การจัดกลุ่ม *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน โดยวิธีลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP

นางสาวฉวีวรรณ ปันคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GROUPING OF *Streptomyces* spp. ISOLATED FROM SOIL IN WIANGSA DISTRICT, NAN PROVINCE USING 16S-ITS RFLP FINGERPRINTING METHOD

Miss Chaweewan Punkum

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

501956

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การจัดกลุ่ม *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน โดยวิธีลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP
โดย	นางสาว ฉวีวรรณ ปันคำ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว)

ฉวีวรรณ ปันคำ : การจัดกลุ่ม *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน โดยวิธีลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP. (GROUPING OF *Streptomyces* spp. ISOLATED FROM SOIL IN WIANGSA DISTRICT, NAN PROVINCE USING 16S-ITS RFLP FINGERPRINTING METHOD) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. ธนาภัทร ปาลกะ, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 96 หน้า.

Streptomyces spp. ทั้งหมด 178 ไอโซเลตแยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ประเทศไทย เมื่อจัดกลุ่มเบื้องต้นด้วยลักษณะสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ให้ผลที่คาบเกี่ยวกันสูงมากและไม่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจน จึงได้จัดกลุ่มโดยใช้เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ของบริเวณ16S-ITS ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III ทำให้สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 11 กลุ่มใหญ่ที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน แล้วจึงจัดกลุ่มย่อยอีกครั้งโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*UI ซึ่งได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลายมากขึ้น ทำให้สามารถจัดกลุ่มย่อยได้ทั้งหมด 39 กลุ่ม หลังจากนั้นจึงคัดเลือก 29 ไอโซเลตซึ่งเป็นตัวแทนในแต่ละกลุ่ม ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA เพื่อสร้าง Phylogenetic Tree ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 14 กลุ่ม เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการจัดกลุ่มด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA ไปเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP พบว่ามีความสอดคล้องกัน แต่การจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP มีความละเอียดมากกว่า ดังนั้นเทคนิค 16S-ITS RFLP จึงเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาและจัดจำแนก *Streptomyces* spp. ในระดับสีปีชีส์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว นอกจากนี้ยังทำการคัดกรอง *Streptomyces* spp. ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยมีสายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านรา 15 ไอโซเลต และสารต้านแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ดังนั้นผลจากการจัดจำแนกและศึกษาลักษณะสมบัติต่างๆ ของ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้พบว่ามีความหลากหลายสูงจากตัวอย่างดินที่เก็บเพียงแห่งเดียว และมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงเทคโนโลยีชีวภาพของแบคทีเรียกลุ่มนี้ต่อไปได้

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

487 22548 23 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: STREPTOMYCES / 16S-ITS / RFLP / SOIL

CHAWEEWAN PUNKUM : GROUPING OF *Streptomyces* spp. ISOLATED FROM SOIL IN WIANGSA DISTRICT, NAN PROVINCE USING 16S-ITS RFLP FINGERPRINTING METHOD. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. TANAPAT PALAGA, THESIS COADVISOR ; ASSOC.PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, 96 pp.

Total of 178 *Streptomyces* isolates were obtained from soil samples collected in Wiangsa District, Nan province, Thailand. Initial grouping based on morphological, physiological and biochemical characteristics resulted in overlapping groups and distinctive groupings could not be obtained. Therefore, grouping based on analysis of DNA fingerprinting of restriction fragment length polymorphism (RFLP) of 16S-ITS digested with restriction enzyme *Hae*III was performed. Isolated strains were classified into 11 groups with similar DNA fingerprint patterns. In addition, RFLP DNA fingerprints using *Bst*UI digestion gave more diversed patterns and 39 subgroups were obtained. One representative strain for each of the 39 groups were further analyzed for 16S rDNA sequences, and phylogenetic tree was constructed. Fourteen clusters were obtained from phylogenetic tree. By comparison of the grouping results from the 16S-ITS RFLP with 16S rDNA sequences, the 16S-ITS RFLP fingerprinting provided a higher resolution than 16S rDNA sequencing-based analysis. These results indicated that 16S-ITS RFLP fingerprinting technique was effective in studying classification and characterization the level of species in *Streptomyces*. Moreover, screening for *Streptomyces* spp. capable of producing antimicrobial compounds was performed, Fiveteen isolates were found to have antifungal activity while 10 isolates produced antibacterial compounds. In conclusion, grouping and characterization of *Streptomyces* spp. isolated from soil samples collected from just one district of Thailand were highly diversed and could be used for biotechnological exploitation of these bacteria.

