีที่พบจากตะกอนดินป่าชายเลน จังหวัดระยอง และจากฟองน้ำบริเวณเกาะหลัก จังหวัดชุมพร เป็นแอสคิตินอไมซีใน Family *Micromonosporaceae* ทั้งหมด และไม่ค่อยพบว่าให้ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ด้วยวิธีทดสอบเบื้องต้น (Cross atreak) จากการเปลี่ยนชนิดของอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อ และวิธีการทำ pretreatment ทางเคมี คือใช้ 1.5% phenol ทำให้ได้แอสคิตินอไมซีที่หายากมากขึ้น แต่ก็พบว่า แม้จะได้แอสคิตินอไมซีใน Family *Micromonosporaceae* ทั้งหมดแต่ก็มีความหลากหลายในระดับจีโนม นั้น อาจเนื่องมาจาก แอสคิตินอไมซีใน Family นี้ เป็น Family ที่พบได้บ่อยในสิ่งแวดล้อมทางทะเล (Maldonado, et al., 2005a and Maldonado, et al., 2005b) แม้ว่าจากการตรวจสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ แม้จะพบว่าแอสคิตินอไมซีที่แยกได้ไม่ค่อยให้ฤทธิ์ยับยั้งเท่าใดนักด้วยวิธีการตรวจสอบ Cross streak technique แต่จากการตรวจสอบ เมื่อนำเชื้อไปเลี้ยงในอาหารเหลว ในพลาสติกรูปชมพู่ เขยาที่ 110 รอบต่อนาที ที่ 30 °C เป็นเวลา 7-10 วัน แล้วนำส่วนของเซลล์ และน้ำเลี้ยงเชื้อไปสกัดด้วย เอธิล อะซีเตทก็พบว่าบางไอโซเลต มีการสร้างสารด้วยเช่นกัน

โดยปกติแล้วการสร้างสารทุติยภูมิ หรือสารออกฤทธิ์ชีวภาพของแอสคิตินอไมซีนั้น อาหารเลี้ยงเชื้อและปัจจัย สภาวะแวดล้อมของการเลี้ยงมีอิทธิพลอย่างมากต่อการจะสร้างสารได้มาก หรือได้น้อย (Karuppiyah, et al., 2013; Jung, HM., et al., 2007) และเชื้อแอสคิตินอไมซีแต่ละชนิด แต่ละจีโนม แต่ละสายพันธุ์ ก็มีความต้องการอาหารและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการสร้างสารที่แตกต่างกัน (Kiranmayi et al., 2011; Kavitha and Vijayalakshmi, 2009) ไม่ว่าจะเป็นแหล่งของ คาร์บอน หรือแหล่งของไนโตรเจน ค่าของ pH อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง ระยะเวลาที่ใช้เลี้ยง ชนิดของอาหาร รวมทั้งชนิดของเกลือแร่ที่เป็นสาร inorganic ที่เติมลงในอาหาร ไม่ว่าจะ เป็น สารที่ต้องการมาก หรือต้องการเป็น

เพียง trace elements แต่จากการวิจัยนี้ ได้ใช้อุณหภูมิ และ pH ที่แอสคิตินอิมยซีทส่วนใหญ่เจริญ และสร้างสารทุติยภูมิได้ดี คือที่อุณหภูมิ 30 °C และค่าความเป็นกรด-เบส ที่ใกล้เคียง pH 7 (pH 7.5-8.0 ก็สามารถสร้างสารได้ดี)

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการนำ แอสคิตินอิมยซีทมาเหนี่ยวนำด้วยแสง UV เพื่อให้มีการกลายพันธุ์ และมีการสร้างสารออกฤทธิ์ได้มากขึ้น พบว่าไอโซเลต CP-PH-3-12 ให้ผลการสร้างสารที่มากขึ้นเห็นได้ชัดเจนกว่าไอโซเลตอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสารสกัดที่สกัดจากเซลล์ เพิ่มขึ้นจากปกติ ถึง 6 เท่า ในขณะที่สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ เพิ่มขึ้น ประมาณ 2 เท่า (ตารางที่ 13) แม้ว่าผลที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยแสง UV นั้นจะส่งผลให้มีการสร้างสารเพิ่มมากขึ้นเป็นส่วนใหญ่ แต่ก็เป็นการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ไม่ถึงขนาดมีการเพิ่มขึ้นหลาย ๆ เท่าจากเดิมที่เคยสร้างได้ ทั้งนี้เนื่องจากยีนที่ควบคุมการสร้างสารเมตาโบไลต์ ในแอสคิตินอิมยซีทนั้นมีหลายคลัสเตอร์ (Tanaka, 2013) และถ้าการเกิดการกลายพันธุ์นั้นเกิดที่จุดเล็ก ๆ (micro-mutation) ก็จะไม่ค่อยชัดเจนได้ (คือเปลี่ยนแปลงน้อย) อาจ ต้องมีการเหนี่ยวนำ หรือทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหลาย ๆ คลัสเตอร์ หรืออาจเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการอื่น เช่นเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี เป็นต้น และควรต้องมีการศึกษาและทดสอบต่อไป เพื่อให้เห็นผลที่ชัดเจนมากขึ้น อย่างไรก็ตาม เชื้อที่ได้นำมาทดสอบการเหนี่ยวนำนั้น มีทั้ง *Micromonosporae* และ *Streptomyces* ซึ่งทั้งสองกลุ่มอาจมีการสร้างสารคนละประเภทกัน วิธีการสกัด หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ก็มีผลอย่างมากที่จะทำให้สารออกฤทธิ์ละลายออกมาได้ดี หรือ ไม่ดี ซึ่งหลาย ๆ ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ได้นี้ ต้องมีการศึกษาเป็นราย ๆ ไป โดยเฉพาะสำหรับแอสคิตินอิมยซีทแต่ละชนิดในการศึกษาขั้นต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- Anzai, K., Nakashima, T., Kuwahara, N., Suzuki, R., Ohfuku, Y., Takeshita, S. and Ando, K. 2008. Actinomycete bacteria isolated from the sediments at coastal and offshore Area of Nagasaki Prefecture, Japan: Diversity and Biological Activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 106:215-217.
- Bérdy, J. 2005. Bérdy, Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, 58 (2005), pp. 1–26. Chi, Z., Liu, Z., Gao, L., Gong, F., Ma, C., Wang, X., and Li, H. 2006. Marine yeasts and their applications in Mariculture. *J. Ocean University of China*. 5: 251-256
- Borgos, S.E.F. 2006. Analysis and engineering of nystatin biosynthesis in *Streptomyces noursei* via manipulation of the polyketide synthase genes. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology, Faculty of Natural Sciences and Technology, Department of Biotechnology. Trondheim.
- Bredholt, H., Galatenko, O. A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L. P. and Zotchev, S. B. (2007). Rare actinomycetes bacteria from the shallowwater sediments from of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity. *Environmental Microbiology*. 9:2756-2764.
- Bull, A. T., Stach, J. E.M., Ward, A. C. and Goodfellow, M 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 87:65-79.
- Cragg, G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J.Nat. Prod.*, 70, 461–477.
- Das, S., Lyla, P. S. and Khan, S. A. 2008. Distribution and generic composition of culturable marine Actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese J. of Oceanology and Limnology*. 26: 166-177
- Ekwealor, I. A., and Obeta, J. A. N. 2006. Screening of UV-irradiated and S-2-aminoethyl-L-Cystein resistant mutants of *Bacillus megaterium* for improved lysine accumulation. *African J. of Biotechnology*. 5: 2312-2314
- Fiedler, H.-P., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C. and Mihm, G. (2005) Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek* 87:37–42
- Gandhimathi, R., Arunkumar, M., Selvin, J., Thangavelu, T., Sivaramakrishnan, Kiran, G.S., Shanmughapriva, S., and Natarajaseenivasan, K. 2008 Antimicrobial potential of sponge

- associated marine actinomycetes *J. Medical Mycology* 8:16-22
- Ghanem, N. B., Sabry, S. A. El-Sherif, Z. M. and El-Ela, G. A. Abu. 2000. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *Journal of General and Applied Microbiology* 46:105-111.
- Han, S.K., Nedashkovzkaya, O.I., Mikhailov, V.V., Kim, S.B. and Bae, K.S. 2003. *Salinibacterium amurkyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Microbacteriaceae* from the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 2061–2066.
- Hong, K., Gao, A-H., Xie, Q-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H-P., Yu, H-P., Yao, S-H., Goodfellow, M., and Ruan, J-S. 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove Soils and plants in China. *Marine Drugs*. 7:24-44
- Hosoya, Y., Okamoto, S., Muramatsu, H. and Ochi, K. 1998. Acquisition of Certain Streptomycin-Resistant (STR) Mutations Enhances Antibiotic Production in Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 2041-2047.
- Jensen, P.R. and Lauro, F.M. 2008. An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment. *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 51-62.
- Jensen, P.R., R. Dwight and W. Fenical, 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marinesediments. *Applied Environmental Microbiology*. 57: 1102-1108.
- Jensen, P. R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T. J. and Fenical, W. 2005a. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ Microbiol.* 7:1039-1048.
- Jensen, P.R., Mincer, T. J., Williams, P. G. and Fenical, W. 2005b. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek* . 87:43-48.
- Jimenez, J. T., Šturdíková, M. and Šturdíka, E.. 2009. Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta Chimica Slovaca.* 2: 63 – 74
- Jung, H.M., Kim, S.Y., Moon, H.J., Oh, D.K., and Lee, J.K. 2007. Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77: 789-795.
- Kai, G. and Weber, A. S. 1991. Streptomycin-resistant mutant production in a continuous-flow UV mutation device. 1991. *J. Industrial Microbiol.* 8: 107-112

- Kwon, H.C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. and Fenical, W. 2006. Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "*Marinospora*". *Journal of American Chemical Society* 128: 1622–1632
- Karuppiyah, V., Aarthi, C., Sivakumar, K., and Kannan, L. 2013. Statistical optimization and anticancer activity of a red pigment isolated from *Streptomyces* sp. PM4. *Asian Pac. J. Biomed.*3: 650-656.
- Kavitha, A. and Vijayalakshmi, M. 2009. Cultural parameters affecting the production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MK-VL\_113. *Journal of Applied Sciences Research*, 5: 2138-2147, 2009
- Kiranmayi, M. U., Sudhakar, P., Sreenivasulu, K., and Vijayalakshmi, M. 2011. Optimization of Culturing Conditions for Improved Production of Bioactive Metabolites by PSEUDONOCARDIA sp. VUK-10. *Microbiology*. 39: 174-181
- Kelman, D., Hill, R. T., Rosenberg, E., Kashman, Y., Ilan, H., and Loya, Y. 2005. Association of Microorganisms with Bioactive Marine Sponges is Facilitated by Resistance to Antibiotics. *In: Proceeding of the International Marine Biotechnology Conference*. 7-12 June, 2005. St. John's, Newfoundland, Canada.
- Kumar, K. S., Haritha, R., Jagan Mohan, Y.S.Y.V. and Ramana, T. 2011. Screening of Marine Actinobacteria for Antimicrobial Compounds. *Research Journal of Microbiology*, 6: 385-393.
- Magarvey, N. A., Keller, J. M., Bernan, V., Dworkin, M. and Sherman, D. H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol.* 70:7520-7529.
- Maldonado, L.A., Fenical, W., Jensen, P.R., Kauffman, C. A., Mincer, T. J., Ward, A. C., Bull, A. T., and Goodfellow, M. 2005a. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. Nov., Obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*
- Maldonado, L.A., Stach, J.E.M., Pathom-aree, W., Ward, A.C., Bull, A.T. and Goodfellow, M. 2005b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87: 11-18
- Nussbaum, F.V., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S. and Habich, D. 2006. „Antibacterial natural products in medicinal chemistry – exodus or revival? *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 5072–5129. Newman, D.J.;



- Newman, D.J.; Cragg, G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J.Nat. Prod.*, 70, 461–477.
- Pathom-aree, W., Nogi, Y., Sutcliffe, I.C., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. and Goodfellow, M. (2006). *Williamsia marianensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Mariana Trench. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1123–1126
- Shapiro, J. A. 1998. Thinking about bacterial population as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 81-104
- Solanki, R., M. Khanna and R. Lal, 2008. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian Journal of Microbiology.* 48: 410-431.
- Solano, G., Rojas-Jiménes, K., Jaspars, M and Tamayo-Castillo, G. 2009. Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica *Antonie van Leeuwenhoek.* 96: 71-78.
- Stach, J. E. M., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Bull, A. T., and Goodfellow, M. 2004. *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, 54:191-194
- Tanaka, Y., Murakami, K., Hirose, Y., Kasahara, K., Kugimiya, R. and Ochi, K.2013. Activation and Products of the Cryptic Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters by Rifampin Resistance (RPOB) Mutations in Actinomycetes *J. Bacteriol.* 195: 2959-2970
- Veerapagu, M., Jeya, K.R., and Ponmurugan, K.2008. Mutational effect of *Penicillium chrysogenum* on antibiotic Production. *Advance Biotechnol.* July:16-19
- Weyland, H. 1986. Actinomycetes of the Bottom sediments of various sea . *Actes de Colloques.* 3: 73-79
- Zotchev S. B. 2012. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipeline. *Journal of Biotechnology.* 158: 168-175

## 1. ลำดับเบส ของ 16S rRNA gene

### >A1-3 *Streptomyces indiaensis*

TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTTAACACATGCAAGTGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGG  
GTGAGTAACACGCTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCACT  
GGGGGCATCCTTGGTGGTGCAGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAGTGGC  
TCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG  
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG  
TTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG  
CCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACGTCGGTT  
GTGAAAGCCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTG  
GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGG  
AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAAC  
ATTCCACGTTGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTGCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGG  
AATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGCAAGAACCTTACCAAGGCTTGACA  
TACACCGGAAACGTCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCCGTTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTCC  
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTCTGGGGACT  
ACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAGTCAATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAC  
ACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAT  
TGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCCGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCG  
GGCCTTGTACACACCGCCCGTACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGA

### >A3-3 *Streptomyces indiaensis*

ACGAACGCTGGCGGCGTGCCTTAACACATGCAAGTGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAG  
TAACACGCTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCACTGGGG  
CATCCTCGGTGGTGCAGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAGTGGCTCACC  
AAGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA  
AACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTCCGCTCGGTTGTGAA  
AGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT  
GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGA  
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCC  
ACGTTGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTGCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTG  
ACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCAGCAACCGCAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACAC  
CGGAAACGTCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCCGTTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGA  
TGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTCTGGGGACTCACGGG  
AGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAGTCAATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTG  
CTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGG  
TCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCCGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCT  
TGTACACACCGCCCGTACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGT  
CGAAGGTGGGACTGGCGTTGGAC

### >54-5 = *Streptomyces indiaensis*

GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTTAACACATGCAAGTGAACGATGAAAGCCCTTC  
GGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGCTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGA  
CAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCATCTTGGGCATCCTTGATGGTG  
GAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGC  
TCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA  
CACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCT  
GATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGG  
AAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG  
CGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCG  
GCTTGTCTGCGTTCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGC  
AGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATAT  
CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAA  
AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACT

AGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTG  
 GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGG  
 AGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGA  
 AACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCA  
 GCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTG  
 CCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA  
 GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAAT  
 GGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAG  
 TTCGGAATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC  
 AGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAA  
 GTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGG  
 ACTGGCGATTGGGACAAT

>A16-1= *Streptomyces indiaensis*

CGTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGTCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCG  
 GGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGAC  
 AAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCATCTTGGGCATCCTTGATGGTGG  
 AAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCT  
 CACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC  
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTG  
 ATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCCGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGA  
 AGAAGCGAAAGTACCGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC  
 GGTAATACGTAGGGCGGAGCGTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGG  
 CTTGTGCGCTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCA  
 GGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATC  
 AGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAA  
 GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTA  
 GGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGG  
 GG-AGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGG  
 AGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGA  
 AACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCA  
 GCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTG  
 CCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA  
 GGTGGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAA  
 TGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCA  
 GTTCGGAATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGA  
 TCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGA  
 AAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAAAGGAGCTGTCGAAA  
 GTGGGACTGGCGATTGGACA

>141216-34\_M07\_PL\_4-1\_Actinomycetes\_518F.ab1 1001

GGGGGTACGTTGTTCCGGATTATTGGGCGTAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGGTCCGT  
 TGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTA  
 GGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTG

GCGAAGGCGGATCTCTGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGG  
 GCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCGGGGAGTACG  
 GCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGC  
 TTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACGCCGAAAGCATCAGAG  
 ATGGTGCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTG  
 AGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCCCGAGGCCCTT  
 GTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAAGTGGGGACGACGT  
 CCAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGCGCACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAG  
 CTGCCATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGC  
 ACTCGACCCCATGAAGTCCGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCGTTGCTGTCCGTGAATA  
 CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGTCACGGTACGGAAAGTCGGTAACACCCGGAA  
 GCCGGTGGTCCTAACCTTGTGGAAGGAGCTGTGGAAGATGGACTGGCGAAGACACACTTA  
 GGAAGGGAGGGGCCATCAAATAACACAAAAAAAAG

