รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae*

Distribution and biodiversity of members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade in rhizosphere of plants in the family *Fabaceae*

โดย
พรทิพา เอี่ยมสำอางค์

เมษายน 2556

สัญญาเลขที่ 042/2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae*

Distribution and biodiversity of members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade in rhizosphere of plants in the family *Fabaceae*

ผู้วิจัย
พรทิพา เอี่ยมสำอางค์

สังกัด
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สนับสนุนโดย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2554

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2554 ในการสนับสนุนงบประมาณ สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการวิจัย รวมทั้งขอขอบคุณ ผศ. ดร.กรรณิการ์ ดวงมาลย์ อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับคำปรึกษาและเทคนิคต่างๆ ในการทดลอง สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย: การศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae*

ชื่อนักวิจัย: พรทิพา เอี่ยมสำอางค์

สาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

E-mail address: porntipa@swu.ac.th

บทคัดย่อ:

แบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade เป็นแหล่งสำคัญของ bioactive compounds และมีความสามารถในการสังเคราะห์ secondary metabolites ชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยค้นพบมาก่อน ดังนั้นการแยกแบคทีเรียชนิดใหม่ในกลุ่มนี้จากธรรมชาติอาจนำไปสู่การค้นพบ bioactive compounds โดยเฉพาะอย่างยิ่ง antibiotics ที่มีประโยชน์ในทางคลินิก การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* 5 ชนิด ได้แก่ หางนกยูงไทยและมะขาม (subfamily *Caesalpinioideae*) กระถินไทย (subfamily *Mimosoideae*) และอัญชันและแค (subfamily *Papilionoideae*) โดย sequence-based molecular techniques ผลจากการสกัด metagenomic DNA จากตัวอย่างดินโดย DNeasy® plant mini kit และ PCR amplification โดยใช้ eubacterial 16S rRNA gene-specific primers และ *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade-specific primers แสดงให้เห็นว่าไม่มีการกระจายของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในตัวอย่างดินบริเวณรากของพืชทั้ง 5 ชนิด โดยข้อมูลที่ได้จากการวิจัยสามารถใช้ประกอบการคัดเลือกตัวอย่างดินในการแยกแบคทีเรียชนิดใหม่ในกลุ่มนี้ต่อไป

คำหลัก: *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade, ดินบริเวณราก, *Fabaceae*, sequence-based molecular techniques, metagenomic DNA, eubacterial 16S rRNA gene-specific primers, *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade-specific primers

Project title: Distribution and biodiversity of members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade in rhizosphere of plants in the family *Fabaceae*

Investigator: Porntipa Aiemsum-ang

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

E-mail address: porntipa@swu.ac.th

Abstract:

Members of the *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade have been an important source of bioactive compounds and have been known for their ability to produce a number of novel secondary metabolites. Therefore, bacterial isolation of uncultured members of the clade might permit the discovery of clinically significant bioactive compounds, especially antibiotics. The objectives of this study were to investigate distribution and biodiversity of members of the *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade in rhizosphere of plants in the family *Fabaceae* by sequence-based molecular techniques. Peacock's crest and tamarind (subfamily *Caesalpinioideae*), leucaena (subfamily *Mimosoideae*) and butterfly pea and sesban (subfamily *Papilionoideae*) were selected for the study. Metagenomic DNA was obtained from the plant rhizosphere by DNeasy® plant mini kit and, then, subject to PCR amplification using eubacterial 16S rRNA gene-specific primers and *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade-specific primers. The results did not support the distribution of the clade members in the rhizosphere of all 5 plants. Derived data could be helpful in recruiting plant rhizosphere for selective isolation of uncultured members of the clade.

Keywords: *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade, rhizosphere, *Fabaceae*, sequence-based molecular techniques, metagenomic DNA, eubacterial 16S rRNA gene-specific primers, *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade-specific primers

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
บัญชีตาราง	จ
บัญชีภาพประกอบ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 4 ผลการวิจัย	13
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	16
บรรณานุกรม	19
ภาคผนวก	24
คำย่อ	26
ประวัติย่อผู้วิจัย	28

บัญชีตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2.1	แบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade	5
ตารางที่ 4.1	ลักษณะของสารสกัด metagenomic DNA และผลการตรวจสอบ DNA โดย gel electrophoresis	13

บัญชีภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 2.1	ลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade	4
รูปที่ 2.2	พืชตระกูล *Fabaceae* ที่มีรายงานการค้นพบแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade จากดินบริเวณราก	6
รูปที่ 3.1	พืชตระกูล *Fabaceae* ที่ใช้ดินบริเวณรากในการวิจัย	9
รูปที่ 4.1	ภาพถ่าย agarose gel แสดง metagenomic DNA bands ที่สกัดจากดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae*	14
รูปที่ 4.2	ภาพถ่าย agarose gel แสดง PCR products (eubacterial 16S rDNA fragments) ที่ได้จาก metagenomic DNA ที่สกัดโดย DNeasy® plant mini kit จากดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae*	14
รูปที่ 4.3	ภาพถ่าย agarose gel แสดง PCR products (*S. violaceusniger* clade 16S rDNA fragments) ที่ได้จาก metagenomic DNA ที่สกัดโดย DNeasy® plant mini kit และ eubacterial 16S rDNA fragments จากดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae*	15

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

ในปัจจุบัน antibiotics ที่ใช้ในทางคลินิกส่วนใหญ่เป็น secondary metabolites จากธรรมชาติ สารกึ่งสังเคราะห์จาก secondary metabolites จากธรรมชาติ หรือสารสังเคราะห์โดยมี secondary metabolites จากธรรมชาติเป็นต้นแบบ โดยแหล่งของ antibiotics ที่สำคัญในธรรมชาติ ได้แก่ actinomycetes โดยเฉพาะ streptomycetes อย่างไรก็ตามพบว่าในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมาอัตราการค้นพบ antibiotics ชนิดใหม่จาก streptomycetes ลดลงอย่างมากเนื่องจากมีการแยกและสกัดซ้ำของ streptomycetes และ antibiotics ชนิดเดิมจากธรรมชาติจากการใช้วิธีดั้งเดิม (traditional techniques) และไม่มีการจัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์ที่แน่นอนของ streptomycetes ในขณะที่ความต้องการ antibiotics ชนิดใหม่กลับเพิ่มขึ้นจากปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลชีพและโรคติดเชื้อเกิดใหม่

จากปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการนำเทคนิคใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีดั้งเดิม เช่น การศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของ streptomycetes โดยใช้ sequence-based molecular techniques และการทำ selective isolation มาใช้เพื่อลดปัญหาการแยกสกัดซ้ำของ streptomycetes และ antibiotics ชนิดเดิมหรือเพิ่มโอกาสในการค้นพบ streptomycetes และ antibiotics ชนิดใหม่จากธรรมชาติซึ่งอาจมีประโยชน์ในสถานการณ์การรักษาโรคติดเชื้อในปัจจุบัน

สมมติฐานของการศึกษานี้ ได้แก่ ดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* (พืชตระกูลถั่ว) มีองค์ประกอบและคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการอยู่อาศัยของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญของ bioactive compounds ดังนั้นการศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* โดยใช้ sequence-based molecular techniques จะทำให้ทราบถึงการมีอยู่และชนิด (species) ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ในธรรมชาติซึ่งเป็นการพิสูจน์สมมติฐาน และเพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการคัดเลือกตัวอย่างสำหรับการแยกแบคทีเรียชนิดใหม่ในกลุ่มนี้โดยวิธี selective isolation ต่อไป

องค์ความรู้ใหม่ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* ที่นำมาศึกษา รวมทั้งทราบลักษณะของแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของแบคทีเรียในกลุ่มนี้

ผลกระทบขององค์ความรู้ใหม่ต่อความก้าวหน้าในเชิงวิชาการ

ข้อมูลการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* ที่นำมาศึกษามีผลกระทบต่อความก้าวหน้าทางวิชาการในแง่ของการวิจัยต่อยอด โดยสามารถใช้ประกอบการศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* ชนิดอื่นๆ และการคัดเลือกตัวอย่างดินสำหรับการแยกแบคทีเรียชนิดใหม่ในกลุ่มนี้โดยวิธี selective isolation ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบ streptomycetes และ bioactive compounds ชนิดใหม่ที่มีประโยชน์ในสถานการณ์การรักษาโรคต่างๆ ในปัจจุบัน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae*

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาการมีอยู่และชนิดของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ซึ่งในปัจจุบันมีทั้งหมด 22 species ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* (พืชตระกูลถั่ว) 5 ชนิด โดยใช้ sequence-based molecular techniques ได้แก่ metagenomic DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR), molecular cloning, molecular sequencing และ sequence analysis

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบข้อมูลเบื้องต้นสำหรับใช้ประกอบการศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* ชนิดอื่นๆ และใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างดินสำหรับการทำ selective isolation เพื่อเพิ่มโอกาสในการค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่ในกลุ่มนี้ ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสในการค้นพบ bioactive compounds ชนิดใหม่ด้วย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

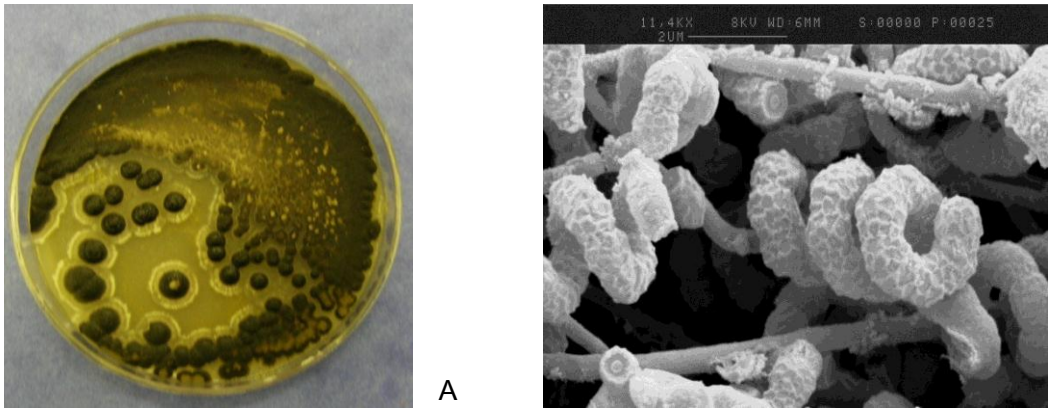
การแยกแบคทีเรียจากธรรมชาติและการสกัด bioactive compounds โดยเฉพาะ antibiotics จากแบคทีเรียในช่วงปี 1970s ได้ประสบความสำเร็จอย่างสูง ทำให้ antibiotics จำนวนมากถูกค้นพบและนำมาใช้ในทางคลินิก ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่า antibiotics ส่วนใหญ่ถูกสกัดแยกได้จากแบคทีเรียใน order *Actinomycetales* (actinomycetes) โดยเฉพาะใน genus *Streptomyces* (streptomycetes) เช่น *S. griseus* ผลิต streptomycin, *S. viridofaciens* ผลิต tetracycline และ *S. lincolnensis* ผลิต lincomycin เป็นต้น[1] ทำให้มีการแยกและสกัด antibiotics จาก streptomycetes อย่างกว้างขวางและส่งผลให้มีการค้นพบ antibiotics ชนิดใหม่จำนวนมาก อย่างไรก็ตามพบว่าในระยะหลังอัตราการค้นพบ streptomycetes และ antibiotics ชนิดใหม่ลดลงอย่างมาก ในขณะที่มีการแยก streptomycetes และ antibiotics ชนิดเดิมที่เคยถูกค้นพบมาแล้วมากขึ้นจนนำไปสู่ข้อสรุปที่ว่ามนุษย์ได้ค้นพบ streptomycetes รวมทั้ง antibiotics ทั้งหมดที่สังเคราะห์โดย streptomycetes แล้ว[1] แต่ข้อสรุปนี้ขัดแย้งกับการประมาณทางสถิติที่ว่าแบคทีเรียที่ถูกค้นพบมีสัดส่วนน้อยกว่า 1% ของแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ[1-3] และการวิจัยที่ค้นพบ streptomycetes ชนิดใหม่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ[4-9] นอกจากนี้ยังมีสมมติฐานที่ว่าในปัจจุบันมนุษย์รู้จักเพียง 3% ของ antibiotics ที่ streptomycetes สังเคราะห์ได้ทั้งหมดในธรรมชาติ[10] และจากการศึกษา whole genome sequences ของ "*S. coelicolor*" A3(2)[11], *S. avermitilis*[12-13] and *S. griseus*[14] พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถสังเคราะห์ bioactive compounds หลายชนิดที่ยังแยกสกัดไม่ได้ ดังนั้นในธรรมชาติน่าจะยังมีแบคทีเรียมากกว่า 99% และ bioactive compounds ที่มีประโยชน์ในทางคลินิกจำนวนมากที่ยังไม่ถูกค้นพบ

