

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

นางสาวฉวีวรรณ ปันคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา¹
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

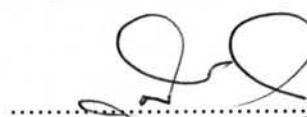
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

501956

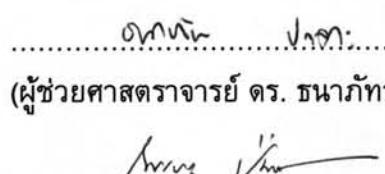
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การจัดกลุ่ม *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินในอำเภอเวียงสา
โดย จังหวัดอุบลราชธานี โดยวิธีลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP
สาขาวิชา นางสาว ฉวีวรรณ ปันคำ
อาจารย์ที่ปรึกษา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
รองศาสตราจารย์ ดร. ไพรeras ปันพาณิชการ

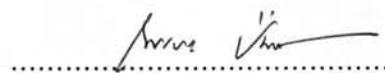
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

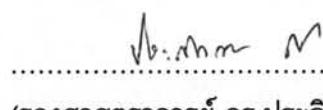

..... คณะดีคคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ชนะย์วน)


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


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพรeras ปันพาณิชการ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตศรีสิน สิงหน闷)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรา เพียภูเรียว)

ฉวีวรรณ บันคำ : การจัดกลุ่ม *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินในอำเภอเวียงสา จังหวัด
น่าน โดยวิธีลักษณะสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีริวิทยา และ
ชีวเคมี ให้ผลที่คำนวณกันสูงมากและไม่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจน จึงได้จัดกลุ่มโดยใช้เทคนิค^๑
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ของบริเวณ 16S-ITS ที่ตัด
ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III ทำให้สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 11 กลุ่มใหญ่ที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
เหมือนกัน แล้วจึงจัดกลุ่มย่อยอีกรังโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*I ซึ่งได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
เช่นเดียวกัน ทำให้สามารถจัดกลุ่มย่อยได้ทั้งหมด 39 กลุ่ม หลังจากนั้นจึงคัดเลือก 29
ไอโซเลตซึ่งเป็นตัวแทนในแต่ละกลุ่ม ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA เพื่อ^๒
สร้าง Phylogenetic Tree ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 14 กลุ่ม เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการจัดกลุ่มด้วย^๓
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA ไปเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS
RFLP พบว่ามีความสอดคล้องกัน แต่การจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ 16S-ITS RFLP มีความละเอียด
มากกว่า ดังนั้นเทคนิค 16S-ITS RFLP จึงเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาและจัดจำแนก
Streptomyces spp. ในระดับสปีชีส์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว นอกจากนี้ยังทำการคัดกรอง^๔
Streptomyces spp. ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยมีสายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านรา 15
ไอโซเลต และสารต้านแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ดังนั้นผลจากการจัดจำแนกและศึกษาลักษณะสมบัติ
ต่างๆ ของ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้พบว่ามีความหลากหลายสูงจากตัวอย่างดินที่เก็บเพียงแห่ง
เดียว และมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงเทคโนโลยีชีวภาพของแบคทีเรียกลุ่มนี้ต่อไปได้

ภาควิชา จุลชีววิทยา

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต..... น.ส. วนิดา บุญญา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... ดร. พ. ภานุพงษ์ ภานุพงษ์

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 diverse 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, Fifteen 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 diverse and could be used for biotechnological exploitation of these bacteria.

Department.....Microbiology.....Student's signature.....Chaweewan Punkum.....

Academic year.....2007.....Advisor's signature.....Tunapit Palaga.....

Co-advisor's signature.....Paih Pinphakarn.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพระ ปั่นพาณิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็น ต่างๆแก่ผู้วิจัย ในทุกขั้นตอน ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขด้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่ง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ชนียวนัน ที่กรุณารับเป็นประธาน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตดีสิน สีหనนทน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตต์ตรา เพียงกุเยียว ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ คำแนะนำ ความรู้ต่างๆแก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตดีสิน สีหนนทน์ ที่ให้ความ อนุเคราะห์ในการเก็บด้วยตัวเองจากอำเภอเวียงสา จังหวัด南 ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ และรอง ศาสตราจารย์ ดร. จริยา เล็กประยูร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์ภาพถ่ายบริเวณเก็บด้วยตัวเอง

ขอบพระคุณงบประมาณแผ่นดินรายได้โครงการวิจัยการจัดการทรัพยากรเพื่อการ พัฒนาอย่างยั่งยืนของจังหวัด南 ปีงบประมาณ 2548-2550 ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย งานวิจัยนี้

ขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือใช้ในงานวิจัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านในการอำนวย ความสะดวกและความช่วยเหลือด้านต่างๆตลอดงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี ตลอดจน พี่ๆ เพื่อน น้องๆ สำหรับทุกความห่วงใย ความช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่เคยผลักดันและให้การสนับสนุน ค่าใช้จ่ายในการเรียน และเป็นกำลังใจที่ยิ่งใหญ่ ขอบใจน้องชายที่เคยส่งข่าวความเป็นไปทาง ครอบครัว และให้กำลังใจตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	๕
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๖
กิตติกรรมประกาศ.....	๗
สารบัญ.....	๘
สารบัญตาราง.....	๙
สารบัญภาพ.....	๑๐
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	๑๑
บทที่	
1 บทนำ.....	๑
2 ปริทัศน์วรรณกรรม	๕
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	๑๙
4 ผลการทดลอง.....	๓๕
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	๖๑
รายการอ้างอิง.....	๖๕
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	๗๑
ภาคผนวก ข.....	๗๖
ภาคผนวก ค.....	๗๙
ภาคผนวก จ.....	๘๐
ภาคผนวก ฉ.....	๘๘
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	๙๕

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่

2.1	วงจรชีวิตของ <i>streptomyces</i>	6
2.2	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงการแบ่งสาขายield ของ <i>Streptomyces coelicolor A3</i>	6
2.3	รูปแบบการเรียงตัวของสปอร์และการแตกกิ่งก้านของสาขสปอร์ที่แตกต่างกันของ <i>Streptomyces spp</i>	7
2.4	โครงสร้างทุติยภูมิของ 16S rRNA จาก <i>Streptomyces coelicolor</i>	15
2.5	ไ道แกรมของ 16S-23S intergenic spacer region ของ <i>S. albidoflavus</i>	15
3.1	แผนที่แสดงบริเวณเก็บตัวอย่างดิน.....	22
4.1	ตัวอย่างการวิเคราะห์ Jinomicidie บน袍การโรสเจลอิเล็กโทรโฟร์ซิสของตัวแทนกลุ่ม <i>Streptomyces spp</i>	45
4.2	ตัวอย่างผลการทำ袍การโรสเจลอิเล็กโทรโฟร์ซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ของไอโซเลต D230701 โดยใช้ Jinomicidie เอ็นเอที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	46
4.3	ไ道แกรมบริเวณ 16S rDNA-ITS-23S rDNA และบริเวณที่เพรเมอร์ต่างๆ จำเพาะ ที่ใช้ทำการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR.....	47
4.4	ตัวอย่างการทำ袍การโรสเจลอิเล็กโทรโฟร์ซิสของผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ 16S-ITS มีขนาดประมาณ 1800 bp ของ <i>Streptomyces spp</i> . ที่เป็นตัวแทนกลุ่ม.....	47
4.5	ตัวอย่างการทำ袍การโรสเจลอิเล็กโทรโฟร์ซิสของผลิตภัณฑ์ PCR 16S rDNA.....	54
4.6	Phylogenetic Tree ของตัวแทน <i>Streptomyces spp</i> . ทั้ง 29 ไอโซเลต.....	50

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1	ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่สร้างจาก <i>Streptomyces</i> สปีชีส์ต่าง ๆ และเป้าหมายของการ ออกแบบ.....	10
3.1	โอลิโกนิวคลีโอไทด์เพรเมอร์.....	21
3.2	รหัสลักษณะของพื้นที่ที่เก็บดินตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่เก็บ.....	23
3.3	องค์ประกอบของปฏิกิริยาในการเกิดปฏิกิริยา PCR.....	28
3.4	องค์ประกอบในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	29
4.1	จำนวนเชือกที่แยกได้ทั้ง 4 บริเวณ ภายใต้สภาวะต่างๆ.....	35
4.2	การจัดกลุ่ม <i>Streptomyces</i> จากสังฆภัณฑ์ สาขาวิชาและลักษณะทางชีวเคมี.....	36
4.3	ผลการจัดกลุ่มลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HaeIII</i>	49
4.4	ผลการจัดกลุ่มลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BstUI</i>	51
4.5	การเปรียบเทียบการจัดกลุ่มด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA กับ การจัดกลุ่ม ด้วยข้อมูล 16S-ITS RFLP.....	57
4.6	แสดงความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส่ที่เกิดจากการสร้างสารต้านจุลชีพของ <i>Streptomyces</i> ทั้ง 18 ไอโซเลต.....	60

ສัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	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
μ l	=	ไมโครลิตร
μ M	=	ไมโครโมลาร์