>141216-34\_007\_PL\_4-1\_Actinomycetes\_800R.ab1 786

TTCGGTCTTTTCGCTCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTC  
 CTCCTGATATCTGCGCATTTACCCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCCTACCGAACTCT  
 AGCCTGCCCCGTATCGACTGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGCGAC  
 AAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTA  
 CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTGCCTTC  
 TTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGACGTCCCTCACGGCGCTCGCTGCAT  
 CAGGCTTCCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTG  
 TCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTGCTCGCCTTGGTGAG  
 CCACTACCTACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCACCGCCGGAGCTTTACA  
 CCGTCAAGGATGCCAAGACGGTCATATCCGGTATTAGACCCGTTTCCAGGGCTTGTCCC  
 AGAGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTAATCCCCGGCCGAAA  
 CCGGTTTCATCGTTGCACTTGCATGTGTTAAGCACGCCCGCGGCTTCGCTGACAGTAAAA  
 AAAACTCAAAAACAACCTTGGTCCCGGGCCAAGTCCTTCCCCCTAAAAAACCCCC

ลำดับเบสของ 16SrRNA gene ของ แอคติโนมัยซีท CP-8-4 A

>141216-34\_C09\_CP\_8-4-A\_Actinomycetes\_800R.ab1 751

GGGCTTCTTTTCGCTCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGT  
 TCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCCTACCACAC  
 TCTAGCCTGCCCGTATCGACTGCAGACCCGGAGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAATCGACG  
 CGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACG  
 TATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTT  
 CGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGGCGGTC  
 GCTGCATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT

GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTTCGC  
 CTTGGTGTAGCCGTTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCACCCGCG  
 GAGCTTTCCAACCTCCCAGATGCCCGGGAGGCTCGTATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCA  
 GGGCTTGTCCCAGAGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCCACTAAT  
 CCACCCGAAGGGCTTCATCGTTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTCGTC  
 CTGAGCGGGGAAAAACCTTAAAAAAAATCCC

>141216-34\_A09\_CP\_8-4-A\_Actinomyces\_518F.ab1 995

GGGGGTACGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCGGCTTGTTCGCGTCG  
 ATTGTGAAAGCCCGGGCTTAACTCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTG  
 GTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACC  
 GGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG  
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTTGGCGAC  
 ATTCCACGTCGTCGGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCG  
 CAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTA  
 ATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCCGAAACATCCAGAGAT  
 GGGTGGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTA  
 GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTTCAGCAGGCCCTT  
 GTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  
 TCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATG  
 AGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGT  
 CTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGT  
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCG  
 AAGCCGGTGGCCCAACCCCTCGGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGTTGGACAT  
 TAGCGGGGGGCCCGCGCGAGAGAGAAGAAAAAG

ลำดับเบสของ 16S rRNA gene CP58-4-21

>151116-55\_G05\_CP58-4-21\_907R.ab1 886

ACCAGTGGCTCTCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAAT  
 GTTGCCACACCTAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTT  
 CGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCGCCACC  
 GGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCGATCTCCCCTAC  
 CGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGACTGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAAC  
 CGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTTCGCC  
 CTACGTATTACCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTC  
 ACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCG  
 GCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGG  
 AGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTC  
 GTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCAC  
 CGCCGGAGCTTTCGACCTTACAGATGCCCGTGAAGGTCAGTATCCGGTATTAGACCCG  
 TTTCCAGGGCTTGTCCCAGAGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGC  
 ACTAATCCCCACCGAAGTGGTTCATCGTTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCG  
 TTCGTCCTGAGCGGTAAAAAATCTAAAAAGGTGGGGGTTTCGGC

>151116-55\_E05\_CP58-4-21\_785F.ab1 737

GGCCGACTGTGGGATAGGGTGTGGGCACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCAT

TAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGC  
 CCGCACAAGCGGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGC  
 TTGACATACACCGGAAACGTCCAGAGATGGGGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGT  
 GCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAAC  
 CCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGG  
 GTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTG  
 CACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCA  
 AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCT  
 AGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC  
 GTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAG  
 CTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAGGTAAAACCCGTAAAAAAG  
 GGGGGCGGGTTGATTT

ลำดับเบสของ 16S rRNA gene CP58-6-5

>151117-35\_K01\_CP58-6-5\_907R.ab1 910

CTACGTTGCGTCTCCAGCGGTGGACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAA  
 TGTCGCCACACCTAGTTCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCGTG  
 TTCCCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCATTATCGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCC  
 ACCGGTGTTCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCC  
 CTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGAATGCAAACCCGGAGTTAAGCCCCGGGCTTTT  
 ACATCCGACGCGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCAGGACAACGCT  
 TGCGCCCTACATATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGGCGGGCCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACT  
 CACGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGACGTATCCCTCACGGCGTGCCTGCAT  
 CAAGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTC  
 CCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTAGGCCATCACCCACCAAC  
 GAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCAACGTGCGAGCTTTCCACACGTATCCCATGCAGAAAGCCGT  
 CCTAAACGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTTGTCCCAGAGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTACT  
 CACCCGTTCCGCACTAATCCCCGGCCGAAACCGGTTTCATCGTTTCGACTTGCATGGGTAAAGCACCCGC  
 CAGCGTTCGCTCCTGAGCAGTTTTAAAATCTAAAAGGGGGGGGAAATATAAAGGGGAGAAAGAGGGGAAAA  
 AAGG

>151117-35\_I01\_CP58-6-5\_785F.ab1 1190

TGACAAATATGGGACTAGGTGTGGGCGACATTCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCC  
 CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAG  
 CATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACATCGGAAAACCTCAGGAG  
 AAGGGTGGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGAGATGTTG  
 GGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACTCACAGGA  
 GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCT  
 GCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCG  
 GTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGC  
 ATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACC  
 CGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGT  
 ACAGGGGAAACCCGAAAAAAGGTTTAGGTTAAGTAAATGAAATACAGAATCATAAAACAGCGACCAGA  
 AAAGCGCCCCCGCCATGGGGGGGGCCTCCCGAAAATCTACGCACCTCAACGGCCCCCTCGAGGGGAATA

CAAAACCCCCCTTTTAAACCTGATCGCTGGCCGTAGAAATAGAGGAGACCAGGAGGAAGGAACCCACC  
 GAGCGCTGAATTAACAAAAAGAAATAAAAAAGCTCAAATAGGATATTTTGAACCCACCACAAGTACCGG  
 GAAAACTATGGGGGGCCCCCTAGGTAAAAATGGGGGGGGGGGGGGCCCTAGAGCGGAGCTGGGGGGG  
 GTTTTTTCGTGTGAGTAATGGATAAACTAGACGGATCTTCCCCGGTGAGAAAAAGAGGGTATAACAA  
 AAGGTAAGGGAGGCGGTATCCCCGAACGGCCGGCGGAGCTAAGAGTAACTAGGGAAGGGAAAGCCCA  
 TATAATGTGATAATTTT

ลำดับเบสของ 16S rRNA gene NS3-2

>151116-55\_005\_NS3-2\_907R.ab1 896

CAGCCATTGGCTCTCCAGGCGGGGACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACGACGTGGAATGTCGCCCA  
 CACCTAGTTCCCAACGTTTACGGCGTGGACT\ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTC  
 GCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCAT  
 TTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCCGTATCGAATGCAGACCC  
 GGGGTTAAGCCCCGGGCTTTACATCCGACGCGACAGGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTC  
 CGGACAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTCTTCTCTGCAG  
 GTACCGTCACTTGCCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCACGCGG  
 CGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC  
 GTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTGCCTCTCAGGCCGGTACCCGT\CGTCGCCTTGGTAGGCCAT  
 CACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCACCGCCGGAGCTTTCACCACCAGACCAT  
 GCGGCCGGTGATCATATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTTGTCCCAGAGTGCAGGGCAGATTGC  
 CCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTAATCCACCACCGAAGCGGCTTCATCGTTCGACTTGCATGTGT  
 TAAGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGCAGTTTCAAACTCTAAAAGGGGAAAAAAGAAAAA  
 A

>151116-55\_M05\_NS3-2\_785F.ab1 718

CGGGCGCAGGTTTGGGACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGT  
 TCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGCG  
 GAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCGCTG  
 GAGACAGTGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTGAGATG  
 TTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCAACTCTTCGGAGGTTGGGGAC  
 TCACGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGT  
 CTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA  
 AAAAGCCGGTCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGC  
 AGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCG  
 GTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGG  
 ACGAAGTCGTAACAAGGTAAACCGTAAA

ลำดับเบสของ 16S rRNA gene NS3-10

>151116-55\_A07\_NS3-10\_785F.ab1 1332

CGGCCAGTGGGACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCC  
 GCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGCGGAGCA  
 TGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCGCTGGAGAC  
 AGTGCCCCCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGG  
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCAACTCTTCGGAGGTTGGGGACTCACG  
 GGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGG  
 GCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAG  
 CCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC

AGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAAGTCGGTAAC  
 ACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAA  
 GTCGTACAGGGGAACCCCCGAAAAATGGCGGCCACCGGGGATTGGGACCCCTGGGGCGGAACTTG  
 GGGACCAAAAATGGCGGCATTCCGGCGGGGGGGGGCCCCCGTAGTAGTTGGGGGCCCCACCCCCC  
 AGCCACCGGGGATTCCCCTAAACCCCCCAGGTCGGACCACCGGGCGTCTTACAGAGCAACGAAGAAGGG  
 GAACCGGGGGGCACCAACACCCCGGGGGCGATACTACCGTTGAAGCTCGGGGTAAGGGCGCTGAACTG  
 GGGAAATATTCTTACCCACCGGGTAACAGGCAACCGAAAAGGAGGACACCCCCCGGGGAAATTAAG  
 AACCCCCCGCGGGGGGGGGAGGGCGCCGAAACTGGCCGGGCGGGCAGGGGGATGGCGGGGAAAGA  
 CAAACTGCTAGCCGGAGGGTGGTTAGTCCGCCGCCGAAAAAAGGAGGAGGGAATACCCCA  
 AAACCAGGGGGGGGGCCCTCATTTTTTCATCCGTTTCGCCGGTGTCCCGCCCGGACTTAGGGGTGGGT  
 GGGGGGACGCCCCCGTGCAGTAAAAGAACACCCCGCAAAGAGGGCCCCCGGAAGGGCGCGGGA  
 AGGGGCAACCAGGCAAAAAGG

>151116-55\_C07\_NS3-10\_907R.ab1 1458

ACGAGTCGGCTCTCCAGGCGGGACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACGACGTGGAATGTCGCCAC  
 ACCTAGTTCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTTCGC  
 TCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTT  
 CACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGAATGCAGACCCGG  
 GGTAAAGCCCCGGGCTTTACATCCGACGCGACAGGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCGG  
 GACAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTCTTCTCTGCAGGT  
 ACCGTCACTTGCCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGGC  
 TCGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC  
 GTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTGCCTCTCAGGCCGGTACCCGTCGTCGCTTGGTAGGCCA  
 TCACCCACCAACAAGCTGATAGGCCCGGGCTCATCTGCACCGCCGGAGCTTTCACCACCAGAC  
 CATGCGGCCGGTGATCATATCCGGTATTAGACCCGTTTCCAGGGCTTGTCCCAGAGTGCAGGGCAG  
 ATTGCCACGTGTTACTCACCCGTTTCGCCACTAATCCACCACCGAAGCGGCTTCATCGTTCGACTTG  
 CATGTGTTAAGCACGCCCGCCAGCGTTCGTCCTGACGAAAAAATCATATAGAGGGGGCGGG  
 GAACCCGGGGTCAAACAGGCGGAAAAAATAGAGAACACCGAAAAAGAATTTTTTAAAGGGGGGT  
 GAATAAAATCACCGAAAAGAGCGGAGAAAAAAGGAGCCCCCGAGGGGGGGGGGGTAGAAAGG  
 GGGGGGGGGGGCGGTTGCCCAGGCAGGGTGTCTTGGAGGTGAGGCAGTGTGAGGTGAGGCACCCAAA  
 AAAAGTGTAAAACACCCCGGGGGGGGGGGGGTGCCTCCCAAGCCCCGCCCCGAGGGGGGGGGGAGGG  
 GGTGCAGGAGGAGGGGAAGAAAGGGGGAAGGGCCCCCGAAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAAAAA  
 AATCGGGGTTAAGTGACCCAGGACCCCTTTTTGGGGGGGGGGGGGACGCCCCCCCCAGCGAA  
 GGCCACCGGGGAGAGACGGAAGAAATTGAGGAATGGGGGGTGGATGGGTGCGTGGGAGGGGGGGGG  
 AGGAGGGAAAAAAGCGGAAAGGAAGGGGGGGGGGGGAAAGAAAGAAAGGGGGGGGGGGGGGGGG  
 GGGGGGGGGGGCCCCCTTCCCAACATGACCCAAAACGG

>151116-55\_M07\_SK08-5\_785F.ab1 749

GACGCAGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGTTCCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGC  
 GCCCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG  
 GCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGCAAAA  
 CTGTGAGAGATGGCAGGTCTTTCGGGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTC  
 GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCTCGTTTCGATGTTGCCAGCGCGTTATGGC  
 GGGACTCATCGAAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGC  
 CCCTTATGTCCAGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTG



GAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGA  
 GTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC  
 GTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAA  
 GGTGGGGCTGGCGATTGGGACGAAGTCGTACAGGGGAAAACCCGAAAAAAGAGGGGGGGGGCAAG  
 GGGGGAGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGG

>151116-55\_007\_SK08-5\_907R.ab1 911

ACAATGGGGTATCCAGGCGGGGCGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACAGGGAACCGGAGAGGCCCC  
 CCACACCTAGCGCCCAACGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCAC  
 GCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGACCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGAT  
 ATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCCGTA  
 TCGACCGCAGGCCTGGGGTTGAGCCCCAGGTTTTTACGGTTCGACGCGACAAGCCGCCTACGAGCT  
 CTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTCGCGCCCTACGTCTTACCGCGGTGCTGGCACGTA  
 TTGGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTACGCTTCGTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAA  
 CCCGAAGGCCGTATCCCTCACGCGGCGTGCATCAGGCTTCCGCCATTGTGCAATATTTCC  
 CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCA  
 GGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTAGGCCATCACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCC  
 CATCCCAAGCCGAAAACTTTCCACCAAAACACCATGCGGTGCAAGGTCATATTCGGTATTAGCCC  
 CGGTTTTCCCGGGTTATCCCAAAGCCTGGGGCAGGTTGCTCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCCG  
 TCGAGTACCCCGAAGGGCCTTTCCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTCGTCC  
 TGAGCGGAAAACAAAACACTATAAAAGGGCCCCCGGACCTTTTTTTTAAACTTTCATAAAAAAAT  
 AC

>151116-55\_E07\_PL1-4\_785F.ab1 1391

CCCCCGGGGGATAGGTGTGGGCGACATTCCACGTGTCGGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGTG  
 CCCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGC  
 GGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGG  
 AAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCT  
 CGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTGTCCCGTGTGCCAGCAG  
 GCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGA  
 CGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAG  
 CTGCGATAACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAA  
 CTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTT  
 CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCA  
 ACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAAGGGGGAA  
 CCCCCAAAAATACATAACCAAAAAAAAAAACCACCAAGCCACCCACCAGGGCCCAAAAA  
 ACCCCCTTTCCCCCCCCGGGTGCCCCCCTGAAAGCTGGGAGCCTTACCACCGCCATCCACGG  
 GGAATCCCAGAACCCCAACAACAATACCCATAGCGCGCCGGTACACGCTCGGAAAAACCC  
 GGGGAAAAAACCCCGGGGCTTTCTACACACCCAAACCGAAAGCGGCCCCCCGAAAAAACG  
 CTTTCAACCCCCATAAAAACTAACGGGAAAAACAGGCTTCTCGCACCCCCCGTACGAAAAATCC  
 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGCACACTAATGCACGCGGAAGGGGCCCTTTCTTGGCCGGGGAGGGGGA  
 CCACAAACCGTATAGCGCCTTGCCCCCCCCCCCCGCGCAAAAAAAAAAAGGGGGGAGAACCCCC  
 CAACGGGGGGGGCGGCCCCCGGCCCCCGGATCCGCACCCACCGTTCTGCGCGGGCCCCCGGA  
 ATAACGCCGGACCTCCAAAGCCAGAAAACGTACAGGGTTAAAGGGGGCCCCCCCCCCCCCAGAT

GGGGGGCCCCCCCCCCCCCAAGGGGGGAAAACGAAGGGGGCCGGGGCGGGGGGCTCTAATAGA  
GCCACCCCCCCCCCAGGAAACGGGAGGTAAGGTGAGGGGGAGGCCCC

>151116-55\_G07\_PL1-4\_907R.ab1 885

CCGTGGGGGTAATCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACGACGTGGAATGT  
CGCCACACCTAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCC  
CCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTC  
CTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCGGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCT  
GCCCCGATCGACTGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGC  
CTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTCGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTG  
CTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGA  
AAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCC  
ATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCCAGTGT  
GGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACA  
AGCTGATAGGCCCGCGGGCTCATCCTGCACCCCGGAGCTTTCGAACCGCTTGGATGCCCAAGC  
GGGTCAGTATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTTGTCCAGAGTGCAGGGCAGATTGCC  
CACGTGTTACTCACCCGTTTCGCCACTAATCCCCACCGAAGTGGTTCATCGTTCGACTTGCATG  
TGTTAAGCACGCCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCTGTTCCCAAACCTCTAAAGGGTGGGGGTTTA