จากสมมติฐานดังกล่าวทำให้มีการนำวิธีใหม่ๆ เช่น sequence-based molecular techniques โดยใช้ specific primers และ selective isolation มาใช้ร่วมกับหรือแทนวิธีดั้งเดิม (traditional techniques) เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยก streptomycetes รวมทั้งแบคทีเรียอื่นๆ และ bioactive compounds ชนิดใหม่จากธรรมชาติ[4,15-25] ซึ่งในกรณีของ antibiotics อาจนำไปสู่ทางออกในการแก้ปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลชีพและการรักษาโรคติดเชื้อเกิดใหม่ที่ยังไม่มียารักษาซึ่งเป็นปัญหาหลักของการรักษาโรคติดเชื้อในปัจจุบัน[1,26-27]

หลักการของ sequence-based molecular techniques อาศัยการเปรียบเทียบความเหมือนของ gene sequence โดยการศึกษาในแบคทีเรียนิยมใช้ 16S rDNA sequence ซึ่งมีคุณสมบัติในการบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรีย โดยระดับความเหมือนของ 16S rDNA sequence มีความสัมพันธ์ตรงกับระดับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรีย จึงมักถูกใช้เป็นเครื่องมือหนึ่งในการจัดกลุ่มแบคทีเรีย (bacterial taxonomy) อย่างไรก็ตามความเหมือนของ 16S rDNA sequence มี

ประสิทธิภาพสูงในการจัดกลุ่มแบคทีเรียในระดับ domain ถึง genus เท่านั้น ในขณะที่การศึกษา DNA-DNA relatedness มีประสิทธิภาพสูงกว่าในการจัดกลุ่มแบคทีเรียในระดับ species และถือเป็น gold standard สำหรับการแยก species ของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่อยู่ใน species เดียวกันต้องมี DNA-DNA relatedness อย่างน้อย 70% ซึ่งโดยทั่วไปพบว่าเทียบเท่ากับความเหมือนของ 16S rDNA sequence ที่ 97%[28] ดังนั้นจึงมีการใช้ความเหมือนของ 16S rDNA sequence ที่ 97% เป็น cut-off value ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในระดับ species เบื้องต้นในธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ความเหมือนของ 16S rDNA sequence ในการออกแบบ specific primers ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียใน taxonomic levels ต่างๆ[19,23,25]

แบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade[29] (รูปที่ 2.1) ซึ่งในปัจจุบันมีทั้งหมด 22 species (ตารางที่ 2.1) จัดเป็น streptomycetes ที่เป็นแหล่งสำคัญของ bioactive compounds ที่มีประโยชน์ในทางคลินิก เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์ clade-specific secondary metabolites ได้แก่ elaiophylin, geldanamycin, nigericin และ characteristic polyene[30-32] ในขณะที่แบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์ strain-specific secondary metabolites[33-35] นอกจากนี้จากการศึกษา whole genome sequence ของ *Streptomyces* sp. DSM4137 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade พบว่าใน genome ประกอบด้วย secondary metabolite biosynthetic gene clusters ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถของแบคทีเรียในการสังเคราะห์ secondary metabolites หลายชนิดโดยส่วนใหญ่เป็น secondary metabolites ที่ยังไม่สามารถแยกสกัดได้[36]



รูปที่ 2.1 ลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade[37]; A: colonies with dark grey and hygroscopic aerial spore mass on oatmeal medium และ B: electron micrograph showing rugose-ornamented spores on spiral spore chains

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade[37]

กลุ่ม	แบคทีเรีย
S. violaceusniger 16S rRNA gene clade	*S. violaceusniger*
	S. hygroscopicus
	S. antimycoticus
	S. melanosporofaciens
	S. sporocinereus
	S. malaysiensis
	S. asiaticus
	S. cangkringensis
	S. indonesiensis
	S. javensis
	S. rhizosphaericus
	S. yogyakartensis
	S. yatensis
	S. albiflaviniger
	S. demainii
	S. griseiniger
	S. geldanamycininus
	S. castelarensis
	S. himastatinicus
	S. mordarskii
	S. rapamycinicus
	S. ruanii

แบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ส่วนใหญ่ถูกค้นพบและแยกได้จากดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* (พืชตระกูลถั่ว) ได้แก่ *Paraserianthes falcataria* (subfamily *Mimosoideae*), *Colutea arborescens* (subfamily *Papilionoideae*) และ *Wisteria* sinensis (subfamily *Papilionoideae*)[4,37] (รูปที่ 2.2)

A

B

C

D

E

F

รูปที่ 2.2 พืชตระกูล *Fabaceae* ที่มีรายงานการค้นพบแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade จากดินบริเวณราก; A และ B: *Paraserianthes falcataria*[38], C และ D: *Colutea arborescens*[39-40] และ E และ F: *Wisteria sinensis*[41-42]

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

เครื่องมือ

- Autoclave (TOMY, SX-500)
- Electrophoresis system (Mupid®-exu)
- Gel documentation system (MiniBis Pro, DNR Bio-imaging Systems, Inc.)
- Incubating shaker (TAITEC, BR-12FP)
- Microcentrifuge (TOMY, MX-301) และ rotors
- Microwave oven (TURBORA®, TRX-4314)
- PCR thermocycler (Biometra®, TGRADIENT)
- UV transilluminator (SYNGENE)
- Mixer (VORTEX-GENIE 2™, Scientific Industries, Inc.)
- Water bath (Memmert)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP 221 S)

อุปกรณ์

- Aluminium foil
- Centrifuge tubes ขนาด 15 ml และ 50 ml
- Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- Micropipettes และ pipette tips ขนาด 0.2-2 μl, 2-20 μl, 20-200 μl และ 200-1,000 μl
- Paraffin film
- PCR tube ขนาด 0.2 ml
- โกร่งและลูกโกร่ง
- ขวดเตรียม agarose gel
- ช้อนตักสาร
- ถาดผึ่งดิน

สารเคมี

- Agarose (Invitrogen™)
- Boric acid (UNIVAR)
- CTAB (UNILAB)
- Disodium EDTA (UNIVAR)
- Disodium hydrogen orthophosphate (UNIVAR)
- DNeasy® plant mini kit (Qiagen)
- Ethanol (J.T.Baker)
- Ethidium bromide (Vivantis)
- GelStar® nucleic acid gel stain (Lonza)
- GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder (Fermentas)
- Isopropanol (CARLO ERBA)
- Oligonucleotide primers (Eurofins MWG Operon)

  27F: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'

  1525R: 5'-AAG GAG GTG WTC CAR CC-3'

  SVNF: 5'-ACG ATG AAC CGG TTT CGG CC-3'

  SVNR: 5'-CAC CTC ACG GCT TCG CAG CT-3'
- Phenol:chloroform:IAA (25:24:1) (Pierce Biotechnology, Inc.)
- Proteinase K (Vivantis)
- SDS (aMResco®)
- SDW
- Sodium chloride (UNIVAR)
- *S. malaysiensis* DSM 41697^{T} genomic DNA
- TopTaq master mix kit (Qiagen)
- Tris (aMResco®)