Department.....Microbiology.....Student's signature.....Chaweewan Punkum.....
Academic year.....2007.....Advisor's signature.....Tanapat Palaga.....
Co-advisor's signature..Pairoh Pinphanichakarn.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆแก่ผู้วิจัย ในทุกขั้นตอน ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำ ความรู้ต่างๆแก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างดินจากอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ และรองศาสตราจารย์ ดร. จริยา เล็กประยูร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์ภาพถ่ายบริเวณเก็บตัวอย่างดิน

ขอบพระคุณงบประมาณแผ่นดินภายใต้โครงการวิจัยการจัดการทรัพยากรเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืนของจังหวัดน่าน ปีงบประมาณ 2548-2550 ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยงานวิจัยนี้

ขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือใช้ในงานวิจัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านในการอำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือด้านต่างๆตลอดงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี ตลอดจน พี่ๆ เพื่อน น้องๆ สำหรับทุกความห่วงใย ความช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยผลักดันและให้การสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการเรียน และเป็นกำลังใจที่ยิ่งใหญ่ ขอบใจน้องชายที่คอยส่งข่าวความเป็นไปทางครอบครัว และให้กำลังใจตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ..... ฑ
บทที่
1 บทนำ..... 1
2 ปริทัศน์วรรณกรรม 5
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 19
4 ผลการทดลอง..... 35
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 61
รายการอ้างอิง..... 65
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก..... 71
ภาคผนวก ข..... 76
ภาคผนวก ค..... 79
ภาคผนวก จ..... 80
ภาคผนวก ฉ..... 88
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 95

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	วงจรชีวิตของ *streptomyces*	6
2.2	ภาพจากล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงการแบ่งสายใยอากาศของ *Streptomyces coelicolor* A3	6
2.3	รูปแบบการเรียงตัวของสปอร์และการแตกกิ่งก้านของสายสปอร์ที่แตกต่างกันของ *Streptomyces* spp	7
2.4	โครงสร้างทุติยภูมิของ 16S rRNA จาก *Streptomyces coelicolor*	15
2.5	ไดอะแกรมของ 16S-23S intergenic spacer region ของ *S. albidoflavus*	15
3.1	แผนที่แสดงบริเวณเก็บตัวอย่างดิน	22
4.1	ตัวอย่างการวิเคราะห์จีโนมิคดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรซิสของตัวแทนกลุ่ม *Streptomyces* spp	45
4.2	ตัวอย่างผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ของไอโซเลต D230701 โดยใช้จีโนมิคดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่างๆ	46
4.3	ไดอะแกรมบริเวณ 16S rDNA-ITS-23S rDNA และบริเวณที่ไพรเมอร์ต่างๆ จำเพาะ ที่ใช้ทำการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR	47
4.4	ตัวอย่างการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรซิสของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ 16S-ITS มีขนาดประมาณ 1800 bp ของ *Streptomyces* spp. ที่เป็นตัวแทนกลุ่ม	47
4.5	ตัวอย่างการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรซิสของผลิตภัณฑ์ PCR 16S rDNA	54
4.6	Phylogenetic Tree ของตัวแทน *Streptomyces* spp.ทั้ง 29 ไอโซเลต	50

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่สร้างจาก *Streptomyces* สปีชีส์ต่าง ๆและเป้าหมายของการออกฤทธิ์ 10

3.1 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์..... 21

3.2 รหัสลักษณะของพื้นที่ที่เก็บดินตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่เก็บ..... 23

3.3 องค์ประกอบของปฏิกิริยาในการเกิดปฏิกิริยา PCR..... 28

3.4 องค์ประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ..... 29

4.1 จำนวนเชื้อที่แยกได้ทั้ง 4 บริเวณ ภายใต้สภาวะต่าง ๆ..... 35

4.2 การจัดกลุ่ม *Streptomyces* จากสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี..... 36

4.3 ผลการจัดกลุ่มลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III..... 49

4.4 ผลการจัดกลุ่มลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*UI..... 51

4.5 การเปรียบเทียบการจัดกลุ่มด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA กับ การจัดกลุ่มด้วยข้อมูล 16S-ITS RFLP..... 57

4.6 แสดงความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดจากการสร้างสารต้านจุลชีพของ *Streptomyces* ทั้ง 18 ไอโซเลต..... 60

สัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	เปอร์เซ็นต์
1x	=	1 เท่า
5x	=	5 เท่า
pH	=	ความเป็นกรด-ด่าง
A	=	absorbance
bp	=	base pair
dNTP	=	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
β	=	beta
α	=	alpha
γ	=	gamma
ATCC	=	American type culture collection
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
PCR	=	polymerase chain reaction
HPLC	=	high performance liquid chromatography
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphysm
16S rDNA	=	16S ribosomal DNA
23S rDNA	=	23S ribosomal DNA
DNA	=	deoxyribonucleic acid
ITS	=	Internal transcribe spacer regions
RIS	=	Ribosomal intergenic spacer regions
16S-ITS	=	16S ribosomal DNA to Internal transcribe spacer regions
V	=	variable regions
C	=	conserved regions
µl	=	ไมโครลิตร
µM	=	ไมโครโมลาร์