>151116-55\_I07\_PL7-3\_785F.ab1 740

GGGGAGGTGGGACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAG  
TTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACA  
AGCGGGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACA  
CCGGAAGCGCTGGAGACAGTGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCT  
CAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGC  
CAGCAACTCTTCGGAGGTTGGGGACTCACGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGG  
GGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTA  
CAATGAGCTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGG  
GTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGGT  
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGC  
CGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAATCG  
TAACAGGAAAACCCGAAAAGAAAACCCACGGTTTTTAATCCCC

>151116-55\_K07\_PL7-3\_907R.ab1 917

GCCGGGGGATCTCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACGACGTGGAATGTC  
GCCCACACCTAGTTCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCC  
CCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCT  
CCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCGGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCC  
TGCCCCGATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACCGGACAGGCCG  
CCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCT  
GCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTGCCTTCTTCCCTGCTG  
AAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCC  
CATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCCAGTG  
TGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTAGGCCATCACCCCAAC

AAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCACCGCCGGAGCTTTCCACCACCAGACCATGCGGCC  
GGTGATCATATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTTGTCCCAGAGTGCAGGGCAGATTGC  
CCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCGCTAATCCACCACCGAAGCGGCTTCATCGTTCGACTTGC  
ATGTGTTAAGCACGCCACCAGCGTTCGTCTGAGCAGTTTCAAACTCTAAAAGGGGGTGGT  
TTTGTAAGGTGGGTCTGTCTAAAACCTTTCTGTCA

>151116-55\_M07\_SK08-5\_785F.ab1 749  
GACGCAGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCCCTGTGCCGAGCTAACGCATTA  
AGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGC  
ACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACA  
TGGCCGCAAACTGTCAGAGATGGCAGGTCCTTCGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTG  
TCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCGAT  
GTTGCCAGCGGTTATGGCGGGGACTCATCGAAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG  
GGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGG  
TACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATC  
GGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGC  
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCC  
GAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGA  
AGTCGTACAGGGGAAAACCCGAAAAAAGAGGGGGGGGCAAGGGGGGAGAGGGGGGGGGGG  
GGGG

>151116-55\_O07\_SK08-5\_907R.ab1 911  
ACAATGGGGTATCCAGGCGGGGCGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACAGGGAACCGGAGAGGC  
CCCCACACCTAGCGCCCAACGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCT  
CCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGACCCGCTTCGCCACCGGTGTT  
CCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCTACCGAACTCT  
AGCCTGCCCCGATCGACCGCAGGCCTGGGGTTGAGCCCCAGGTTTTTACGGTCGACGCGACA  
AGCCGCCTACGAGCTCTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTCGCGCCCTACGCTTACC  
GCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTACGCTTCGTC  
CCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGG  
CTTCCGCCATTGTGCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCA  
GTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGTACCCGTCGTCGCTTGGTAGGCCATCA  
CCCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCCCAAGCCGAAAACTTTCCACCAAAACAC  
CATGCGGTGCAAGGTCATATTCCGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGGTTATCCCAAAGCCTGG  
GGCAGGTTGCTCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCGCTCGAGTACCCGAAGGGCCTTTCCGC  
TCGACTTGATGTGTTAAGCACGCCCGCAGCGTTCGTCTGAGCGGAAAAACAAAACCTCATAA  
AAGGGCCCCCGACCTTTTTTTTAACTTTTCATAAAAAAATAC

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA ของยีสต์รหัส BS6-2 และ AS 1-8

>BS6-2 (583 nucleotides)  
AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGA  
GGCTTTTCAGCCCCGAGTTGTAATTTGAAGATGGTGTCTGGCGCCGGCGCCCTGTCTACGTTT  
CTTGGAACAGGACATCGCAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGGCGGGCGGCTGGCTCCGTGTAGA

GCGCCATCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAA  
 GCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTG  
 AAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGATCAGACTTGGTGCT  
 GTGCGAATAGCGGCCCTTCTTGGGCTGCCACTCGCACTCCACCGGGCCAGCATCGGTTTGGGC  
 GGCAAGACAATGGCGGGGGAACGTGGCACTGCTCTCGGGCAGTGTGTTTATAGCCCCCGCTGAT  
 GTTGCCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGGCTTCTGCCTAGGA

Sequence AS1-8

>141216-34\_I05\_AS\_1-8\_Yeast\_ITS1.ab1 1230  
 GGGTATCAGGNATAGAGACGTCAACTTAACTNTGGAGTCCGAACCTCACTTTCTAACCCCTG  
 TGCACCTTGTGGGATAGTAACTCTCGCAAGAGAGCGAACTCCTATTCACCTTATAAACACAA  
 AGTCTATGAATGTATTAATTTTTATAACAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC  
 TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT  
 CATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGGAGTG  
 TCATGAATACTTCAACCCTCCTCTTTCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGTTTCTGAGCGCT  
 GCTGGCCTTTACGGTCTAGCTCGTTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTG  
 ACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTCTTCGGATTAGAGCCGGGTGGGTT  
 AAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTAAGATTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTA  
 CCCGCTGAACTTAAGCATATCATAANCCGGAAGGAAANNAGTCNTNNAGNGNATATNNGGAC  
 GTCCAACCTTAACTTGGAGTACGAACTCTCACTTCTAACACTGTGCACCTGTTTGGGATTAGT  
 AACTCTCGCAAGAGAGCGAACTCTCATTCACTTATAAACCAAAGTCTATGAAATGTATTA  
 TTCTTATAACAAAATAAACTTTTCAACCGGATCTCTTGGCTCTGCATCGATCAAAGAAGCA  
 GCGAAATGCGATAAGTAATGGTGAATTGCAAAAATTGTGGAATCATCAATCTTTGAACGCAC  
 TGGCGCTCAGGGTAATTCCTGGAAACAGGCTGGTTTGAATGTCAGGAAAACCTCACCTTCTC  
 TTTTTTAAAGATGGAAAAAAGGGTTTTGGGTTTTTGGAGCGCTCCTGCCTTTCCACGCTTA  
 CCTCTTTGAAAAGGAATAAACACCGACTCCAAATTCGGAAAGGACTTGGGGGAAAAAACA  
 ATTCCCTGAAGAAAATCATTCTCTCCGGTAAAAAACCCGGGTGGGGTTATAAAGGGGAAGCC  
 TCCTCAAACAAAAAACCTCCTTTTTTAAAAAATAAATCTTAACTACGGGGAGGAAAACC  
 CCCCAAAATTAAGACTACACATATAGAGGGGAGGAAAAAATAAATNTNT

>141216-34\_K05\_AS\_1-8\_Yeast\_ITS4.ab1 677  
 AAAAAGCCCGTATTGGTAGTCTACTTGGATTTGAGATCTAATCTTAAAATGTAGACATTCT  
 GATTAGAAGCTTCCTTTAACCCAACCCGGCTCTAATCCGAAGACTAGAATTCCTCAGCGAA  
 TAGTCTATTACGCCAAGTCAATCCGAAGTTCGATTGCGGATGCTAATGCATTACGAACGAG  
 CTAGACCGTAAAGGCCAGCAGCGCTCAGAAACCAAACACCTCTTCAATCATTAAAGAAAGAG  
 GAGGGTTGAAGTATTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCACGGAATACCATGGAGCGCAA  
 GGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTT  
 GCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTATTTTGTAT  
 AAAATTTAATACATTCATAGACTTTGTGTTTATAAGTGAATAGGAGTTCGCTCTCTTGCGA  
 GAGTTACTATCCCAAACAAGTGCACAGGGTTAGAAAGTGAGAGTTCGGACTCCAAGTTAAG  
 TTGGACGTCTATATTCATAATGATCCTTCCGCAGGTACCCTACGGAAAAGGGCCTGT  
 CCTTAACGGTTTTCGTTACCTAGTTAGCGGCTCTTGCCACCTGTGCGCGGCTTGCAGGTT  
 GGGTTTTCTGGCGTAATGATCCAACACCGCCGCTCT

## ผลผลิต(Out put)โครงการวิจัย

### 1. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ ระดับนานาชาติ

1.1 10<sup>th</sup> International Marine Biotechnology Conference (IMBC 2013) ซึ่งจัดขึ้นระหว่างวันที่ 11 -15 พฤศจิกายน 2556 ณ เมือง Brisbane มลรัฐ Queensland ประเทศออสเตรเลีย

1.2 18<sup>th</sup> International Microscopy Congress (IMC 2014) ซึ่งจัดขึ้นระหว่างวันที่ 7-13 กันยายน 2557 ณ กรุงปารีส ประเทศสาธารณรัฐฝรั่งเศส

1.3 25<sup>th</sup> Asian Association for Biology Education (AABE 2014) ซึ่งจัดขึ้นระหว่างวันที่ 13-17 ตุลาคม 2557

1.4 Burapha University International Conference, ซึ่งจัดขึ้นระหว่างวันที่ 10-12 กรกฎาคม 2558 ณ The Heritage บางแสน จังหวัดชลบุรี

1.5. 6<sup>th</sup> International Conference on Fermentation Technology for Value Added

Agricultural Products, FerVAAP 2015, ซึ่งจัดขึ้นระหว่างวันที่ 29-31 กรกฎาคม 2558 ณ โรงแรม เซนทารา แอนด์คอนเวนชัน จ.ขอนแก่น

1.6. 9<sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products ซึ่งจัดขึ้นระหว่างวันที่ 30 สิงหาคม – 2 กันยายน 2558 ณ Technology Innovation Centre, University of Strathclyde, Glasgow, ประเทศสหราชอาณาจักร

ดังบทความ และชื่อเรื่อง ตามลำดับต่อไปนี้

1.1 การประชุมสัมมนาทางวิชาการ 10<sup>th</sup> IMBC 2013 บริสเบน รัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย

#### **Anti-MRSA and antioxidant activities of actinomycetes isolated from marine sponges**

Type of presentation: N/A,

Actinomycetes are gram positive bacteria in which many bioactive compounds are generally produced. Over past decade information on the diversity of actinobacteria in marine habitats has grown considerably. In this study, morphological and chemical characteristics of wall chemotype were investigated for a rapid method of basically classification. The location of sediment sampling areas were in Chonburi and Bang-pakong mangrove forests in the east and Nakhon Si-thamarat mangrove in the west of the Gulf of Thailand, including marine shallow water coastal area in the east coast. The sediment samples were pre-treated with dry heat at 100o C for 1 h before dilution and spreading on selective medium plates, incubated at 30o C for 4 weeks. Morphological study was observed both under light microscope and scanning electron microscopy. The results revealed that most active isolates from Chonburi mangrove area were Streptomyces with rectiflexible, spiral and hook spore chain types, while the isolates from Bang-pakong and the west side of the Gulf manifested various different morphological types. The active isolates from marine sediments mostly produced single spore chain type on short or long sporophores or produced in a bundle of Micromonospora and Salinispora, respectively; including a few white spore mass Streptomyces. The electronmicrographs of many isolates could reveal more different morphological detail to consider they were same or different species. Apart of morphological and chemical characteristic studies, some of representative actinomycetes were selected to identified by 16S rRNA gene sequencing. The active isolates from mangrove and marine sediments are moderately diverse in genera, but clearly shown they are morphologically diverse and are rich sources to screen for valuable bioactive compounds.

**Acknowledgements:** The financial support from the NRCT through the Burapha University budget was gratefully acknowledged.

1.2. การประชุมสัมมนา 18<sup>th</sup> International Microscopy Congress (IMC 2014) กรุงปารีส สาธารณรัฐฝรั่งเศส

## Morphological study of antimicrobial actinomycete producing isolates from marine sediments

Srivibool Rattanaporn. -.1

1Institute of marine Science, Burapha University, Chonburi. 20131. Thailand

Email of the presenting author: rattanap@buu.ac.th

Actinomycetes are gram positive bacteria in which many bioactive compounds are generally produced. Over past decade information on the diversity of actinobacteria in marine habitats has grown considerably. In this study, morphological and chemical characteristics of wall chemotype were investigated for a rapid method of basically classification. The location of sediment sampling areas were in Chonburi and Bang-pakong mangrove forests in the east and Nakhon Si-thamarat mangrove in the west of the Gulf of Thailand, including marine shallow water coastal area in the east coast. The sediment samples were pre-treated with dry heat at 100o C for 1 h before dilution and spreading on selective medium plates, incubated at 30o C for 4 weeks. Morphological study was observed both under light microscope and scanning electron microscopy. The results revealed that most active isolates from Chonburi mangrove area were Streptomyces with rectiflexible, spiral and hook spore chain types, while the isolates from Bang-pakong and the west side of the Gulf manifested various different morphological types. The active isolates from marine sediments mostly produced single spore chain type on short or long sporophores or produced in a bundle of Micromonospora and Salinispora, respectively; including a few white spore mass Streptomyces. The electronmicrographs of many isolates could reveal more different morphological detail to consider they were same or different species. Apart of morphological and chemical characteristic studies, some of representative actinomycetes were selected to identified by 16S rRNA gene sequencing. The active isolates from mangrove and marine sediments are moderately diverse in genera, but clearly shown they are morphologically diverse and are rich sources to screen for valuable bioactive compounds.

Acknowledgement: Acknowledgements: The financial support from the NRCT through the

1.3 การประชุมสัมมนาทางวิชาการ 25<sup>th</sup> Asian Association for the Biology Education (AABE) ณ กรุงกัวลาลัมเปอร์ ประเทศมาเลเซีย ซึ่งจัดขึ้นระหว่างวันที่ 13-16 ตุลาคม 2557 โดยได้เสนอผลงานเรื่อง

## BIODIVERSITY OF ANTIMICROBIAL PRODUCING ACTINOMYCETES IN COASTAL MARINE SEDIMENTS

<sup>1</sup>Rattanaporn SRIVIBOOL, <sup>2</sup>Trisukon MALI and <sup>1</sup>Rawiwan WATANADILOK

Email: rattanap@buu.ac.th

(<sup>1</sup>Research Division, Institute of Marine Science, Burapha University, Thailand

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University)

### Abstract

Coastal mangrove sediments were collected and isolated for antimicrobial producing actinomycetes. The study areas were in Chachoengsao, Chonburi and Nakhon Si Thammarat Provinces. Out of 12 samples, 5 from Chachoengsao, Chonburi and 7 from Nakhon Si Thammarat gave a total of 102 isolates, 47 from Chachoengsao and Chonburi and 55 from Nakhon Si Thammarat. It was found that 7 actinomycetes recovered from Chachoengsao and Chonburi were active to either *Candida albicans* or *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) tested while there were 27 active isolates from those recovered from Nakhon Si Thammarat. By chemical analysis of wall diaminopimelic acid and sugar pattern including morphological studies revealed that the active isolates were moderately diverse in genera level and were more diverse in species level from both areas.

Keywords: Antimicrobial, actinomycetes, mangrove

1.4 การประชุมสัมมนาทางวิชาการ Burapha University International Conference, 2015 , The Heritage, บางแสน ชลบุรีเรื่อง

### **Distribution of actinomycetes in Thai mangrove sediments**

Rattanaporn Srivibool and Rawiwan Watanadilok

*rattanap@buu.ac.th*

*Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi.*

#### **Abstract**

Mangrove forest ecosystems are rich in microorganisms including actinomycetes. In this study, 24 sediment samples were collected from mangrove areas in Nakorn Si-Thamarat, Chumporn and Rayong provinces on the east coast and west coast of the Gulf of Thailand. Actinomycetes were isolated by several selective media, then were characterized and screened for antimicrobial and antioxidant activities. Actinomycetes were recovered in total 83 isolates from the 3 provinces, 55 from Nakorn Si-Thamarat, 16 from Chumporn and 12 from Rayong mangrove sediments. The actinomycetes recovered from Nakorn Si-Thamarat mangrove were rather diverse in different family, which were mainly *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Streptoalloteichus* and some unidentified genera; where as those found from Rayong and Chumporn mangroves were rather diverse mainly in same family in Actinoplanetes: *Virgisporangium*, *Micromonospora*, *Salinispora* and *Spirilliplanes* in which the colonies are small and in orange, brown or black which could differentiate to each other by chemotaxonomy and morphology studies. Although in Rayong and Chumporn mangrove areas did not obtain many anti-microbial producing strains as those obtained from Nakorn Si-Thamarat, we believed that by other method of antimicrobial investigation more antimicrobial producing strains would be found. Antioxidant activity by selected isolates from all areas reveal actinomycetes recovered from mangrove areas are potential source of lead antioxidant compounds.