3.2 ตัวอย่างดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* (รูปที่ 3.1)

- หางนกยูงไทย (*Caesalpinia pulcherrima*, subfamily *Caesalpinioideae*)
- มะขาม (*Tamarindus indica*, subfamily *Caesalpinioideae*)
- กระถินไทย (*Leucaena leucocephala*, subfamily *Mimosoideae*)

- อัญชัน (*Clitoria ternatea*, subfamily *Papilionoideae*)
- แค (*Sesbania grandiflora*, subfamily *Papilionoideae*)

A

B

C

D

E

รูปที่ 3.1 พืชตระกูล *Fabaceae* ที่ใช้ดินบริเวณรากในการวิจัย; A: หางนกยูงไทย[43] B: มะขาม[44] C: กระถินไทย[45] D: อัญชัน[46] และ E: แค[47]

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างดิน

- เช็ดถาดผึ่งดิน โกร่ง ลูกโกร่ง และช้อนตักสารด้วย 70%v/v ethanol เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ
- ผึ่งตัวอย่างดินในถาดให้แห้งสนิทในที่ร่ม
- บดตัวอย่างดินให้เป็นผงละเอียดโดยใช้โกร่งและลูกโกร่ง
- เก็บตัวอย่างดินใน centrifuge tubes ขนาด 50 ml ที่อุณหภูมิ 4°C

3.3.2 การสกัด Metagenomic DNA

<u>Salt-SDS-Heat Method</u>[37,48]

- ชั่งตัวอย่างดิน 5 g ใส่ใน centrifuge tubes ขนาด 50 ml
- เติม Zhou's extraction buffer (ภาคผนวก) 13.5 ml และ 10 mg/ml proteinase K 100 μl
- เขย่าที่อัตราเร็ว 225 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
- เติม 20%w/v SDS 1.5 ml
- บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยกลับ centrifuge tubes ทุก 15 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- ถ่าย supernatant ลงใน centrifuge tubes ขนาด 50 ml
- เติม phenol:chloroform:IAA (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่าของ supernatant
- เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 1 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- ถ่ายชั้นน้ำลงใน microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 ml
- เติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของชั้นน้ำ
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 20 นาทีแล้วทิ้ง supernatant
- เติม 70%v/v ethanol แล้วกลับ centrifuge tubes ช้าๆ
- ปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาทีแล้วทิ้ง supernatant
- ผึ่ง DNA ใน microcentrifuge tubes ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- เติม TE buffer (ภาคผนวก) 300 μl
- เก็บสารละลาย DNA ที่อุณหภูมิ -20°C

DNeasy® Plant Mini Kit

- ชั่งตัวอย่างดิน 100 mg ใส่ใน microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 ml
- ทำตามขั้นตอนต่างๆ ที่ระบุใน protocol ของ DNeasy® plant mini kit
- เก็บสารละลาย DNA ที่อุณหภูมิ -20°C

3.3.3 PCR Amplification

Eubacterial 16S rDNA Fragment

การเพิ่มจำนวน eubacterial 16S rDNA fragments ใช้ metagenomic DNA, *S. malaysiensis* DSM 41697^{T} genomic DNA (positive control) และ SDW (negative control) เป็น DNA templates และใช้ eubacterial 16S rRNA gene-specific primers (27F และ 1525R) ใน PCR mixtures (ภาคผนวก) โดยกำหนด PCR conditions[37] ดังนี้

- Initial DNA denaturation	95°C, 5 นาที	
- DNA denaturation	95°C, 1 นาที	30 รอบ
- Primer annealing	50°C, 1 นาที	
- Primer extension	72°C, 1 นาที 15 วินาที	
- Final primer extension	72°C, 10 นาที	

S. violaceusniger Clade 16S rDNA Fragment

การเพิ่มจำนวน *S. violaceusniger* clade 16S rDNA fragments ใช้ metagenomic DNA, eubacterial 16S rDNA fragments, *S. malaysiensis* DSM 41697^{T} genomic DNA (positive control) และ SDW (negative control) เป็น DNA templates และใช้ *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade-specific primers (SVNF และ SVNR) ใน PCR mixtures (ภาคผนวก) โดยกำหนด PCR conditions[37] ดังนี้

- Initial DNA denaturation	95°C, 2 นาที 30 วินาที	
- DNA denaturation	95°C, 1 นาที	30 รอบ
- Primer annealing	60°C, 50 วินาที	
- Primer extension	72°C, 1 นาที	
- Final primer extension	72°C, 10 นาที	

3.3.4 Gel Electrophoresis และ DNA Visualization

<u>การเตรียม Agarose Gel</u>

- ชั่ง agarose 250 mg ใส่ในขวดเตรียม agarose gel
- เติม 0.5x TBE buffer (ภาคผนวก) 25 ml
- ให้ความร้อนใน microwave oven จน agarose ละลายหมด
- ปล่อยให้ agarose gel เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 60°C
- เติม ethidium bromide หรือ GelStar® nucleic acid gel stain 1 μl
- เท agarose gel ลงใน gel tray
- ปล่อยให้ agarose gel แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

<u>Gel Electrophoresis และ DNA Visualization</u>

การตรวจสอบ metagenomic DNA และ PCR products (eubacterial 16S rDNA fragments และ *S. violaceusniger* 16S rDNA fragments) ใช้ electrophoretic conditions ดังนี้

- DNA	2 μl
- DNA marker	GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder
- Buffer	0.5x TBE buffer
- Voltage	100 V
- เวลา	30 นาที

การถ่ายภาพ DNA bands บน agarose gel ภายใต้รังสี UV ทำโดยใช้ gel documentation system หรือ UV transilluminator

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การสกัด Metagenomic DNA

ลักษณะของสารสกัด metagenomic DNA จากตัวอย่างดินโดย salt-SDS-heat method และ DNeasy® plant mini kit รวมทั้งผลการตรวจสอบ DNA โดย gel electrophoresis แสดงดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของสารสกัด metagenomic DNA และผลการตรวจสอบ DNA โดย gel electrophoresis

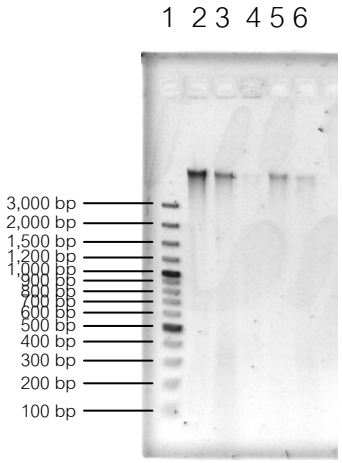
ตัวอย่างดินบริเวณราก	วิธีการสกัด	
	Salt-SDS-Heat	DNeasy® Plant Mini Kit
<u>ลักษณะของสารสกัด</u>		
- หางนกยูงไทย	สีน้ำตาลเข้ม	สีเหลืองอ่อน ใส
- มะขาม	สีน้ำตาลเข้ม	สีเหลืองอ่อน ใส
- กระถินไทย	สีน้ำตาลเข้ม	สีเหลืองอ่อน ใส
- อัญชัน	สีน้ำตาลเข้ม	สีเหลืองอ่อน ใส
- แค	สีน้ำตาลเข้ม	สีเหลืองอ่อน ใส
<u>ผลการตรวจสอบ DNA</u>		
- หางนกยูงไทย	ไม่พบ	พบ (ขนาดใหญ่กว่า 3 kb)
- มะขาม	ไม่พบ	พบ (ขนาดใหญ่กว่า 3 kb)
- กระถินไทย	ไม่พบ	พบ (ขนาดใหญ่กว่า 3 kb)
- อัญชัน	ไม่พบ	พบ (ขนาดใหญ่กว่า 3 kb)
- แค	ไม่พบ	พบ (ขนาดใหญ่กว่า 3 kb)

4.2 PCR Amplification และ Gel Electrophoresis

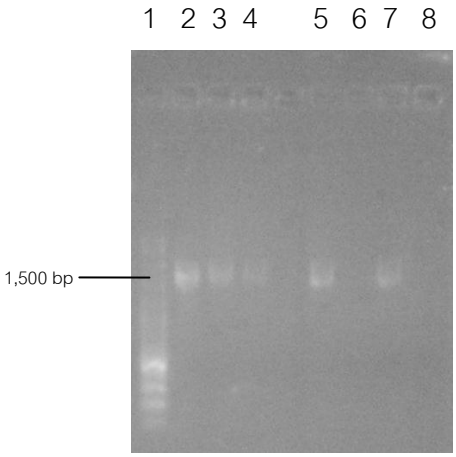
4.2.1 Eubacterial 16S rDNA Fragment

การตรวจสอบและเพิ่มจำนวน eubacterial 16S rDNA fragments โดยใช้ eubacterial 16S rRNA gene-specific primers (27F และ 1525R) พบว่าปรากฏ specific DNA bands ใน lanes ของ metagenomic DNA (DNeasy® plant mini kit) จากตัวอย่างดินทั้ง 5 ตัวอย่าง โดย DNA bands มีขนาด

ประมาณ 1.5 kb ซึ่งเท่ากับ DNA band ใน lane ของ *S. malaysiensis* DSM 41697^{T} genomic DNA (positive control) และไม่ปรากฏ DNA band ใน lane ของ SDW (negative control) ดังแสดงในรูปที่ 4.2



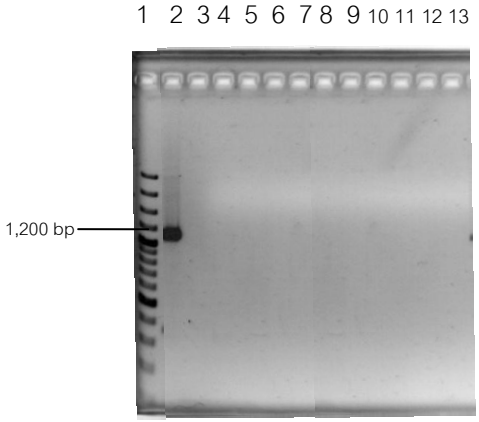
รูปที่ 4.1 ภาพถ่าย agarose gel แสดง metagenomic DNA bands ที่สกัดโดย DNeasy® plant mini kit จากดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae*; lane **1**: GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder, lane **2**: อัญชัน, lane **3**: กระถินไทย, lane **4**: หางนกยูงไทย และ lane **5**: แค



รูปที่ 4.2 ภาพถ่าย agarose gel แสดง PCR products (eubacterial 16S rDNA fragments) ที่ได้จาก metagenomic DNA ที่สกัดโดย DNeasy® plant mini kit จากดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae*; lane **1**: GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder, lane **2**: *S. malaysiensis* DSM 41697^{T} genomic DNA (positive control), lane **3**: อัญชัน, lane **4**: กระถินไทย, lane **5**: หางนกยูงไทย, lane **6**: แค, lane **7**: มะขาม และ lane **8**: SDW (negative control)

4.2.2 *S. violaceusniger* Clade 16S rDNA Fragment

การตรวจสอบและเพิ่มจำนวน *S. violaceusniger* clade 16S rDNA fragments โดยใช้ *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade-specific primers (SVNF และ SVNR) พบว่าไม่ปรากฏ specific DNA band ใน lanes ของ metagenomic DNA (DNeasy® plant mini kit) และ eubacterial 16S rDNA fragments จากตัวอย่างดินทั้ง 5 ตัวอย่างและ SDW (negative control) โดยปรากฏ DNA band เฉพาะใน lane ของ *S. malaysiensis* DSM 41697^{T} genomic DNA (positive control) ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.2 kb ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ภาพถ่าย agarose gel แสดง PCR products (*S. violaceusniger* clade 16S rDNA fragments) ที่ได้จาก metagenomic DNA ที่สกัดโดย DNeasy® plant mini kit (lane **3-7**) และ eubacterial 16S rDNA fragments (lane **8-12**) จากดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae*; lane **1**: GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder, lane **2**: *S. malaysiensis* DSM 41697^{T} genomic DNA (positive control), lane **3** และ **8**: อัญชัน, lane **4** และ **9**: กระถินไทย, lane **5** และ **10**: หางนกยูงไทย, lane **6** และ **11**: แค, lane **7** และ **12**: มะขาม และ lane **13**: SDW (negative control)

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการคัดเลือกตัวอย่างดินสำหรับการแยกแบคทีเรียชนิดใหม่ในกลุ่มนี้โดยวิธี selective isolation จะช่วยเพิ่มโอกาสในการค้นพบ streptomycetes และ bioactive compounds ชนิดใหม่ เนื่องจากในการศึกษา whole genome sequence ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้พบว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต secondary metabolites หลายชนิดที่ยังไม่เคยสกัดแยกได้มาก่อน โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่แยกได้จากดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* (พืชตระกูลถั่ว) subfamilies *Mimosoideae* และ *Papilionoideae* ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* มีความเหมาะสมต่อการอยู่อาศัยของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade และได้คัดเลือกตัวอย่างดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* 5 ชนิดซึ่งกระจายอยู่ในทั้ง 3 subfamilies ได้แก่ หางนกยูงไทยและมะขาม (subfamily *Caesalpinioideae*) กระถินไทย (subfamily *Mimosoideae*) และอัญชันและแค (subfamily *Papilionoideae*) เพื่อเปรียบเทียบการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* ที่อยู่ใน subfamily แตกต่างกันด้วย