*Keywords:* Actinomycetes; mangrove sediments; antioxidant; antimicrobial

1.5. 6<sup>th</sup> FerVAAP, 2015 โรงแรมเซนทารา แอนด์คอนเวนชั่น ชอนแก่น

### **Effect of Culture Media on the Nutritional Value of Marine yeasts**

**Nisa Siranonthana<sup>1</sup>, Rattanaporn Srivibool<sup>1,\*</sup> and Yuji Teramoto<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Marine Science, Burapha University*

<sup>2</sup>*Sojo University*

\* *Corresponding author: rattanap@buu.ac.th*

The use of marine yeasts in larval rearing is now one of the economic technological inputs in the production of natural live feeds for zooplanktons or shrimp larvae. They are cheap to produce and

can be grown using low cost carbon source from agricultural products. In the present study, the two marine yeast isolates AS1-8 and BS 6-2 were cultured on 4 types of media: potato dextrose broth (PDB) , Czapek Dox broth, cornmeal, and black lentil meal. The yeasts were cultured by shaking at 110 rpm, 30°C, for 72 h and cells were harvested by centrifugation. Nutritional analysis of the two yeast isolates were analysed: protein, crude fat, fatty acid and ash. Total lipid was investigated by extraction of 0.1 g dried yeast cells with chloroform:methanol (2:1, v/v) containing 0.1% butylated hydroxytoluene. Total lipid was obtained by filtering the lower layer through anhydrous sodium sulfate. Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared by total lipid transesterification and measured by gas-liquid chromatography. The individual FAMES was identified by comparison to known standards. The results showed that both yeast isolates AS1-8 and BS 6-2 contained some high amount of palmitic, oleic and linoleic acids and some amount of  $\alpha$ -linolenic acid. Oleic acid was produced in BS 6-2 and AS1-8 in highest amount, 38.63 $\pm$ 0.38%TFA and 32.94 $\pm$ 0.34%TFA, respectively when cultured on cornmeal broth whereas palmitic acid was produced in high amount in both isolates and on every kind of medium used. Interestingly, the yeast isolate AS1-8 contained high amount of protein when cultured on black lentil meal (50.56 $\pm$ 0.19 %) and PDB (40.41 $\pm$ 0.57%), while yeast isolate BS 6-2 contained 41.53 $\pm$ 0.04 % and 29.69 $\pm$ 0.18 % on PDB and Czapek dox broth, respectively. The crude fat content in cells of the two yeast isolates was high when cultured on cornmeal medium, 5.16 $\pm$ 0.01% for AS1-8 and 7.78 $\pm$ 0.28 % for BS6-2. Although polyunsaturated fatty acids were found in trace amount, the two essential fatty acids for marine aquatic larvae, linoleic and  $\alpha$ -linolenic were found. The nucleotide sequence of D1/D2 domain of 26S rDNA of the two yeast isolates were analysed and AS1-8 was closest to *Rhodotorula mucilaginosa* with 99% similarity and BS6-2 was closest to *Pichia jadinii* with 99.13 % similarity.

**Keywords:** Marine yeast, Nutrition, Fatty acids



1.6 9<sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products 30 สิงหาคม – 2 กันยายน 2558 ณ Technology Innovation Centre, University of Strathclyde, Glasgow

### **Anti-cancer and apoptosis-inducing activities of *Streptomyces* A 16-1 an isolate from coastal soil in the east Gulf of Thailand**

E-mail: [rattanap@buu.ac.th](mailto:rattanap@buu.ac.th)

#### Abstract

Marine microorganisms have been investigated for decades for novel natural anti-cancer products that are hard to formulate by traditional synthesis. *Streptomyces* are a prolific source of secondary metabolites used in clinical cancer therapy such as daunomycin, doxorubicin, bleomycin. This study *Streptomyces* A16-1 was isolated from coastal soil in Chonburi, Thailand. Cytotoxic activity and apoptotic mechanisms were investigated with partial purification of crude red pigment of the strain. The fractionates were applied to human nasopharynx cell lines (KB cells) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Percent cell viability was assessed by MTT assay. The apoptotic effects were evaluated by DAPI nuclear staining, agarose gel electrophoresis, mitochondria staining and Caspase-3 activity.

Of 21 fractions, fr7-9, fr10-12, and fr13-16 displayed strong inhibitory effects against KB cells in a dose-dependent manner but less effective against PBMCs. Fraction fr7-9 showed the greatest effect with IC<sub>50</sub> values of 0.04±0.005, whereas fr10-12, fr13-16 and doxorubicin were, 0.20±0.02, 0.55±0.05 and 1.35±0.23 µg/mL, respectively. Morphological observations showed cell shrinkage, irregular in shape with cytoplasmic granules. Molecular mechanisms of cell death were associated with mitochondrial transmembrane depolarization, chromatin condensation and DNA fragmentation as well as sub G1 fraction of cell cycles. Furthermore, the induction of apoptosis in KB cells was mediated by activated caspase-3 which was significantly diminished in a caspase-3 inhibitor.

By 16S rRNA gene sequence analysis and BLAST matching from GenBank database revealed *Streptomyces* A16-1 was 99.101% similarity to *Streptomyces indiaensis*.

On chromatograms there were at least 8 components in fr7-9, the strong cytotoxic activity and cell apoptosis might cause by a synergistic effect of some or all components while little cytotoxic effect on PBMCs was found which was a good sign. *Streptomyces* A16-1 might have many promising active compounds for cancer chemotherapy. Further efforts to identify the structure and to explore the therapeutic strategy are necessary.

**Key words:** Apoptosis, *Streptomyces*, DNA fragmentation, mitochondrialdepolarization, caspase-3

## 2. ผลงานตีพิมพ์ใน Proceedings ระดับนานาชาติ

2.1 ในการประชุมวิชาการ International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology ครั้งที่ 1, 4-6 October 2012 จ. ขอนแก่น สำหรับปิดโครงการวิจัยที่ได้รับทุนปีงบประมาณ 2556

2.2 ในการประชุมสัมมนาวิชาการ Burapha University International Conference, 2015, จ. ชลบุรี สำหรับปิดโครงการวิจัยที่ได้รับทุนปีงบประมาณ 2557

2.3 ในการประชุมสัมมนาวิชาการ 6<sup>th</sup> FerVaap 2015 จ. ขอนแก่น สำหรับปิดโครงการวิจัยที่ได้รับทุนปีงบประมาณ 2558

## Anti-MRSA Activity of *Streptomyces* A16-1 An Isolate From Coastal Soil.

<sup>1</sup>Rattanaorn Srivibool and <sup>2</sup>Subuntith Nimrat

(<sup>1</sup>Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand. <sup>2</sup> Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131. Thailand.)

---

### ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA, is any strain of *Staphylococcus aureus* that has developed resistance to beta-lactam antibiotics, which include the penicillins (methicillin, dicloxacillin, nafcillin, oxacillin, etc.) and the cephalosporins. It is also called multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) and difficult to be treated in several infections in humans. *Streptomyces* A16-1, an antimicrobial producing strain, isolated from coastal soil was cultured on ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) medium for 3 days before anti-MRSA activity was investigated by cross streak method. Twenty-nine strains of MRSA isolated from pus, sputum, urine and hemolymph of patients were test organisms. The result showed that all the MRSA tested strains were inhibited by *Streptomyces* A16-1, except MRSA SP83. Ethyl acetate crude product of *Streptomyces* A16-1 separated by TLC and bioautography assay revealed that the strain produces many active compound against MRSA SP22. Partial purification of the crude product was carried on by silica gel column chromatography and 21 fractions were collected. After concentrated, anti-MRSA activity of each fraction was detected by bioautography assay. It was revealed that 6 components of fraction 6, 5 components of fractions 7-9 and 2 components of fractions 10-12, and fraction 5 were active components against MRSA P45. All the results showed that *Streptomyces* A16-1 produced many active compounds against various strains of MRSA isolated from patients. By 16S rRNA gene sequence analysis and by morphological studies, *Streptomyces* A16-1 was 98.961% similar to *Streptomyces spinoverrucosus*.

**KEYWORDS:** Anti-MRSA, Actinomycetes, *Streptomyces*, MRSA

---

Corresponding Author, E-mail: rattanap@buu.ac.th

## INTRODUCTION

---

Staphylococci are amongst the most hardy of the nonspore forming bacteria and can survive significant adverse environmental conditions. They can be easily cultured from desiccated clinical material, even after several months, are relatively heat-resistant and can tolerate high salt concentrations. *S. AUREUS* is one of the most prevalent of this genus and has been a recognized pathogen in humans for centuries (Wad Vogel, 2000).

MRSA is any strain of *Staphylococcus aureus* that has developed resistance to beta-lactam antibiotics, which include the penicillins (methicillin, dicloxacillin, nafcillin, oxacillin, etc.) and the cephalosporins. Strains unable to resist these antibiotics are classified as methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, or MSSA. The development of such resistance does not cause the organism to be more intrinsically virulent than strains of *S. aureus* that have no antibiotic resistance, but resistance makes MRSA infection more difficult to treat with standard types of antibiotics and thus more dangerous.

Generally, reservoir of *S. aureus* in human body is the anterior nares, although other sites such as the groin, axillae and perineal area have been described as well. Approximately 20% to 40% of the adult population may be colonized at any given time, depending on a number of local and epidemiological factors. On an individual basis, about 30% of the adult population will be chronic carriers, 50% will be intermittent carriers and another 20% do not seem to become colonized. If the mucous membranes or the skin barrier are breached from trauma or surgical intervention, *S. AUREUS* may enter the soft tissues and establish an invasive infection. This background makes us understand why *S. AUREUS* continues to be a major human pathogen that infects both healthy hosts in the community as well as compromised hosts in the hospital (Payne, et al., 1996; Sanford, et al., 1994).

The emergence of MRSA in Canada is a phenomenon in last 2 decades, raising considerable concern because this type of *S. AUREUS* would cause infections difficult to treat in the outpatient (Conly, et al., 2003). In Thailand, the National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) program, studied an overview of the

antimicrobial susceptibility patterns of important Gram-positive bacteria from between 2000 and 2005 as well as the clinical implications. It was found a constant occurrence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was noted during this period (Mootsikapun et al., 2009). NARST reported that MRSA contributes significantly to either healthcare-associated or hospital acquired infections in Thailand. Further more, MRSA is also associated with community-acquired infections in western countries. The data of NARST surveillance indicated that MRSA constantly contributed 24% to 27% of all *S. aureus* clinical isolates from most hospitals during the study period, except from certain university hospitals where the percentage ranging between 30% and 60%. Thus, from now on searching for more other type of antibiotics to conquer MRSA would be an urgent task.

Actinomycetes are well known having produced thousands of bioactive compounds. In the past two decades, however, there has been a decline in the discovery of new lead compounds from common soil-derived actinomycetes. Recently scientists started searching various extreme ecosystems such as deep sea, forest, mountains and deserts for the discovery of novel actinomycetes and novel antibiotic compounds (Jensen, et al., 2005; Valan, et al., 2008; Radhakrishnan, et al., 2007). The purpose in this present study was to find new antibiotics or bioactive compounds from actinomycetes isolated from Thai coastal soil.

Naorungrote, et al. (2011) reported that out of different 64 isolates of ACTINOMYCETES isolated from soil samples in Nakhon Si Thammarat, 19 exhibited anti-MRSA activity in which 10 isolates could inhibit all tested MRSA. Some isolates exhibited the anti-MRSA activities on both agar plug and agar well diffusion methods and from taxonomic studies all these isolates belong to *Streptomyces*: *Streptomyces* sp. CFJ2, *Streptomyces antibioticus* strain 1022-257, *Streptomyces flaveolus* strain NRRL B-1334, *Streptomyces psammoticus* strain NBRC 13971 and *Streptomyces* sp. B26 (Naorungrote, 2011). Up to present, actinomycetes still be a prominent group and promising bacteria for scientists to search for novel antibiotics and other new effective bioactive compounds.

## **EXPERIMENTAL AND METHODS**

---

### 1. Isolation and purification of Actinomycetes

*Streptomyces* A16-1 was isolated from tropical coastal soil in Chonburi Province, Thailand, on Starch Casein

Agar. The soil was pretreated at 55°C for 30 min before spreading on the agar medium, then incubated at 32°C for a week. The colony was purified on the same medium after appearing on the isolation plate, kept at room temperature, 25°C, for further studies and preserved in 20% glycerol at -40°C.

### 2. Preparation of MRSA test strains.

All tested MRSA were isolated from patients' specimens: pus-, sputum-, urine- and haemo-culture, and classified by standard method as described in Holt et al. (1986), Colle et al. (1996) and Hakim et al. (2007). Tested MRSA were streaked on Tryptic Soy Agar, incubated at 30°C for 24 hours and concentration adjusted as 0.5 Mcfarland ( $10^8$  CFU/ml) in Tryptic Soy Broth before use.

### 3. Preliminary anti-MRSA activity study.

Anti-MRSA activity was investigated by cross streak method after *Streptomyces* A16-1 was cultured on ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) medium for 4 days and extended the incubation time for another day before the result was read.

### 4. Extraction and partial purification of crude bioactive compounds.

*Streptomyces* A16-1 was cultured in ISP2 broth, 100 rpm reciprocal shaken, at 30°C for 10 days. Separated cells and medium by centrifugation before crude compounds were extracted by methanol and ethyl acetate, respectively. The crude compounds were preliminary separated by thin-layer chromatography on silica gel plate. Partial purification of the crude product was continued through silica gel column chromatography, eluted by chloroform, chloroform:methanol = 95:5, 90:10, 80:20 and 70:30, respectively. Fractions were collected, 50 ml each, and solvents were concentrated by evaporation.

### 5. Bioautography assay study.

Antimicrobial activity to MRSA of the partially purified compound from TLC was tested by bioautography method. The concentrated crude, partial purification, products were spot on TLC (Silica Gel 60, 4x4.5 cm), separated with chloroform and methanol and placed on agar medium plates pre-

swabbed with MRSA P45. Left the separated component spots well absorbed at 4° C for 4 h and incubated for another 24 h after the chromatograms were taken out, and the inhibition zones on agar plates were observed.

#### 6. Morphology and molecular studies.

*Streptomyces* A16-1 was streaked on ISP2 medium plate, incubated at 32° C for 3-4 days and examined both under inverted light microscopy and scanning electron microscopy. Aerial, substrate mycelium and spore chain type, including ultra structures of the strain were noticed. Molecular study was performed by analysis of 16S rRNA gene sequencing and the BLAST matching from GenBank sequences data base.

### **RESULTS AND DISCUSSION**

---

Preliminary test for anti-MRSA activity of *Streptomyces* A16-1 to 29 strains of MRSA: MRSA SP1, MRSA SP5, MRSA U7, MRSA P9, MRSA H16, MRSA SP21, MRSA SP22, MRSA SP27, MRSA SP31, MRSASP37, MRSA SP39, MRSA SP41, MRSA SP45, MRSA SP47, MRSA SP58, MRSA SP61, MRSA SP64, MRSA P65, MRSA H78, MRSA SP78, MRSA SP79, MRSA SP83, MRSA P86, MRSA SP86, MRSA SP89, MRSA P90, MRSA SP117, MRSASP120 and MRSA SP138, revealed clear inhibition zone mostly in range of 10-15 mm from the *Streptomyces* streak. Only MRSA SP86, MRSA SP78 and MRSA SP41 that the inhibition zones were lesser from the range, 4mm, 6 mm and 7 mm respectively. Partial purification of the crude product gave 21 fractions, but fraction 7-9, 10-12, 13-16, 17-19 and 20-21 showed a similar pattern of components on the chromatograms. Anti-MRSA P45 activity was revealed by bioautography assay. Six and 5 component spots from fraction 6 and fraction 7-9 show anti-MRSA activity, 2 component spots from fraction 5 and fraction 10-12 as well. These data indicated that *Streptomyces* A16-1 produced many bioactive compounds inhibited to various sources of MRSA. Data from morphological and molecular studies revealed *Streptomyces* A16-1 having 98.961 % similarity to *Streptomyces spinoverrucosus*.

### **CONCLUSIONS**

---

As *Streptomyces* A-16-1 capably well inhibited all MRSA tested isolates, it is a promising strain to be developed for further anti-MRSA antibiotic production or for further pharmaceutical study.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

---

The Institute of Marine Science and colleagues in Marine Biotechnology Unit were to be acknowledged for all facilities and helpful cooperation. The research grant was supported by NRCT through government budget.

### **References**

- Conly, J. M., and Johnston, B. L. (2003) The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community-acquired pathogen in Canada. *Can J Infect Dis.* 2003 Sep-Oct; 14(5): 249–251.
- Colle, J.G., Frasher, A. G., Marmiom, B. P., Simmon, A. (1996) Makie and McCartney's Practical Medical Microbiology, 14th edn. Churchill Livingstone, pp. 254-256 & pp. 796-800.
- Frey, R. G. (1980). *Interests and Rights: the Case against Animals.* Oxford: Clarendon Press. pp. 11-22.
- Ozaki, M., Adachi, Y., Iwahori, Y. and Ishii, N. (1998). Application of Fuzzy Theory to Writer Recognition of Chinese Characters. *International Journal of Modeling and Simulation.* 18(2): 112-116.

Hakim , S.T., Arshed, S., Iqbal, M., *et al.* (2007) Vancomycin sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolates from hospital patients in Karachi, Pakistan. *Libyan Journal of Medicine, AOP: 070624* 2007; 1-6.

Holt J. G., Sneath, P.H., Mair. N.S., *et al.* (1986)..Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2. Baltimore: Williams & Wilkins

Jenson, P.R., Mincer. T.J., Williams, P.G., Fenical, W.(2005).Marine actinomycete discovery and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek.* 87:43-8.

Mootsikapun, P., Trakulsomboon, S., Sawanpanyalert , P., Aswapokee, N., and Suankratay, C. (2009) An Overview of Antimicrobial Susceptibility Patterns of Gram-Positive Bacteria from National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) Program from 2000 to 2005 *J Med Assoc Thai* 2009; 92 (Suppl 4): S87-90

Naorungrote, S., Chunglok, W., Lertcanawanichakul, M., and Bangrak, P.(2011). Actinomycetes Producing Anti-Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* from Soil Samples in Nakhon Si Thammarat. *Walailak Journal of Science and Technology.* 8:

Payne, M.C., Wood, H.F., Karakawa, W., Gluck, L. (1996) A prospective study of staphylococcal colonization and infections in newborns and their families. *Am J Epidemiol.* 82:305- 16.