การสกัด metagenomic DNA จากตัวอย่างดินโดย salt-SDS-heat method และ DNeasy® plant mini kit พบว่าได้สารสกัด metagenomic DNA ที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดย metagenomic DNA ที่สกัดโดย salt-SDS-heat method จากตัวอย่างดินทั้ง 5 ตัวอย่างมีสีน้ำตาลเข้มและไม่ปรากฏ DNA band บน agarose gel ในขณะที่ metagenomic DNA ที่สกัดโดย DNeasy® plant mini kit จากตัวอย่างดินทั้ง 5 ตัวอย่างมีสีเหลืองอ่อนใสและปรากฏ DNA bands บน agarose gel จึงสรุปว่า salt-SDS-heat method ไม่เหมาะสมกับการสกัด metagenomic DNA จากตัวอย่างดินที่ใช้ในงานวิจัย เนื่องจากไม่สามารถสกัด metagenomic DNA จากตัวอย่างดินและไม่สามารถกำจัดสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ซึ่งรวมถึง humic acid ที่พบในตัวอย่างดิน โดย humic acid เป็นสารที่มักพบในดินและทำให้ดินมีสีน้ำตาลถึงดำ รวมทั้งมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของ *Taq* DNA polymerase ซึ่งเป็นองค์ประกอบใน PCR mixture ในทางตรงกันข้าม DNeasy® plant mini kit มีความเหมาะสมกับการสกัด metagenomic DNA ตัวอย่างดินที่ใช้ในงานวิจัย เนื่องจากสามารถสกัด metagenomic DNA จากตัวอย่างดินและสามารถกำจัด humic acid ที่พบในตัวอย่างดิน ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากการที่การจัดเรียงโครงสร้างของเนื้อดินมีลักษณะใกล้เคียงกับการจัดเรียงโครงสร้างของเซลล์พืช ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือก metagenomic DNA ที่สกัดโดย DNeasy® plant mini kit สำหรับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป

การเพิ่มจำนวน eubacterial 16S rDNA fragments โดย PCR ที่ใช้ eubacterial 16S rRNA gene-specific primers มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ metagenomic DNA ที่สกัดโดย DNeasy® plant mini kit เนื่องจากการปนเปื้อนด้วย humic acid ในปริมาณเล็กน้อยอาจมีผลยับยั้งการทำงานของ *Taq* DNA polymerase ได้ โดยในการวิจัยพบว่าสามารถเพิ่มจำนวน eubacterial 16S rDNA fragments จาก metagenomic DNA ที่สกัดจากตัวอย่างดินทั้ง 5 ตัวอย่าง จึงสรุปว่า metagenomic DNA มีความบริสุทธิ์เพียงพอสำหรับการเพิ่มจำนวน DNA fragments โดย PCR และสามารถใช้ในการศึกษาการกระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ต่อไป

การตรวจสอบและเพิ่มจำนวน *S. violaceusniger* clade 16S rDNA fragments โดย PCR ที่ใช้ *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade-specific primers มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกระจายหรือการมีอยู่ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ในตัวอย่างดิน พบว่าไม่สามารถเพิ่มจำนวน *S. violaceusniger* clade 16S rDNA fragments จาก metagenomic DNA และ eubacterial 16S rDNA fragments ที่ได้จากตัวอย่างดินทั้ง 5 ตัวอย่าง จึงสรุปเบื้องต้นบนพื้นฐานของ sequence-based molecular techniques ว่าไม่มีการกระจายของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในตัวอย่างดิน หรืออีกนัยหนึ่งคือดินบริเวณรากของหางนกยูงไทย มะขาม กระถินไทย อัญชัน และแค ซึ่งเป็นพืชที่กระจายอยู่ใน 3 subfamilies ของตระกูล *Fabaceae* ไม่ได้เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของแบคทีเรียในกลุ่มนี้

จากผลการวิจัยเบื้องต้นที่ว่าไม่มีการกระจายของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในตัวอย่างดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* ที่ใช้ในการวิจัย จึงทำให้ไม่สามารถศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าผลการวิจัยไม่สนับสนุนสมมติฐานที่ว่าดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* มีความเหมาะสมต่อการอยู่อาศัยของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพืชสร้างและหลั่งสารบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย หรือดินบริเวณรากของพืชเป็นแหล่งอาศัยของแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ ที่สร้างและหลั่งสารต้านแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade

อย่างไรก็ตามจากผลการวิจัยดังกล่าวยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่าดินบริเวณรากของพืชเหล่านี้ไม่เหมาะสมในการเป็นตัวอย่างสำหรับการแยกแบคทีเรียชนิดใหม่ในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade โดยวิธี selective isolation และไม่สามารถปฏิเสธสมมติฐานดังกล่าวโดยสิ้นเชิง เนื่องจากการวิจัยใช้ตัวอย่างดินจากพืชในตระกูล *Fabaceae* เพียง 5 ชนิด (ชนิดละ 1 ตัวอย่างหรือ 1 ต้น) และใช้วิธีการสกัด metagenomic DNA จากตัวอย่างดินเพียง 2 วิธีจากหลายๆ วิธีที่มีรายงานว่าเหมาะสมกับดินที่มีโครงสร้างและองค์ประกอบในดินที่หลากหลายและให้ metagenomic DNA ที่มีคุณภาพและความบริสุทธิ์สูง เช่น CTAB method[37,49] และ SDS-chloroform-bead-beating method[37,50] รวมทั้งการใช้ชุดสำหรับสกัด genomic DNA จากพืชในการสกัด metagenomic DNA จากตัวอย่างดิน[37] อย่างไรก็ตาม

ในทางปฏิบัติพบว่าวิธีการสกัดส่วนใหญ่มักจะมีความเหมาะสมกับดินที่มีโครงสร้างและองค์ประกอบในดินบางประเภทเท่านั้น หรือสามารถสกัด genomic DNA ของแบคทีเรียกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งได้มากกว่า genomic DNA ของแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ที่มีอยู่ในดินนั้นๆ ดังนั้นการที่ไม่พบการกระจายของแบคทีเรียในกลุ่ม *S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade ในตัวอย่างดินบริเวณรากของพืชอาจมีสาเหตุมาจาก DNeasy® plant mini kit ไม่เหมาะสมกับโครงสร้างและองค์ประกอบในดินและ/หรือมีความเฉพาะเจาะจงในการสกัด genomic DNA จากแบคทีเรียบางกลุ่มเท่านั้น จึงส่งผลให้ไม่สามารถสกัด *S. violaceusniger* clade genomic DNA จากตัวอย่างดิน นอกเหนือจากข้อสรุปที่ว่าไม่มีการกระจายของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ในดินบริเวณรากของพืชตระกูล *Fabaceae* ที่ใช้ในการวิจัยจริงๆ ซึ่งจากที่กล่าวมาทั้งหมดการเพิ่มชนิดและจำนวนพืชตระกูล *Fabaceae* ที่เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากในการวิจัย รวมทั้งการสกัด metagenomic DNA โดยวิธีที่หลากหลายน่าจะเป็นแนวทางที่นำไปสู่ข้อสรุปที่แน่นอนต่อไป

บรรณานุกรม

1. Strohl, W.R. (2004) Antimicrobials. In *Microbial Diversity and Bioprospecting*. Bull, A.T. (ed). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 336-355.

2. Ward, D.M., Weller, R., and Bateson, M.M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **344**: 63–65.

3. Hammond, P.M. (1995) Described and estimated species members: an objective assessment of current knowledge. In *Microbial Diversity and Ecosystem Function*. Allsopp, D., Colwell, R.R., and Hawksworth, D.L. (eds). Wallingford: CAB International, pp. 29-71.

4. Sembiring, L., Ward, A.C., and Goodfellow, M. (2000) Selective isolation and characterisation of members of the *Streptomyces violaceusniger* clade associated with the roots of *Paraserianthes falcataria*. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**: 353-366.

5. Saintpierre, D., Amir, H., Pineau, R., Sembiring, L., and Goodfellow, M. (2003) *Streptomyces yatensis* sp. nov., a novel bioactive streptomycete isolated from a New-Caledonian ultramafic soil. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**: 21-26.

6. Huang, Y., Li, W., Wang, L., Lanoot, B., Vancanneyt, M., Rodriguez, C. *et al.* (2004) *Streptomyces glauciniger* sp. nov., a novel mesophilic streptomycete isolated from soil in south China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 2085-2089.

7. Mao, J., Tang, Q., Zhang, Z., Wang, W., Wei, D., Huang, Y. *et al.* (2007) *Streptomyces radiopugnans* sp. nov., a radiation-resistant actinomycete isolated from radiation-polluted soil in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 2578-2582.

8. Savic, M., Bratic, I., and Vasiljevic, B. (2007) *Streptomyces durmitorensis* sp. nov., a producer of an FK506-like immunosuppressant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 2119-2124.

9. Sun, W., Huang, Y., Zhang, Y.-Q., and Liu, Z.-H. (2007) *Streptomyces emeiensis* sp. nov., a novel streptomycete from soil in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 1635-1639.

10. Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., and Bhole, B.D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology* **176**: 386-390.

11. Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D. *et al.* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.

12. Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M. *et al.* (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing bioactive compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 12215-12220.

13. Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T. *et al.* (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology* **21**: 526-531.

14. Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H. *et al.* (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology* **190**: 4050-4060.

15. Moron, R., Gonzalez, I., and Genilloud, O. (1999) New genus-specific primers for the PCR identification of members of the genera *Pseudonocardia* and *Saccharopolyspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 149-162.

16. Salazar, O., Moron, R., and Genilloud, O. (2000) New genus-specific primers for the PCR identification of members of the genus *Saccharomonospora* and evaluation of the microbial diversity of wild-type isolates of *Saccharomonospora* detected from soil DNAs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 2043-2055.

17. Monciardini, P., Sosio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C., and Donadio, S. (2002) New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS Microbiology Ecology* **42**: 419-429.

18. Sahin, N., Ozturk, E., Isik, K., Kariptas, E., and Ozkanca, R. (2002) Selective isolation and numerical classification of novel thermophilic streptomycetes. *Turkish Journal of Biology* **26**: 13-24.

19. Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M., and Bull, A.T. (2003) New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology* **5**: 828-841.

20. Hayakawa, M., Yoshida, Y., and Iimura, Y. (2004) Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 973-981.

21. Sahin, N. (2004) Isolation and characterization of mesophilic, oxalate-degrading *Streptomyces* from plant rhizosphere and forest soils. *Naturwissenschaften* **91**: 498-502.

22. Duangmal, K., Ward, A.C., and Goodfellow, M. (2005) Selective isolation of members of the *Streptomyces violaceoruber* clade from soil. *FEMS Microbiology Letters* **245**: 321-327.

23. Tan, G.Y.A., Ward, A.C., and Goodfellow, M. (2006) Exploration of *Amycolatopsis* diversity in soil using genus-specific primers and novel selective media. *Systematic and Applied Microbiology* **29**: 557-569.

24. Pathom-aree, W., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., and Goodfellow, M. (2006) Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* **10**: 181-189.

25. Kumar, Y., Aiemsum-ang, P., Ward, A.C., and Goodfellow, M. (2007) Diversity and geographical distribution of members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade by clade-specific PCR primers. *FEMS Microbiology Ecology* **62**: 54-63.

26. Demain, A.L. (1998) Microbial natural products: alive and well in 1998. *Nature Biotechnology* **16**: 3-4.

27. Wright, G.D. (2007) The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 175-186.

28. Stackebrandt, E. and Goebel, B.M. (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846-849.

29. Goodfellow, M., Kumar, Y., Labeda, D.P., and Sembiring, L. (2007) The *Streptomyces violaceusniger* clade: a home for streptomycetes with rugose ornamented spores. *Antonie van Leeuwenhoek* **92**: 173-199.

30. Allen, I.W., and Ritchie, D.A. (1994) Cloning and analysis of DNA sequences from *Streptomyces hygroscopicus* encoding geldanamycin biosynthesis. *Molecular and General Genetics* **243**: 593-599.

31. Fang, A., Wong, G.K., and Demain, A.L. (2000) Enhancement of the antifungal activity of rapamycin by the coproduced elaiophylin and nigericin. *The Journal of Antibiotics* **53**: 158-162.

32. Ward, A.C., and Goodfellow, M. (2004) Phylogeny and funtionality: taxonomy as a roadmap to genes. In *Microbial Diversity and Bioprospecting*. Bull, A.T. (ed). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 288-313.

33. Vezina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of Antibiotics* **28**: 721-726.

34. Tripathi, C.K.M., Praveen, V., Singh, V., and Bihari, V. (2004) Production of antibacterial and antifungal metabolites by *Streptomyces violaceusniger* and media optimization studies for the maximum metabolite production. *Medicinal Chemistry Research* **13**: 790-799.

35. El-Naggar, M.Y. (2007) Kosinostatin, a major secondary metabolite isolated from the culture filtrate of *Streptomyces violaceusniger* strain HAL64. *The Journal of Microbiology* **45**: 262-267.