Radhakrishnan M, Balaji S, Balagurunathan R. Thermotolerant actinomycetes from the Himalayan Mountains-Antagonistic potential, characterization and identification of selected strains. *Malay Appl Biol* 2007;36:59-65.

Sanford, M.D., Widmer, A.F., Bale, M.J., Jones, R.N., Wenzel, R.P.(1994) Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 19:1123-8.

Sata, T. (1971). New identification methods for manufacturing processes. In: Peklenik, J., Ed. *Advances in Manufacturing Systems Research and Development.* Oxford: Pergamon Press. pp. 11-22.

Valan AM, Duraipandian V, Agastian P, Ignacimuthu. Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *J Med Mycol* 2008;18:147-53.

Wad Vogel, F.A. (2000) *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases.* 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 2069-92.

---

## EFFECT OF CULTURE MEDIA ON THE NUTRITIONAL VALUE OF MARINE YEASTS.

---

**Nisa Siranonthana<sup>1</sup>, Rattanaporn Srivibool<sup>1\*</sup>, and Yuji Teramoto<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi, 20131, Thailand*

<sup>2</sup> *Faculty of Biotechnology and Life Science, Sojo University, Ikeda 4-22-1, Kumamoto 860-0082, Japan*

\* Corresponding author: [rattanap@buu.ac.th](mailto:rattanap@buu.ac.th)

### Abstract

The use of marine yeasts in larval rearing is now one of the economic technological inputs in the production of natural live feeds for zooplanktons or shrimp larvae. They are cheap to produce and can be grown using low cost carbon source from agricultural products. In the present study, the two marine yeast isolates AS1-8 and BS 6-2 were cultured on 4 types of media: potato dextrose broth (PDB), Czapek Dox broth, cornmeal, and black lentil meal. The yeasts were cultured by shaking at 110 rpm, 30°C, for 72 h and cells were harvested by centrifugation. Nutritional analysis of the two yeast isolates were analysed: protein, crude fat, fatty acid and ash. Total lipid was investigated by extraction of 0.1 g dried yeast cells with chloroform:methanol (2:1, v/v) containing 0.1% butylated hydroxytoluene. Total lipid was obtained by filtering the lower layer through anhydrous sodium sulfate. Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared by total lipid transesterification and measured by gas-liquid chromatography. The individual FAMES was identified by comparison to known standards. The results showed that both yeast isolates AS1-8 and BS 6-2 contained some high amount of palmitic, oleic and linoleic acids and some amount of  $\alpha$ -linolenic acid. Oleic acid was produced in BS 6-2 and AS1-8 in highest amount,  $38.63 \pm 0.38\%$  TFA and  $32.94 \pm 0.34\%$  TFA, respectively when cultured on cornmeal broth whereas palmitic acid was produced in high amount in both isolates and on every kind of medium used. Interestingly, the yeast isolate AS1-8 contained high amount of protein when cultured on black lentil meal ( $50.56 \pm 0.19\%$ ) and PDB ( $40.41 \pm 0.57\%$ ), while yeast isolate BS 6-2 contained  $41.53 \pm 0.04\%$  and  $29.69 \pm 0.18\%$  on PDB and Czapek dox broth, respectively. The crude fat content in cells of the two yeast isolates was high when cultured on cornmeal medium,  $5.16 \pm 0.01\%$  for AS1-8 and  $7.78 \pm 0.28\%$  for BS6-2. Although polyunsaturated fatty acids were found in less amount, the two essential fatty acids for marine aquatic larvae, linoleic and  $\alpha$ -linolenic were found. The nucleotide sequence of D1/D2 domain of 26S rDNA of the two yeast isolates were analysed and AS1-8 was closest to *Rhodotorula mucilaginosa* with 99% similarity and BS6-2 was closest to *Pichia jadinii* with 99.101% similarity.

**Keywords:** marine yeast, nutrition, fatty acid

## INTRODUCTION

---

Yeasts are a rich source of proteins and B-complex vitamin. They have been used as a supplement in animal feeds to compensate the amino acid and vitamin deficiencies of cereals, and are recommended as a substitute for other ingredients in fish<sup>[1]</sup>. Marine

microorganisms, including yeasts, live in extreme environments in which a unique of functional biomolecules could be potential provided<sup>[2]</sup> In the ocean, 71% of the earth surface, many genera of yeasts can be found such as: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida membranifaciens*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum* sp., *Pichia capsulata*, *Pichia fermentans*, *Pichia salicaria*, *Rhodotorula minuta*, *Cryptococcus dimenna*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula mucilaginosa*<sup>[3,4,5,6]</sup>.

The benefit for aquaculture field was that marine animals or larvae usually prefer live feeds that would be good for reduction of water quality problem. Yeast products (live yeasts) are frequently used as feed ingredients in aquaculture because of the nutrition valued, which include protein, lipids, B-vitamins etc. The current study investigated percentage of protein and crude fat, including fatty acid profiles when cultured in various media.

## MATERIALS AND METHODS

---

2.1 Two yeast isolates: AS1-8 and BS 6-2 which were selected to use in this study and were identified molecularly by comparing nucleotide sequence of D1/D2 of 26S rDNA gene. Four culture media were used to culture the yeasts: potato dextrose broth (PDB), Czapek dox broth, cornmeal and black lentil (*Vigna mungo* L.) meal.

2.2 Yeast culture and sample preparation: The isolate of AS1-8 and BS6-2 were originally recovered from samples of coastal sand sediment collected at Ang Sila (13° 20' 21.08" N, 100° 55' 27.28" E) and seawater at Bangsaen beach (13° 16' 56.82" N, 100° 54' 54.42" E), Chonburi Province, Thailand, respectively, and held within the yeast collection maintained at Microbiology laboratory, the Institute of Marine Science, Burapha University, Thailand under the accession code AS1-8 and BS 6-2. For the current study, the yeasts were cultured in PDB, Czapek dox, cornmeal and black lentil meal media, and cell density of the 24h inoculum was  $3 \times 10^8$  cells/ml (viable count). Each medium was inoculated by 2 ml inoculums/250 ml medium in 1000 ml flasks and reciprocal shaken at 30° C. Cell mass of each isolate in each medium was collected



by centrifugation at 8000 rpm, 4°C, for 5 min and cell pellet was washed twice with 0.85% NaCl and then subjected to a second round of centrifugation under the same conditions. After decanting the supernatant, the pellet was allowed to dry at 60°C for 18 h.

## 2.3 Crude Fat and crude protein analysis

### 2.3.1 Crude fat

Crude fat in the sample was determined by Soxtec™ Systems<sup>[7]</sup>. Approximately 1 g of sample was wrapped in filter paper, placed in fat free thimble and then introduced in the extraction tube. Weighed, cleaned and dried the receiving cup was filled with petroleum ether and fitted into the apparatus. Turned on water and heater to start extraction. (1-2 hr) Transferred the cup into drying oven at 103°C for 1/2 hr. The cup was cooled in a desiccator and weighed.

### 2.3.2 Crude protein

Protein in the sample was determined by Kjeldahl method. The samples were digested by heating with concentrated sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in the presence of digestion mixture. The mixture was then made alkaline. Ammonium sulphate thus formed, released ammonia which was collected in 4% boric acid solution and titrated against standard 0.1 N HCl. Total protein was calculated by multiplying the amount of nitrogen with appropriate factor (6.25) and the amount of protein was calculated.

## 2.4 Fatty acid analysis

Fatty acids were analysis according to Christie,2003<sup>[8]</sup>. Once dried, 0.1 g from AS1-8 and BS6-2 were ultra-sonicated in 20 ml ice-cold chloroform:methanol (2:1, v/v) containing 0.1 % butylated hydroxytoluene for 20 min before the liquid fraction was transferred to a separating funnel. The residual matter was then subjected to a second round of extraction after which the liquid portion was transferred to the separating funnel. To separate the non-lipid phase, 0.88% (w/w) KCl (approx. 25% of the total sample volume) was then added to the separating funnel, agitated to mix the contents, and then left until the solution separated into two layers. Total lipid was obtained by filtering the lower layer through anhydrous sodium sulfate before evaporating the collected fraction. Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared from the total lipid by subjecting samples to acid-catalysed transesterification by adding 1% sulphuric acid and then incubating them at 50°C for 16 h. Gas-liquid chromatography (Agilent Technologies GC7820A, USA) was then used to determine the FAME, with individual FAMES being identified by comparison to known standards (Supelco 37-Component FAME Mix Supelco, USA). The FAMES were split injected through a wall-coated capillary column (HP-Innowax column, 30 m × 0.25 mm id, 0.25 µm film thickness (Agilent J&W, USA) and detected via a flame ionization detector (FID).

Helium gas was used as the carrier at a constant flow rate of 1.2 ml min<sup>-1</sup>. The temperature program used was an initial 150°C for 0.5 min, increasing to 170°C at a rate of 5°C min<sup>-1</sup>, hold at 170°C for 10 min, then increasing to 190°C at a rate of 3°C min<sup>-1</sup>, and, then hold at 190°C for 28 min. Temperatures at the injection and detection ports were 230°C and 250°C respectively.

## 2.5 Statistical analysis

All data are presented as the mean  $\pm$  S.D.

## RESULTS

By comparing the nucleotide sequence of D1/D2 of 26S rDNA gene of the isolate AS1-8 and BS6-2 with the data base in GenBank, AS1-8 was closest to *Rhodotorula mucilaginosa* with 99% similarity and BS6-2 was closest to *Pichia jadinii* with 99.101 % similarity. When cultured the yeasts in various media, it was found that amount of protein and crude fat accumulated in cells were different. *R. mucilaginosa* AS1-8 could accumulate highest amount of protein when was cultured in black lentil meal (50.56 $\pm$ 0.19), whereas crude fat was highest accumulated when was cultured in cornmeal (5.16 $\pm$ 0.01) as shown in Table 1.

**Table 1 Percentage of crude protein and crude fat of *Rhodotorula mucilaginosa* AS1-8 when cultured in various media.**

NA= Not applicable as the yeast grew very slowly and scarce.

Medium	As1-8		
	%Protein	%Fat	% Ash
	mean $\pm$ SD	mean $\pm$ SD	mean $\pm$ SD
PDB	40.41 $\pm$ 0.57	1.91 $\pm$ 0.17	1.11 $\pm$ 0.01
Cornmeal	14.57 $\pm$ 0.09	5.16 $\pm$ 0.01	3.73 $\pm$ 0.08
Czapek Dox	NA	NA	NA
Black lentil	50.56 $\pm$ 0.19	2.32 $\pm$ 0.43	1.04 $\pm$ 0.03

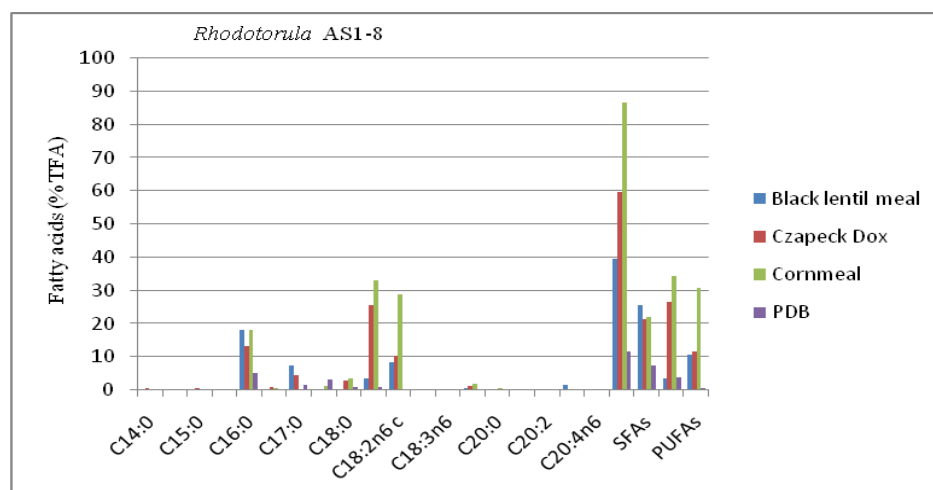
The yeast isolate BS6-2 which was identified *Pichia* sp., protein was moderately high accumulated in cells when was cultured in PDB and black lentil meal(41.53 $\pm$  0.04 and 41.91 $\pm$ 0.43, respectively). Interestingly, fat was accumulated in high percentage in cells when cornmeal medium was used in both *Pichia* BS6-2 and *Rhodotorula mucilaginosa* AS1-8 (5.16 $\pm$ 0.01 and 7.78 $\pm$ 0.28, respectively) as shown in Table1 and Table 2.

Table 1 Percentage of crude protein and crude fat of *Rhodotorula mucilaginosa*

Table 2. Percentage of crude protein and crude fat of *Pichia* BS6-2.

medium	BS6-2		
	%Protein	%Fat	%Ash
	mean±SD	mean±SD	mean±SD
PDB	41.53±0.04	0.34±0.01	6.83±0.16
Cornmeal	14.51±0.18	7.78±0.28	0.53±0.06
Czapek Dox	29.69±0.18	0.17±0.01	8.20±0.25
Black lentil	NA	NA	NA

When dried cells of the yeast *R. mucilaginosa* AS1-8 and *Pichia* BS6-2 were continued to study fatty acid profiles, the results from the analysis of gas-liquid chromatography were shown in Figure 1 and Figure 2. *R. mucilaginosa* AS1-8 is an oleaginous yeast but not the *Pichia* BS6-2. When cultured in cornmeal broth *R. mucilaginosa* AS1-8 accumulated the highest C18:2n6, 19.15 ±0.45 %TFAs(total fatty acids), whereas C18:3n3 was accumulated in lesser amount, 1.27 ± 0.14 % TFAs.

Figure 1 Fatty acid composition of *Rhodotorula mucilaginosa* AS1-8, express as percentage of total fatty acids-%TFAs, when cultured in various media.

Although the non-oleaginous yeast *Pichia* BS6-2 could accumulate in total more amount of SFAs; C18:2n6 and C18:3n3 were accumulated less than those from *R. mucilaginosa* A1-8, and Czapek Dox was suitable medium for these essential fatty acids accumulation, Fig 1 and Fig 2. Meanwhile, in both genera of yeasts, some other fatty acids from C12-C20 were scarcely detected and some were none when cultured in some media.

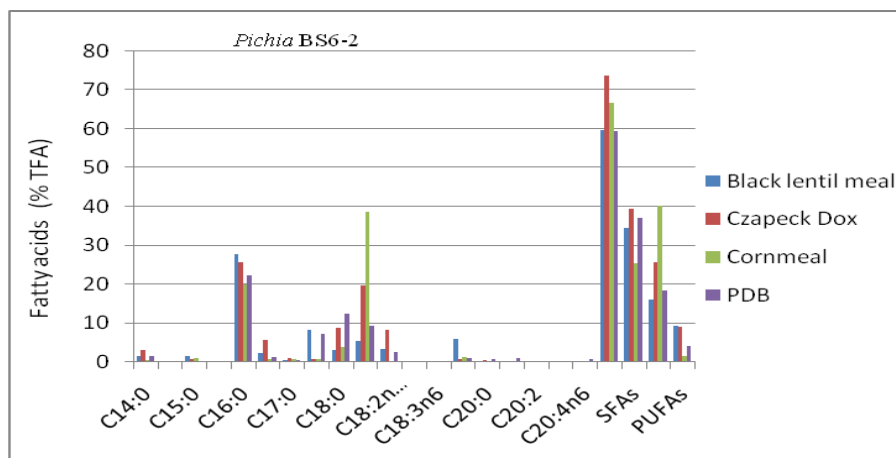


Figure 2 Fatty acid profiles of *Pichia* BS6-2 when cultured in various media.

---

## DISCUSSIONS

---

It was clearly shown that protein, fat, and fatty acid composition accumulated in cells of *R. mucilaginosa* AS1-8 and *Pichia* BS6-2 varied according to the source of nutrition. In this current study, although both genera we investigated here lacked of the high-value nutritional oils such as docosahexaenoic acid (DHA-C22:6n3), eicosapentaenoic acid (EPA-C20:5n3), gamma linolenic acid (GLA-C18:3n6) and arachidonic acid (ARA) still we found that both genera, *R. mucilaginosa* AS1-8 and *Pichia* BS6-2 accumulated essential fatty acids, ***α*-linolenic acid** or ALA (18:3n-3) and **linoleic acid** or LA (18:2n-6) and each genus of yeast accumulated different amount of these high-value fatty acids according to the culture medium. These essential fatty acids form the starting point or are precursors for the creation of longer and more desaturated fatty acids, which are also referred to as long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA). It is generally known that human and animals can not synthesis these essential fatty acid and these have to be derived from diet, so these yeasts are still useful for marine animals feeds as both genera accumulate high amount of protein, especially when culture in PDB or black lentil meal. Anyways, other conditions such as temperature and the ratio of C/N in culture medium should be investigated further when scale up<sup>[12]</sup>.

It has been reported that astaxanthin, a carotenoid compound, has a wide range of pharmacological properties including antioxidant and antimicrobial activity and

reducing risk of certain cancers and cardiovascular diseases [9,10,11]. Apart of protein, fat, B-vitamins that are great benefit for feed in marine aquaculture, like

other species of *Rhodotorula*, *R. mucilaginosa* AS1-8 in this current study has carotenoid accumulated in cells as well which would be a good characteristic for further study.

### Acknowledgments

The funding provided from the National Research Council of Thailand through Burapha University , project No 2558A 10803041, was gratefully acknowledged.

## REFERENCES

---

(1) Leathers TD & Gupta SC (1997) Xylitol and riboflavin accumulation in xylose-grown cultures of *Pichia guilliermondii*. Appl Microbiol Biotechnol 47: 58–61.

(2) Connell L, Redman R, Craig S, Scorzetti

G, Iszard M & Rodriguez R (2008) Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. Microbiol Ecol 56: 448–59.

(3) Kathiresan K, Saravanakumar K & Senthilraja P (2011) Bio-ethanol production by marine yeasts isolated from coastal mangrove sediment. Int Multidiscip Res J 1: 19–24

(4) Katre G, Joshi C, Khot M, Zinjarde S & Ravikumar A (2012) Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. AMB Express 2: 36.

(5) Li M, Liu G-L, Chi Z & Chi Z-M (2010b) Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. Biomass Bioenergy 34: 101–07.

(6) Wang L, Chi Z, Wang X, Ju L, Chi Z & Guo N (2008) Isolation and characterization of *Candida membranifaciens* subsp. *flavinogenie* W14-3, a novel riboflavin-producing

marine yeast. Microbiol Res 163: 255–66.

(7) AOAC, 2003. Official methods of analysis of the association of official's analytical chemists, 17<sup>th</sup> edn. Association of official analytical chemists, Arlington, Virginia

(8) Christie, W W. Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural

Analysis of Lipids. 3rd editions. 2003; The Oily Press, Bridgewater, UK. 416.

(9) Higuera-Ciajara I, Felix-Valenzuela L & Goycoolea FM (2006) Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. Crit Rev Food Sci Nutr 46: 185–96

- (10) Neuman I, Nahum H & Ben-Amotz A (1999) Prevention of exercise-induced asthma by a natural isomer mixture of beta-carotene. *Ann Allergy Asthma Immunol* 82: 549–53.
- (11) Ushakumari UN, Ramanujan R. Isolation of astaxanthin from marine yeast and study of its pharmacological activity. *Intl Curr Pharmaceu J.* 2013 Feb 2:(3) 67-69
- (12) Saxena V, Sharmmmmma CD, BhagatSD, Saini VS, Adhikari DK. Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *J of the American Oil Chemists' Society.* 1998; 25: 501-05

2. Proceedings ในการประชุม Burapha University International Conference, 2015

## Distribution of Actinomycetes in Thai Mangrove Sediments

Rattanaporn Srivibool<sup>a,1</sup>, Rawiwan Watanadilok<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand*

### Abstract

Mangrove forest ecosystems are rich in microorganisms including actinomycetes. In this study, 24 sediment samples were collected from mangrove areas in Nakorn Si-Thammarat, Chumporn and Rayong provinces on the east coast and west coast of the Gulf of Thailand. Actinomycetes were isolated by several selective media, then were characterized and screened for antimicrobial and antioxidant activities. Actinomycetes were recovered in total 83 isolates from the 3 provinces, 55 from Nakorn Si-Thammarat, 16 from Chumporn and 12 from Rayong mangrove sediments. The actinomycetes recovered from Nakorn Si-Thamarat mangrove were rather diverse in different family, which were mainly *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Streptoalloteichus* and some unidentified genera; where as those found from Rayong and Chumporn mangroves were rather diverse mainly in same family in Actinoplanetes: *Virgisporangium*, *Micromonospora*, *Salinispora* and *Spirilliplanes* in which the colonies are small and in orange, brown or black which could differentiate to each other by chemotaxonomy and morphology studies. Although in Rayong and Chumporn mangrove areas did not obtain many anti-microbial producing strains as those obtained from Nakorn Si-Thammarat, we believed that by other method of antimicrobial investigation more antimicrobial producing strains would be found. Antioxidant activity by selected isolates from all areas reveal actinomycetes recovered from mangrove areas are potential source of lead antioxidant compounds.

© 2015 Published by Burapha University.

*Keywords:* Actinomycetes; mangrove sediments; antioxidant; antimicrobial

### Introduction

Actinomycetes, gram positive bacteria with high G+C content, occur widely in both terrestrial and aquatic environments; many species are saprophytic and are important in soil ecology [Zhao et al., 2004]. As other soil microbes in sediment, actinomycetes play an important role in organic matters decomposition and mineral recycling. Importantly, they have contributed a wide range of biologically active compounds, notably antibiotics

\* Corresponding author. Tel.: +66-38-391-671; fax: +66-38-391-674.

E-mail address: rattanap@buu.ac.th.

for clinical use and as therapeutic agents. Of the 3000+ microbial products possessing some biological activity as listed by the Antibiotic Literature Database (ABL) - BioResearch Italia Database, the greatest contribution are made up of those isolated from actinomycetes [Lazzarini et al., 2000], many of which are from the genus *Streptomyces*. The search for novel actinomycetes and the discovery of new antibiotics for use within the medical industry is driven by the development of resistance among a number of pathogens [Bernan and Grensteun, 2004] and the emergence of new disease conditions [Taylor et al., 2001]. However, over the last few decades, the rate of new compounds being discovered from common, soil-derived actinomycetes has declined and focus has shifted investigating the vast and largely unexplored marine environment. Several studies have indicated that a diverse community of actinomycetes occur within marine sediments, even at considerable depths [Jensen and Lauro, 2008; Maldonado et al., 2005b; Pathomaree et al., 2005; Bredholdt et al., 2007] and that these may provide a new source of novel antibiotic compounds [Fiedler et al., 2005; Hernandez et al., 2004; Hong et al., 2009; Imada, 2005]. The search for novel antibiotics is sustained by the challenges imposed by antibiotic resistant pathogens on human health [Bernan et al., 2004] and by the emergence of new diseases [Taylor et al., 2001]. The purpose of the current study was to conduct a preliminary search for the distribution of actinomycete isolates that have potential antimicrobial producing strains from mangrove sediments collected both sides the Gulf of Thailand and to evaluate their antibiotic and antioxidant activities.

## Materials and Methods

### *Sampling of sample sediments*

Sediment samples were collected from three main mangrove forests both east and west of the Gulf of Thailand in Nakorn Si-Thammarat, Chumporn (n=9, Ban Natung, Ban Nacha-ang, and Park Canal; Rayong (n=8) All sites being along the western and eastern margins of the Gulf of Thailand. From mangrove forest ecological systems connected to the sea, 24 samples were taken and kept in sterile plastic bags. In each case, the sediment sample was taken from the sediment surface close to rhizosphere of plants at the mangrove site with a spatula. The samples were then transferred to the Bangsae Institute of Marine Science (BIMS) for processing and actinomycete isolation.

### *Isolation methods*

Sediment samples were pretreated in two ways: heated for 1 h at 100°C and/or 30 min treated with 1.5% phenol before isolation [Nonomura, 1988; Hayakawa, 1990; Hayakawa, et al., 1991; Hayakawa, 2008]. Each treated substratum sample was processed, diluted with natural sea-water at  $10^{-1}$  and  $10^{-2}$  of 10-fold dilution prior to inoculation on the selected isolation media. The selective media used were: starch casein agar (SCA), actinomycete isolation agar (AIA) and malt extract-yeast extract medium (ISP2) for samples from Nakorn Si-Thammarat- and Rayong-mangrove sediments; and SCA, M4 and humic acid vitamin agar (HV) for samples from Chumporn-mangrove sediments. An equal volume of natural seawater was added to all isolation media. All isolation media were supplemented with 25 µg/mL novobiocin and 50 µg/mL nystatin to prevent the growth of other Gram-negative bacteria and fungi. The isolation plates were then incubated at 30°C and checked at regular intervals over a 4 week period for the appearance of actinomycete colonies. Actinomycete colonies appearing on the plates were subsequently purified and then kept on agar slants for subsequent investigation of antimicrobial and antioxidant activities and also in 20% glycerol which were then stored at -80°C for longer term preservation.

### *Screening of antimicrobial activity*

The antimicrobial activity of all isolates were tested against *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 517, MRSA22 and *Candida albicans* TISTR 5235 provided by Thailand Institute of Scientific and Technological Research, TISTR, using the cross streak technique. The actinomycete isolates were cultured for 4-6 days at one side of the cultured plates before the 18 h test strains, 0.5 McFaland, were perpendicular streaked across by sterile cotton buds and continued incubation for another 24 h period.

### Screening of antioxidant activity

Some pigmented and/or antimicrobial producing isolates were selected to investigate for antioxidant activity. To achieve the amount of secondary bioactive metabolites using, the actinomycetes isolates were cultured in ISP2 medium for at least 3 L at 30° C and shaken at 110 rpm for 7-10 d. After a 7 or 10 day incubation period, the mycelium and culture broth were separated by centrifugation. Actinomycete cultured medium was extracted by ethyl acetate, in separating funnel, shaken for a few minutes, and then the solvent layers were evaporated under vacuum (Buchi RE111). The crude extracts were then transferred into small vials using sterile Pasteur pipettes and dried with N<sub>2</sub> gas. Antioxidant activities of the components were preliminary investigated by thin layer chromatography technique, by DPPH radical [Alessandra et al., 2002].

### Morphological characteristics

The inclined coverslip technique [Williams et al., 1989] was used to observe the type of spore chains, the aerial and substrate mycelium that were produced by each actinomycete isolate from each sediment sample. Some of the antibiotic producing strains were selected for further examination by scanning electron microscopy to determine the ultrastructure of the spore chain morphology and the ornamentation of the spore surface.

### Chemotaxonomical study

The isomeric forms of diaminopimelic acid (DAP) and diagnostic sugars in whole-cell hydrolysates were determined by thin layer chromatography as described by Lechevalier et al., 1973. The strains were identified to genera according to Williams et al. [1989] and Maldonado et al. [2005a].

## 1. Results and Discussion

Actinomycetes recovered from all areas were obtained in total 83 isolates, 55 from Nakorn Si-Thammarat, 16 from Chumporn and 12 from Rayong mangrove sediments. The mangrove area in Nakorn Si-Thammarat is located some distance in land and the sediments are wet and dry according to the high and low tide each day, anyway the soil sediment is rather fertile with more plant debris and materials than the mangrove in Chumporn and Rayong provinces in which the areas are next to the sea with sandy sediments. Actinomycetes found from Nakorn Si-Thammarat mangrove were diverse in Family and genera and *Streptomyces* were dominant, whereas those found in Chumporn and Rayong mangroves were mainly in Family *Micromonosporaceae* (Table 1).

Identification into genera of the recovered isolates were done by morphological study and chemical analysis of cell wall DAP, including sugar pattern in whole-cell hydrolysates (Fig 1). In this study in land mangrove area was inhabitant of some other rare actinomycete genera such as *Thermoactinomyces*, *Micromonospora*, *Nocardioidia*, *Nocardiopsis*, *Streptoalloteichus* and some unidentified genera whereas the outer mangroves which connect to the sea less *Streptomyces* and many genera in Family *Micromonosporaceae* were found. In Chumporn mangrove, 2 isolates of potentially antibiotic producing *Streptomyces* were found among the rare actinomycetes, whereas all isolates recovered from Rayong mangrove were members of the Family *Micromonosporaceae*, but rather diverse in genera anyway (Table 1).

Out of 55 isolates recovered from Nakorn Si-Thammarat mangrove, 27 isolates were antimicrobial producing strains, mostly to gram positive bacteria, 4 isolates to both gram positive bacteria and *C. albicans* and 4 isolates to only *Candida albicans* (Table 2). On the other hand, those recovered from Chumporn and Rayong mangrove sediments rarely produced antimicrobial substances by cross streak investigation which might be the active metabolites were not water soluble or were still inside cell membranes.

Table 1. Some morphological and chemical studies of representative isolates recovered from all areas. (Williams, et al., 1989 and Maldonado, et al., 2005a)



• Isolate ID	• Aerial mycelium	• Substrate mycelium	• DAP type	• Sugar Pattern	• Identified
• NS1-2	• W	• Bn	• <i>Meso-DAP</i>	• -	• <i>Thermoactinomyces</i>
• NS1-4	• Gy	• LO	•	• Ara, Gal	• Unidentified
• NS1-5	• W	• Bn	• <i>Meso-DAP</i>	• -	• <i>Thermoactinomyces</i>
• NS1-6	• none	• DBn	• <i>Meso-DAP</i>	• -	• <i>Micromonospora</i>
• NS1-7	• none	• C	• <i>Meso-DAP</i>	• Xyl, Ara	• <i>Micromonospora</i>
• NS2-2	• W	• Bn	• <i>Meso-DAP</i>	• -	• <i>Nocardiopsis</i>
• NS2-3	• Gy	• Bn	•	• -	• <i>Streptomyces</i>
• NS2-5	• Gy	• Bn	• <i>LL-DAP</i>	• -	• <i>Streptomyces</i>
•	•	•	•	•	•
• NS3-1	• W	• DBn	• <i>Meso-DAP</i>	• Rhm, Man, Gal	• <i>Streptoalloteichus</i>
• NS3-2	• W	• YBn	• <i>LL-DAP</i>	• Gal	• <i>Streptomyces</i>
• NS3-3	• W	• YBn	• <i>LL-DAP</i>	• -	• <i>Streptomyces</i>
• NS3-5	• W->Gy	• BnBk	• <i>LL-DAP</i>	• -	• <i>Streptomyces</i>
• NS3-7	• W->Gy	• YBn	• <i>LL-DAP</i>	• -	• <i>Streptomyces</i>
• NS3-8	• W	• PkBn	• <i>Meso-DAP</i>	• -	• <i>Nocardiopsis</i>
• NS3-9	• W	• C	• <i>Meso-DAP</i>	• Ara, Gal	• <i>Nocardia</i>
• NS3-10	• W	• PkBn	• <i>LL-DAP</i>	• -	• <i>Streptomyces</i>
• NS3-11	• W	• Bn	• <i>Meso-DAP</i>	• -	• <i>Thermoactinomyces</i>
• NS3-12	• none	• Bn	• <i>Meso-DAP</i>	• Xyl, Ara	• <i>Micromonospora</i>
• NS4-1	• WBn	• LY	• <i>LL-DAP</i>	• -	• <i>Streptomyces</i>
• NS4-2	• W	• PkBn	• <i>Meso-DAP</i>	• Gal, Man, Rhm	• <i>Streptoalloteichus</i>
• NS4-4	• Gy	• WGy	• <i>LL-DAP</i>	• Gal, Man	• <i>Streptomyces</i>
• NS4-6	• W->BnGy	• Bn	• <i>LL-DAP</i>	• Gal	• <i>Streptomyces</i>
• NS4-8	• Gy	• Gy	• <i>LL-DAP</i>	• -	• <i>Streptomyces</i>
• NS5-1	• LGy	• Bn	• <i>LL-DAP</i>	• -	• <i>Streptomyces</i>

Table 1. (continued)

• Isolate ID	• Aerial mycelium	• Substrate mycelium	• DAP type	• Sugar Pattern	• Identified
• NS5-3	• LGy	• Bn	• LL-DAP	-	• <i>Streptomyces</i>
• NS5-4	• WBn	• Bn	• LL-DAP	Gal	• <i>Streptomyces</i>
• NS6-2	• LGy	• YBn	• LL-DAP	-	• <i>Streptomyces</i>
• CP2-2	• none	• O	• Meso-DAP	Xyl, Ara, Gal	• <i>Salinispora</i>
• CP3-1	• none	• LO	• Meso-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	• <i>Virgisporangium</i>
• CP-PH3-2	• none	• O	• Meso-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	• <i>Virgisporangium</i>
• CP-PH3-9	• none	• BkO	• Meso-DAP	Xyl, Ara	• <i>Micromonospora</i>
• CP-PH3-12	• none	• BkO	• Meso-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	• <i>Virgisporangium</i>
• CP-PH3-13	• none	• LO	• Meso-DAP	Xyl, Ara, Man, Gal	• <i>Salinispora</i>
• CP-PH3-22	• none	• O	• Meso-DAP	Xyl, Ara	• <i>Micromonospora</i>
• CP8-4 A	• Bn	• Bn	• LL-DAP	-	• <i>Streptomyces</i>
• RY2-20	• none	• LBn	• Meso-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	• <i>Virgisporangium</i>
• RY2-22	• none	• LBn	• Meso-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	• <i>Virgisporangium</i>
• RY2-24	• none	• OBn	• Meso-DAP	Xyl, Ara	• <i>Micromonospora</i>
• RY2-25	• none	• OBn	• Meso-DAP	Xyl, Ara, Rhm, Gal, Man	• <i>Virgisporangium</i>
• RY3-32	• none	• Bk	• Meso-DAP	Ara, Gal, Xyl	• <i>Salinispora</i>
• RY3-37	• none	• BkBn	• Meso-DAP	Gal, Xyl	• <i>Spirilliplanes</i>
• RY7-8	• none	• OBn	• Meso-DAP	Gal, Xyl	• <i>Spirilliplanes</i>
• RY8-3	• none	• OBn	• Meso-DAP	Gal, Xyl	• <i>Spirilliplanes</i>
• RY8-8	• none	• OBn	• Meso-DAP	Gal, Xyl	• <i>Spirilliplanes</i>

Note: NS = Nakorn Si-Thamarat; CP = Chumporn; RY = Rayong; Ara = arabinose; Gal = Galactose; Man = Mannose; Rhm = Rhamnose; Xyl = Xylose; Bk = black; BkBn = blackish brown; BkO = blackish orange; Bn = brown; BnGy = brownish gray; C = cream; DBn = dark brown; Gy = gray; LGy = light gray; LO = light orange; LY = light yellow; O = orange; OBn = orange brown; PkBn = pinkish brown; W = white; WGy = whitish gray; YBn = yellow brown.