36. Sun, Y., Hong, H., Samboskyy, M., Mironenko, T., Leadlay, P.F., and Haydock, S.F. (2006) Organization of the biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM 4137 for the novel neuroprotectant polyketide meridamycin. *Microbiology* **152**: 3507-3515.

37. Aiemsum-ang, P. (2009) *Isolation, Systematics and Screening of Members of the Streptomyces violaceusniger 16S rRNA Gene Clade*. PhD thesis. School of Biology, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK.

38. http://www.herbier-tahiti.pf/aff_diaporama.php?deb=192, สืบค้น 2 ธันวาคม 2555.

39. http://forumogrodnicze.info/viewtopic.php?f=33&t=3240, สืบค้น 2 ธันวาคม 2555.

40. http://www.flogaus-faust.de/e/coluarbo.htm, สืบค้น 2 ธันวาคม 2555.

41. http://www.calflora.net/bloomingplants/chinesewisteria.html, สืบค้น 2 ธันวาคม 2555.

42. http://www.hiltonpond.org/thisweek030415.html, สืบค้น 2 ธันวาคม 2555.

43. http://www.thaigardendesign.com/landscaping/2009/07/caesalpinia-pulcherrima.html, สืบค้น 2 ธันวาคม 2555.

44. http://www.bloggang.com/mainblog.php?id=peeradol33189&month=29-04-2009&group=4&gblog=4, สืบค้น 2 ธันวาคม 2555.

45. http://www.stou.ac.th/forum/display_topic_threads.asp?ForumID=13&TopicID=83302&PagePosition=1, สืบค้น 2 ธันวาคม 2555.

46. http://www.anubanms.ac.th/2010/webpage/601/60122-1/3.HTML, สืบค้น 2 ธันวาคม 2555.

47. http://www.biogang.net/biodiversity_view.php?menu=biodiversity&uid=20123&id=130756, สืบค้น 2 ธันวาคม 2555.

48. Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 316-322.

49. Herrick, J.B., Miller, D.N., Madsen, E.L., and Ghiorse, W.C. (1996) Extraction, purification and amplification of microbial DNA from sediments and soils. In *PCR: Essential Techniques*. Burke, J.F. (ed). New York, N.Y.: John Wiley & Sons, pp. 130-133.

50. Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., and Bailey, M.J. (2000) Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5488-5491.

ภาคผนวก

0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 ml

- Disodium EDTA	18.612	g
- SDW	80	ml
- ปรับให้มี pH 8.0		
- SDW จนครบ	100	ml

- ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C และความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

PCR Mixture for Eubacterial 16S rDNA Fragment (x1, 25 μl)

- TopTaq master mix (2x)	12.5	μl
- CoralLoad concentrate (10x)	2.5	μl
- 27F (10 μM)	0.5	μl
- 1525R (10 μM)	0.5	μl
- SDW	8	μl
- DNA template	1	μl

PCR Mixture for S. violaceusniger Clade 16S rDNA Fragment (x1, 25 μl)

- TopTaq master mix (2x)	12.5	μl
- CoralLoad concentrate (10x)	2.5	μl
- 27F (10 μM)	0.25	μl
- 1525R (10 μM)	0.25	μl
- SDW	8.5	μl
- DNA template	1	μl

10x TBE Buffer 1 L

- Tris	108	g
- Boric acid	55	g
- Disodium EDTA	7.44	g
- SDW จนครบ	1,000	ml

- ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C และความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

0.5x TBE Buffer 1 L

- 10x TBE buffer	50	ml
- SDW จนครบ	1,000	ml

TE Buffer (10 mM Tris and 1 mM EDTA; pH 8.0) 1 L

- 0.5 M EDTA (pH 8.0)	2	ml
- 1 M Tris-HCl (pH 8.0)	10	ml
- SDW จนครบ	1,000	ml

- ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C และความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

1 M Tris-HCl (pH 8.0) 500 ml

- Tris	60.55	g
- SDW	400	ml

- ปรับให้มี pH 8.0 ด้วย 0.1 M HCl

- SDW จนครบ	500	ml

- ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C และความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

Zhou's Extraction Buffer 1 L

- Tris	12.12	g
- EDTA	37.23	g
- Na_2HPO_4	14.2	g
- NaCl	87.66	g
- CTAB	10	g
- SDW จนครบ	1,000	ml

- ปรับให้มี pH 8.0
- ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C และความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที

คำย่อ

bp	Base pair
°C	Degree Celsius
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
g	Gram
IAA	Isoamyl alcohol
kb	Kilobase pair
L	Liter
μl	Microliter
μM	Micromolar
mg	Milligram
mg/ml	Milligram per milliliter
ml	Milliliter
PCR	Polymerase chain reaction
psi	Pound per square inch
rpm	Round per minute
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecylsulfate
SDW	Sterile distilled water
SVNF	*S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade-specific primer (forward)
SVNR	*S. violaceusniger* 16S rRNA gene clade-specific primer (reverse)
Taq	*Thermus aquaticus*
TE	Tris-ethylenediamine tetraacetic acid buffer
TBE	Tris-borate-ethylenediamine tetraacetic acid buffer
UV	Ultraviolet
V	Volt
%w/v	Percent (weight by volume)
%v/v	Percent (volume by volume)

27F	Eubacterial 16S rRNA gene-specific primer (forward)
1525R	Eubacterial 16S rRNA gene-specific primer (reverse)

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล อาจารย์พรทิพา เอี่ยมสำอางค์

สถานที่ทำงาน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

63 หมู่ 7 ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26120

โทรศัพท์ 037-395094-5 ต่อ 21624

โทรสาร 037-395096

E-mail address porntipa@swu.ac.th

ประวัติการศึกษา ภ.บ. มหาวิทยาลัยศิลปากร

Ph.D. in Molecular Microbiology, Newcastle University

ผลงานวิจัย

Kumar, Y., Aiemsum-ang, P., Ward, A.C., and Goodfellow, M. (2007) Diversity and geographical distribution of members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade by clade-specific PCR primers. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 54-63.

การนำเสนอผลงานวิจัย

Poster Presentation

Aiemsum-ang, P., Fiedler, H.-P., Goodfellow, M., and Ward, A.C. (2008) Taxonomy, metabolism and bioactivity of members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade. *At 12th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology*, Istanbul, Turkey.

Aiemsum-ang, P., Kumar, Y., Goodfellow, M., and Ward, A.C. (2007) Detection and isolation of *Streptomyces violaceusniger* strains from environmental samples. *At 14th International Symposium on Biology of Actinomycetes*, Newcastle upon Tyne, UK.

Aiemsum-ang, P., Kumar, Y., Goodfellow, M., and Ward, A.C. (2006) Recognition of *Streptomyces violaceusniger* strains from environmental samples. *At 2nd FEMS Congress of European Microbiologists*, Madrid, Spain.