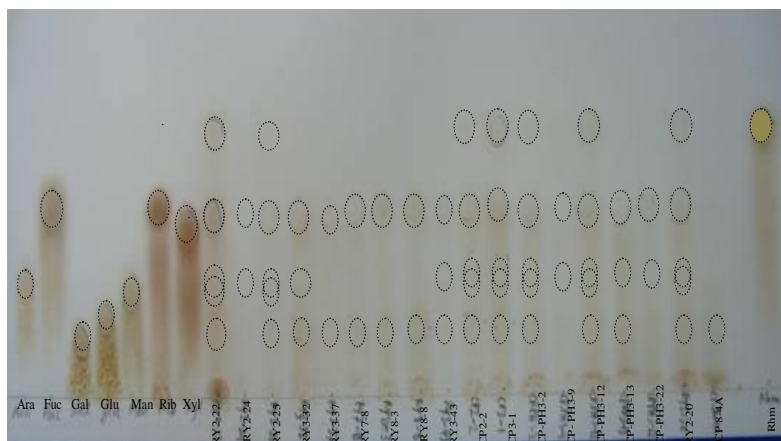


Fig 1. Chromatogram showed the diagnostic sugar pattern in some of isolates recovered from Rayong and Chumporn mangroves.

Table 2. Antimicrobial and antioxidant activities ( $IC_{50}$ ) in some of the isolates recovered from Nakhon SI- Thammarat, Chumporn and Rayong mangroves.

Isolate ID	Color of spore mass	Color of substrate	Antibiosis to (Distance of inhibition zone, mm)				$IC_{50}$ DPPH scavenging ( $\mu g/mL$ )
			<i>B. subtilis</i>	MRSA21	MRSA22	<i>C. albicans</i>	
NS1-2	C	RO	15.0	5.0	-	-	NA
NS1-4	Gy	O	26.0	22.0	15.0		NA
NS1-5	W	Bn	12.0	-	-	-	NA
NS1-9	Gy	Y	20.0	-	-	-	NA
NS2-2	W	Bn	-	5.0	3.0	-	337.3 $\pm$ 34.2
NS2-3	Gy	Bn	-	5.0	3.0	-	56.6 $\pm$ 0.4
NS2-5	Gy	Bn	5.0	5.0	5.0	-	64.8 $\pm$ 1.2
NS3-1	W	DY	20.0	-	20.0	-	>400
NS3-2	W	Y	22.0	-	16.0	-	>400
NS3-3	W	YBn	30.0	-	-	5.0	NA
NS3-5	BkBn	YBn	-	-	-	28.0	NA
NS3-7	Gy	YBn	-	-	-	2.0	>400
NS3-8	W	P	-	-	20.0	-	NA
NS3-9	W	C	15.0	-	-	-	NA
NS3-10	W	PY	-	-	22.0	-	NA
NS4-1	Bn	LY	-	-	-	28.0	NA
NS4-4	Gy	WGy	15.0	-	-	12.0	>400
NS4-6	W...>BnGy	Bn	20.0	15.0	10.0	2.0	329.9 $\pm$ 57.5
NS5-1	Bn	Bn					>400
NS5-3	WGy	Bn	19.0	15.0	-	-	190.3 $\pm$ 5.9
NS5-4	LBn	Bn	32.0	20.0	-	-	>400
NS6-2	Gy	YBn	-	-	-	3.0	>400
CP-PH3-2	none	O	-	-	-	-	133.1 $\pm$ 4.0
CP-PH3-9	none	BkO	-	-	-	-	329.9 $\pm$ 7.9
CP8-4A	Bn	Bn	15.0	13.0	13.0	8.0	>400
RY2-20	none	LBn	-	-	-	-	294.23 $\pm$ 7
Ascorbic							2.8 $\pm$ 0.11

Note: - = inactive; NA = Not applicable; NS = Nakorn Si Thammarat; Bn = brown; Bk = black; BkBn = blackish brown; BkO = blackish orange; BnGy= brownish gray; C = cream; DY = dark yellow; Gy = gray; LY = light yellow; LBn= light brown; O = orange; P= pink; PY = pinkish yellow; RO = red orange; W = white; WGy= whitish gray; YBn = yellow brown;.

The DPPH radical scavenging assay is commonly employed in evaluating the ability of antioxidants to scavenge free radicals. The more rapidly the absorbance decreases, the more potent the antioxidant activity of the extract due to its hydrogen atom donating ability. Among the isolated of actinomycetes were screened for antioxidant activity using 1,1, diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) stable radical scavenging. The ethyl acetate extracts of NS2-3 and NS2-5 exhibited strong DPPH radical scavenging activity at the IC<sub>50</sub> value of 56.6±0.4 and 64.8±1.2 µg/mL, respectively. The extracts of CP-PH3-2 and NS5-3 showed good antioxidant activity whereas the five extracts of NS2-2, NS4-6, CP-PH3-9, CP-PH3-13 and RY2-20 were less active. However, the scavenging activity of extracts was less than that of standard ascorbic acid (IC<sub>50</sub> 2.8±0.11 µg/mL). The result of this study indicated that the crude extracts have the proton-donating ability and they are potential source for isolation of lead antioxidant compounds to reduce free radical induced tissue injury.

It has been estimated that the actinobacteria usually found only a small fraction of the bacteria flora in the marine [Goodfellow and Williams, 1985], but consequently, it was found up to 9% in marine sediments [Bull et al., 2005]. In this finding, more different genera and more diverse of actinomycete morphology were found in the inland mangrove sediments than those found in marine sediments. There was convincing evidence that actinomycetes were adapted to marine habitats [Moran, et al., 1995; Mincer et al., 2002]. From our finding, in marine sediments, *Streptomyces* were scarce whereas members of *Micromonosporaceae* were abundant and often found. Although the isolates in member of *Micromonosporaceae* did not show the ability of antimicrobial metabolites by cross streak, other methods of investigation are necessary as many reports found novel active compounds from this group of actinomycetes [Romero, et al., 1997; Fiedler et al., 2008, Williams, et al., 2005 and Jensen et al, 2007]. However, these results revealed that Thai mangrove sediments are a good source to search for both active antimicrobial and antioxidant compounds from both rare and non-rare species.

### Acknowledgements

This work was supported by the Research Grant of Burapha University through Nation Research Council of Thailand (Grant no. 2557A10803041 and 2556A10801006).

### References

- Alessandra, B., Chandra, S., Matteo, P., Lvano, M., Jeannete, M., 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*, *Journal of Ethnopharmacology* 79, p. 379.
- Bull, A.T., Stach, J. E., Ward, A. C. and Goodfellow, M. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions, *Antonie van Leeuwenhoek* 87, p. 65.
- Bernan, V.S., Grensteun, M., Carter, G.T., 2004. Mining marine microorganisms as a source of new antimicrobial and antifungals, *Current Medical Chemical-Anti-Infective Agents* 3, p.18.
- Bredholdt, H., Galatenko, O.A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L.P., Zotchev, S.B., 2007. Rare actinomycetes bacteria from the shallow water sediments from of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity, *Environmental Microbiology* 9, p. 2756.
- Fiedler, H.P., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C., Mihm, G., 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek* 87, p.37.
- Goodfellow, M., and Williams, S. T. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 37, p. 189.
- Hayakawa, M., 1990. Studies on selective isolation methods and distribution of soil Actinomycetes, *Actinomycetology* 4, p. 103.
- Hayakawa, M., Tamura, T., Nonomura, H., 1991. Selective isolation of *Actinoplanes* and *Dactylosporangium* from soil by using  $\gamma$ -collidine as the chemoattractant, *Journal Ferment Bioengineering* 72, p. 426.
- Hayakawa, M., 2008. Studies on the isolation of rare actinomycetes in soil, *Actinomycetol* 22, p. 12-19.
- Hernandez, I.L.C., Macedo, M.L., Berlinck, R.G.S., Ferreira, A.G., Godinho, M.J.L., 2004. Dipeptide metabolites from the marine derived bacterium *Streptomyces acrymicini*, *Journal of The Brazillian Chemical Society* 1, p.

- 441.
- Hong, K., Gao, A-H., Xie, Q-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H-P., Yu, H-P. , Yao, S-H., Goodfellow, M., Ruan, J-S., 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China, *Marine Drugs* 7, p. 24.
- Imada, C., 2005. Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes, *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, p. 59.
- Jensen, P.R., Williams, P.G., Oh, D.C., Zeigler, L., Fenical, W. 2007. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*, *Journal of Applied Environmental Microbiology* 73, p. 1146
- Jensen, P.R., Lauro, F.M., 2008. An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment, *Antonie van Leeuwenhoek* 94, p. 51.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., Marinelli, F., 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics, *Antonie van Leeuwenhoek* 78, p. 399.
- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H., Horan, A.C., 1973. Chemical characteristic and classifications of Nocardiae, *Canadian Journal of Microbiology* 19, p. 965.
- Maldonado, L.A., Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Mincer, T. J., Ward, A. C., Bull, A. T., Goodfellow, M. 2005a. *Salinispora arenicola* gen. Nov., sp. Nov. And *Salinispora tropica* sp. Nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, p 1759.
- Maldonado, L.A., Stach, J.E.M., Pathomaree, W., Ward, A.C., Bull, A.T., Goodfellow, M., 2005b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments, *Antonie van Leeuwenhoek* 87, p. 11.
- Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2002. Widespread and persistent population of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Journal of Applied Environmental Microbiology* 68, p. 5005.
- Moran, M.A., Rutherford, L. T., Hodson, R. E. 1995. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Journal of Applied Environmental Microbiology* 6, p. 3695.
- Nonomura, H., Hayakawa, M., 1988. New methods of the selective isolation of soil Actinomycetes. In: Y. Okami, T. Beppu, H. Ogawara, *Biology of Actinomycetes '88* ed. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p. 288.
- Pathomaree, W., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., Goodfellow, M., 2005. Diversity of actinomycetes isolated from the challenger deep sediment (10898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* 10, p. 181.
- Romero, F., Espliego, F., Bas, J. P., Quesada, T. G., Gravalos, D., Calle, F., Fernandez-Puentes, J. L. 1997. Thiocoralline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*, *Journal of Antibiotics* 50, p.734.
- Taylor, L.H., Latham S.M., Woodhouse, M.E.J., 2001. Risk factors from human disease emergence, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 356, p. 983.
- Williams, S.T., Sharpe, M.E., Holt, J.G., (eds), 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4, Williams & Wilkins, Baltimore, P. 2333.
- Williams, P.G., Buchanan, G.O., Feling, R.H., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2005. New cytotoxic salinosporamides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*, *Journal of Organic Chemistry*, 70, p. 6196.
- Zhao, H. Y., Kassama, M., Young, D. B. Kell, R. G., 2004. Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique, *Applied and Environmental Microbiology* 70, p. 6619.

3. การมีส่วนร่วมในการผลิตบัณฑิต ในระดับปริญญาตรีและการถ่ายทอดเทคโนโลยีแก่อาจารย์รุ่นเยาว์ นักนักศึกษา (หัวหน้าโครงการวิจัย นางสาวรัตนารมณี ศรีวิบูลย์ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา/ ให้การฝึกงาน หรือฝึกอบรม)

โครงการวิจัย มีส่วนช่วยเหลือสนับสนุนในการทำปัญหาพิเศษ นิสิตระดับปริญญาตรี 6 คน จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา คือ

1. นางสาวนุจรินทร์ นารินคำ
2. นางสาวกัญญาณัฐ เกิดทรง

ในปีการศึกษา 2555-2556 โดยทำปัญหาพิเศษเรื่อง การศึกษาสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีท

3. นางสาว สุกานดา แก้วนันทะ และ
4. นางสาว จุฑานันท์ มโนสา

ในปีการศึกษา 2556 โดยทำปัญหาพิเศษเรื่อง .ศักยภาพการผลิตเครื่องดื่มอัลกอฮอล์จากกล้วยหอม โดยยีสต์ *Pichia* สายพันธุ์ BS 6-2

3. นางสาววิภา เมืองนา
4. นางสาว วิจิตรา แสนเทพ

ในปีการศึกษา 2557 โดยทำปัญหาพิเศษเรื่อง ผลของรังสีอัลตราไวโอเล็ต ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพของแบคทีเรียแอกติโนมัยซีท

และโครงการวิจัย มีส่วนช่วยเหลือสนับสนุนในการฝึกงานปฏิบัติการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล จำนวน 8 คน คือ

1. นายยศกร กาแดง นักศึกษา จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. นายธนโชติ ตันทิทรัพย์ นักศึกษา จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(ช่วงเวลาฝึกงาน 18 มีนาคม 17 พฤษภาคม 2556)

1. นางสาวตรีสุคนธ์ มะลิ นิสิตระดับปริญญาตรีจากคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

(ช่วงเวลาฝึกงาน 19 สิงหาคม 13 ธันวาคม 2556)

2. นางสาวสุนิสา ขาดิวรรณ นักศึกษาระดับปริญญาตรีจากคณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม (ช่วงเวลาฝึกงาน 22 เมษายน-10 กรกฎาคม 2557)

3. นายชนันต์ กลั่นประเสริฐ นักศึกษาระดับปริญญาตรีจากคณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม (ช่วงเวลาฝึกงาน 22 เมษายน-10 กรกฎาคม 2557)

4. นายทรงพล จำดิษฐ์ อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรวิทยาดงขี้เหล็ก ( 28 กรกฎาคม- 8 สิงหาคม 2557)
5. Ms Alma Lidman Bring จาก Karolinska Institutet, ประเทศ Sweden (October 7- November 8, 2013)
6. นายสุรวัฒน์ จันทร์สุวรรณ นิสิตระดับปริญญาตรีจากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (ช่วงเวลาฝึกงาน 1 มิถุนายน-31 กรกฎาคม 2558)

#### 4.รายงานการเงิน

จำนวนเงินที่ได้รับ	รายรับ
งวดที่ 1 (50%)	337,500 บาท เมื่อวันที่ 27 พฤศจิกายน 2557
งวดที่ 2 (40%)	270,000 บาท เมื่อวันที่ 20 พฤษภาคม 2558
	รวม 607,500 บาท

#### รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1.ค่าตอบแทน	162,500	162,360	เหลือ 140
2. ค่าใช้สอย	*(334,600) 179,600	183,290.8	เกิน 3690.8
3. ค่าวัสดุ	175,900	172,829.65	เหลือ 3070.35
4.ค่าสาธารณูปโภคต่าง ๆ	2,000	2,000	-
5.ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6.ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ เช่น ค่าบริการซ่อม คอมพิวเตอร์ ของ CDค่าล้างไวรัส ค่าซ่อมพริ้นเตอร์ หนังสือ, ค่าสอบเทียบ pipette, eye piece micrometer	(รวมอยู่ในวัสดุสำนักงานและวัสดุคอมพิวเตอร์)		
รวม	520,000 บาท	520,480.45 บาท	480.45 บาท

หมายเหตุ \*เงินคงเหลือในหมวดค่าใช้จ่าย จำนวน 155,000 บาท ได้มอบให้ ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย ใ้บริหารจัดการกิจกรรมที่ยังไม่\*เกิดขึ้น คือ 1 การจัดบรรยายเชิงปฏิบัติการ 1 ครั้ง (25,000 บาท) 2. การไปสัมมนาวิชาการของผู้ร่วมวิจัย (50,000 บาท) 3. การฝากเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ TISTR 10 สายพันธุ์ (80,000 บาท)

## ประวัตินักวิจัย และคณะ

### ประวัติผู้วิจัยหลัก

- ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาวรัตนภรณ์ นามสกุล ศรีวิบูลย์  
(ภาษาอังกฤษ) MISS RATTANAPORN SRIVIBOOL
- หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 373 99 00348239
- ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ เงินเดือน 54,940 บาท จำนวนชั่วโมงที่ทำวิจัย 40 ชม./สัปดาห์
- หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง  
จ. ชลบุรี 20131 โทร. 038 391671-3 โทรสาร 038 391674 E-mail: rattanap@buu.ac.th
- ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญา						
ปีที่จบการศึกษา (ตรี โท เอก และ ประกาศนียบัตร	อักษรย่อปริญญา และชื่อเต็ม	สาขา วิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน การศึกษา	ประเทศ	
2520	ปริญญาตรี	วท.บ. วิทยาศาสตร์บัณฑิต	ชีววิทยา	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัย เชียงใหม่	ไทย
2531	ปริญญาโท	วท.ม. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	ชีววิทยา	-	มหาวิทยาลัย เชียงใหม่	ไทย

หมายเหตุ วท.บ. (ชีววิทยา) เน้นหนักจุลชีววิทยา และวิชาโท เคมี  
วท.ม. (ชีววิทยา) เน้นหนักจุลชีวเทคโนโลยี

- สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา  
สาขาวิชาเคมีและชีวเคมี
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

### ประสบการณ์การทำงานวิจัยในต่างประเทศ:

Development of thermotolerant rare actinomycetes for valuable substances

(16S rRNA gene sequencing) . ( 1 เดือนครึ่ง -2 เดือน)

2001, 2002, 2003

ประเทศญี่ปุ่น

(16S rRNA gene sequencing และ DNA-DNA hybridization) (1 เดือนครึ่ง)

2005

ประเทศญี่ปุ่น

Isolation , molecular taxonomical study of rare actinobacteria from marine sediments and



unravelling of their potential antibiotic substances (4 เดือน)		2008	ประเทศนอร์เวย์.	
Characteristics and function of rice wine made with marine yeasts isolated in Thailand (15 วัน)		2009	ประเทศญี่ปุ่น	
7.1 เป็นผู้อำนวยการโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย		ปีที่ได้รับทุน	แหล่งทุน	
แผนงานวิจัย: อาหารทะเลปลอดสารพิษ		2550-51	งบประมาณ	
แผ่นดิน				
7.2 เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย				
- โครงการวิจัย	การค้นหาแอคติโนมัยซีทที่ทนอุณหภูมิสูงจากระบบนิเวศชายฝั่งที่สามารถสร้างเอ็นไซม์ ที่ทนอุณหภูมิสูง	2546	งบประมาณของหน่วยงาน	
-โครงการวิจัย:	จุลินทรีย์ทะเล ทางเลือกใหม่ของการผลิตกรด ไนมันไม่อิ่มตัว	ผู้ร่วมโครงการ	2547-48	งบประมาณ
แผ่นดิน				
-โครงการวิจัย:	การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ ในการผลิตสีผสมอาหาร	หัวหน้าโครงการ	2550-2551	งบประมาณ
แผ่นดิน	ที่ปลอดภัย			
-โครงการวิจัย:	การตรวจหาสารปฏิชีวนะตกค้างในอาหารทะเลและผลิตภัณฑ์	หัวหน้าโครงการ	2551	งบประมาณ
แผ่นดิน	อาหารทะเล			
-โครงการวิจัย:	แอคติโนมัยซีทจากป่าชายเลนที่สร้างสาร	หัวหน้าโครงการ	2551	งบประมาณ
แผ่นดิน	ไบโอแอคทีฟที่ยัง เชื้อจุลินทรีย์			
-โครงการวิจัย:	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสาร	หัวหน้าโครงการ	2554-2555	งบประมาณ
แผ่นดิน	แอนติไบโอติกจากราที่เป็นเอ็นโดไฟท์และแอคติโนมัยซีทบริเวณรากพืชป่าชายเลน			
- โครงการวิจัย	การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทและการผลิต	2556-2558	งบประมาณ	
แผ่นดิน	เซลล์ปริมาณมาก			
7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว:	งานวิจัยทั้งหมดในข้อ 7.1 และ 7.2 (ยกเว้นโครงการสุดท้ายที่เป็นโครงการต่อเนื่อง)			
7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ:	เป็นหัวหน้าโครงการ	2556-2557	งบประมาณแผ่นดิน	
-	การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทและการผลิตเซลล์ปริมาณมาก	โครงการปี	2556	เสร็จ

แล้ว กำลังเขียนรายงาน โครงการของปี 2557 ดำเนินการแล้ว 30 %

### ชื่อข้อเสนอองานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

เป็นหัวหน้าโครงการวิจัยส่วนใหญ่ ยกเว้นผลงานพิมพ์ เผยแพร่ ที่ 4 และที่ 21 ส่วนรายการที่ 19 เป็นหนังสือ

### ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่

1. รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์ และ สุรพล ฉลาดคิด . 2541. โรค vibriosis (Vibriosis) ในม้าน้ำ ( *Hippocampus kuda* ) ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ. *เวชศาสตร์สัตวแพทย์* 28:101-107
2. รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์. 2541 . การเก็บรวบรวมและการตรวจหา Actinomycetes จากดินป่าชายเลนที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพ. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 6: 23-33
3. Srivibool, R. and Poonpium, P. 1995. Bacterial counts as indices for seawater quality along the east coast of the Gulf of Thailand. *In Proc. of the International Seminar on Marine Fisheries and Environment*. 10-11 March 1995. Rayong. p. 171-181 ( หัวหน้าโครงการ)
4. Tongra-ar, W., Puchakarn, S., Sanpanich, K., Noiraksa, T. and Srivibool, R. 1995. An Integrated Management of Watersheds in Relation to the Coastal and Marine Environment of the Prasae River Basin, Rayong. A case study presented at 2<sup>nd</sup> UNEP workshop of the EAS-35 Project, 16-20 October 1995. Bangkok. 64 p. ( ผู้ร่วมวิจัย)
5. Srivibool, R. 2000. Antimicrobial activity of *Actinomadura* isolates from tropical island soils. *Actinomycetes Journal*.10: 10-12
6. Srivibool, R. 2000. Biodiversity of rare actinomycetes in island soils and their antimicrobial activities. *In Proc. of AABE-Biology Education in the New Millennium*, 1-5 August, 2000, Hong Kong, Republic of China.
7. รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์ . 2545 . แอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่สร้างสารแอนติไบโอติก ที่แยกจากดินของเกาะไผ่ และ เกาะ แสมสาร พระราชวังดุสิต กรุงเทพฯ
8. Srivibool, R. Kurakami, K., Sukchotiratana, M., and Tokuyama, S. 2002. Coastal Soil Actinomycetes Thermotolerant Strains Producing *N*-acetyl amino Acid Racemase. *In proceedings of the 3<sup>rd</sup> Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications*. 18- 21 November. 2002. Chiang Mai, Thailand.
9. Srivibool, R. 2002. Rare Actinomycetes isolated from coastal soils as antimicrobial producers. *In: Proceeding of 19 th Biennial Conference of Asian Association for Biology Education*, 27-29 November 2002, Deakin University, Warrnambool, Australia.
10. Srivibool, R., Kurakami, K., Sukchotiratana, M., and Tokuyama, S. 2004. Coastal soil actinomycetes: Thermotolerant strains producing *N*-acetyl amino acid racemase. *ScienceAsia*

30:123-126

11. **Srivibool, R.**, Sukchotiratana, M., and Tokuyama, S. A new isolate of *Streptomyces thermocarboxydus* from marine tropical soil potentially produced Antibacterial and antifungal substances. 2005. *In* Proceeding of the International Marine Biotechnology Conference, St. John, Newfoundland, Canada.
12. **Srivibool, R.**, Thirakpanich, U. 2007. Exporation of marine actinomycetes-chemical and biological characterization of pigmented isolates. *In* Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Symposium on the Biology of Actinomycetes. 23-31 August, Newcastle upon Tyne, UK.
13. **Srivibool, R.**, and Sukchotiratana, M., Tokuyama, S. and Pathom-aree, W. 2007. Isolation and characterization of anticancer and antimicrobial *Streptomyces* producing strain from mangrove sediment . 2007. *In* Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Symposium on the Biology of Actinomycetes. 23-31 August, New Castle upon Tyne, UK.
- 13 **Srivibool, R.** and Jaritkhuan, S. 2007. A new alternative source for highly unsaturated fatty acids. *In* Proceeding of the 2<sup>nd</sup> International FerVAAP Conference, Khon Kaen University. Khon Kaen.
15. **Srivibool, R.**, Sukchotiratana, M., and Tokuyama, S . 2005. A novel actinomycete strain from coastal soil producing antibacterial and antifungal subatances., *In*: Proceeding of the 31<sup>st</sup> Science and Technology Association of Thailand Conference. 18-20 October, 2005. Nakhon Ratchasima, Thailand.
16. **Srivibool, R.** and Sukchotiratana, M. 2006. Bioperspective of actinomycetes isolated from coastal Soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin Journal of Scince and Technology*. 28:493-499.
17. **Srivibool, R.**, Pen, J. and Prayoonrat, P. 2006. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from coastal of Chang island, Trad. *Burapha Science Journal*. (in Thai)
18. **Srivibool, R.**, and Sukchotiratana, M. 2006. Pigmented actinomycetes from coastal areas and their bioactive secondary metabolites. *Journal of Science, Technology and Humanities*. 4: 11-18
19. **Srivibool, R.** 2006. Actinomycetes . Institute of Marine Science. Chonburi. 100 p. (in Thai)
20. **Srivibool, R.**, Jaidee, K., Sukchotiratana, M., Tokuyama, S., and Pathom-aree, W. 2010. Taxonomic characterization of *Streptomyces* strain CH54-4 isolated from mangrove sediment. *Ann Microbiol* 60:299-305

21. Mayama, S., Katoh, K., Ohmori, H., Seino, S., Osaki, H., Julius, M., Lee, J. H., Cheong, C., Lobo, E. A., Witkowski, A., **Srivibool R.**, Muangphra, P., Jahn, R. and Kulikovskiy, M. 2011. Progress toward Construction International Web-based Educational System Featuring of an Improved SimRiver for Understanding of the River Environment. *Asian Journal of Biology of Education*.
22. **Srivibool, R.**, and Nimrat, S. 2012. Anti-MRSA Activity of *Streptomyces* A16-1, An Isolate from Coastal Soil. In *proceedings of the 1<sup>st</sup> International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology*, October 4-6, 2012. Khonkaen. Thailand.
23. Siranontana, N., Watanadilok, R., Watanachote, J. and **Srivibool, R.** 2012. Fatty acid compositions in marine yeasts isolated from coastal water. In *proceedings of the 1<sup>st</sup> International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology*, October 4-6, 2012. Khonkaen. Thailand .
24. Tanakulpakorn, J., Pilantanapak, A. and **Srivibool, R.** 2012. Antifungal activity of the endophytic Fungi TH121 isolated from *Thespesia populnea* against *Alternaria brassicicola*. *Thai J. of Science and Technology*. 1: 32-41 (in Thai)
25. Saengkhae, C., Pumpunphol, J., **Srivibool, R.** 2013. Extraction of *Micromonospora aurantiaca* from coastal marine sediments enhances doxorubicin induced apoptosis in KB cells. *J. Physiological and Biomedical Sciences*. 26: 76-82.
26. Chang-ying Ruan, Li Zhang, Xiu-chao Xie, **Rattanaorn Srivibool**, Kannika Duangmal, Wasu Pathom-aree, Zi-xin Deng and Kui Hong 2014. *Streptomyces ferrugineus* sp nov., isolated from mangrove soil in Thailand. *Antonie van Leeuwenhoek*. (on line published since October, 2014)

### ประวัติผู้ร่วมวิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย-นางสาว นางจันทร์จิรัส วัฒนชะโชติ  
(ภาษาอังกฤษ) Mr, Miss Mrs. Janjarus Watanachote
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1005-02721-23-9
- ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ชำนาญการ เงินเดือน 33,600 บาท เวลาที่ใช้ทำวิจัย 16 ชั่วโมง/สัปดาห์
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)  
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี 20131  
โทรศัพท์ 0-3839-1671-3 โทรสาร 0-3839-1674

E-mail : janjarus@bims.buu.ac.th

#### 5. ประวัติการศึกษา

Ph.D. (Marine Science) Kasetsart University, February, 2008. Thesis title is antibacterial Activity of Lectins from Hemolymph of Banana Prawn (*Penaeus merguensis* De Man).

M.S. (Chemistry) Chiang Mai University, October 18, 1993. Thesis title is enzymatic synthesis of oligosaccharides in aqueous two-phase system.

B.Ed. (Science-Chemistry) Srinakharinwirot University, March 3, 1990

#### Training:

- Purification of Lectin from Cyanobacteria and Microalgae from Algal Bloom in Bangpakong Estuarine Area : August, 1 – September, 29, 1999. At Department of Marine Biochemistry School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Japan.
- A training workshop of the Ministry of Science and Technology (MOST) : International training workshop for marine biotechnology. September, 8-24, 2008. At Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences, Qingdao, China.

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมัธยมศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ ชีวเคมี, เทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย : การศึกษาโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพจากแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล ปีงบประมาณ 2548-2549

ผู้ร่วมโครงการวิจัย (สัดส่วนการทำวิจัย 30%) : ชื่อโครงการวิจัย : โรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย” ทำเสร็จร้อยละ 70 (กำลังดำเนินการ)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2554

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

#### การจดอนุสิทธิบัตร

ได้รับอนุสิทธิบัตร “กรรมวิธีการเตรียมเลคติน (lectin) จากปะการังอ่อน (*Sinularia erecta*)

อนุสิทธิบัตรเลขที่ 5990 เมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2554

#### การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์และ Proceeding

Panayong, J. and Tongkao, D. 1992. Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides in Different Types of Aqueous Two-Phase Systems. In Proceeding of the 8<sup>th</sup> NRCT, NUS, DOST-JSPS Joint Seminar on Biotechnology, Bangkok, Thailand.

- Tongkao, D. and **Panayong**, J. 1999. Oligosaccharide Synthesis by Transmannosidation in Aqueous Two-Phase Systems. In Proceeding of the 6<sup>th</sup> Federation of Asian and Oceanian Biochemists, Shanghai, China.
- Panayong**, J. and Tongkao, D. 1994.  $\alpha$ -Mannosidase from Jack Beans and *Petriellidium* sp. AD-3S as a Catalyst in Oligosaccharide Synthesis. In Proceeding of the 11<sup>th</sup> Federation of Asian and Oceanian Biochemists, Bangkok, Thailand.
- Watanachote**, J. and Tongkao, D. 1995. Prospects of Concanavalin A Binding to Oligosaccharide Synthesis. in Proceeding of the 7<sup>th</sup> Congress of the Federation of Asian and Oceanian Biochemis and Molecular Biologists, Sydney, Australia.
- Srivilas, P. and **Watanachote**, J. 1997. Determination of Organochlorine Pesticide Residues in Marine Animals from Chon Buri Province. In Proceeding of the 23<sup>rd</sup> Congress on Science and Technology of Thailand, ChiangMai, Thailand.
- Leethochavalit, S., Srivibool, R., **Watanachote**, J. and Mamat, P. 1997. A Collection of Pure Living Microorganism Cultures from the East Coast and the Upper Part of the Gulf of Thailand. Full research paper proposed to Burapha University. 72 p.
- Srivilas, P. and **Watanachote**, J. 1998. Organochlorine Pesticide Residues in Some Economic Marine Molluses from the East Coast. Full research paper proposed to Burapha University. 49 p.
- Watanachote**, J. and Kamiya, H. 2000. Partial Purification of Lectin from Symbiotic Dinoflagellates in the Soft Coral *Sinularia lochmodes* by Affinty Chromatography. In Proceeding of the 26<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand.
- Watanachote**, J., Tunkijjanukij, S. and Dechsakulwatana, C. 2006. Biochemical properties of Lectin from Hemolymph of Banana Prawn (*Penaeus merguensis*). In Proceeding of the 44<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Thailand.
- Watanachote**, J., Dechsakulwatana, C. and Tunkijjanukij, S. 2008. Biological Properties of Lectins in Marine Sponge *Hytrios erecta*. The 8<sup>th</sup> Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, November 12-15, 2008, Bexco, Korea.
- Watanachote**, J., Dechsakulwatana, C. 2010. Agglutinating and Antibacterial Activities from Thai Marine Sponges *Callyspongia (Euplacella) jubini* and Its Associated Bacteria. The 9<sup>th</sup> Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, October 12-15, 2010. Qingdao, China.
- Watanachote**, J., Leethochawalit, S., Torchaisuwan, P. and Yamsakun, P. 2010. Antibacterial Proteins and Lectin in the Hemolymph of Oyster (*Saccostrea forskali*) which Culture Along the East Coast of Chonburi Rayong

and Chanthaburi Provinces. The 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology : International Conference on Biotechnology for Healthy Living. October 20-22 , 2010. Trang, Thailand.

Leethochawalit, S., **Watanachote, J.**, Rittirut, N. and Kaenjan, W. 2010. Contamination of Parasitic Protozoa, *Cryptosporidium* sp. in oyster along the east coast of Thailand. In Proceeding of the 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology : International Conference on Biotechnology for Healthy Living. October 20-22 , 2010. Trang, Thailand

Watanadilok, R., Srivilas, P., **Watanachote, J.** and Putchakarn, S. 2010. Bioactive substances and food supplements from marine sponges. The 13<sup>th</sup> International Symposium on Marine Natural Products. October, 17-22, 2010. Phuket, Thailand.

#### งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ

**Watanachote, J.** and Noiraksa, T. (2001) Hemagglutinating Properties of Aqueous Extract from Phytoplakton *Oscillatoria* sp. Thaksin University J. 4: 64-70.

**Watanachote, J.**, Noiraksa, T. and Tunkijjanukij, S. (2004) Characterization of Lectins from Marine Red Algae Genus *Gracilaria*. J.of Sci. Res. Chula. Univ. Section T: 324-331.

**Watanachote, J.**, Ratanapo, S., Dechsakulwatana, C., Poompuang, S. and Tunkijjanukij, S. 2007. Partial purification of lectin from hemolymph of *Penaeus merguensis* with antibacterial activity and bacterial clearance activity. *Journal of Science Technology and Humanities*. Journal of Science, Technology, and Humanities. 5: 3-16.

**Watanachote, J.**, Tunkijjanukij, S. and Dechsakulwatana, C. 2008 Antibacterial proteins in the serum hemolymph and hemocyte lysate of the banana prawn *Penaeus merguensis*. *Journal of Science Technology and Humanities*. *Journal of Science, Technology, and Humanities*. 6: 5-17.

**Watanachote, J.**, Maywarin Chaichareon and Tunkijjanukij, S. 2008. Biological properties of lectins in marine sponges from Chonburi province. Thailand. *Journal of Science, Technology, and Humanities*. 6: 99-107.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้ว ประมาณร้อยละเท่าใด

**ชื่อเรื่อง** “โรคปรสิตและระบบภูมิคุ้มกันในหอยเศรษฐกิจที่เลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย” ทำเสร็จร้อยละ 70 (อยู่ระหว่างดำเนินการ) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2554 (ผู้ร่วมโครงการ)