สำนักหอสมุด

อภินันทนาการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง ผลการต้านมะเร็ง ผ่านการยับยั้งขบวนการสร้างไขมัน ดี โนโว ของสารสกัดจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียในดินป่าไม้ อุทยานแห่งชาติน้ำหนาวประเทศไทย

(R2559B130)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 22 มิ.ค. 2565
เลขทะเบียน 104857
เลขเรียกหนังสือ ว QK 47 .A35 ด44๑๙ 2563

ผศ.ดร.ดำรงศักดิ์ เป๊กทอง
ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก

บทคัดย่อ

จากการนำแบคทีเรียจากดินและพืชในประเทศไทยมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ขั้นต้น จำนวน 14 สายพันธุ์ โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว ประเทศไทย และ จาก ดินรอบรากขิงที่ปลูกใน อ.บางกระทุ่ม จ. พิษณุโลก จำนวน 2 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ แยกได้จากรากของต้นข้าวจำนวน 9 ไอโซเลท เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการวิจัยโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณยีน 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในเขตอุทยานแห่งชาตินำ้หนาว ประเทศไทย คือ ไอโซเลท S1 และ S2 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus tequilensis* และ *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* มากที่สุด โดยมีความเหมือนเท่ากับ 99.86% และ 99.86% ตามลำดับ แบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลทที่แยกได้จากดินรอบรากขิง และ รากของข้าวพบว่าจัดอยู่ในกลุ่มของแอคติโนแบคทีเรียโดย จัดอยู่ในจีนัส *Microbispora* sp. 2 ไอโซเลท (HML2 และ LPL) และ *Streptomyces* sp. 10 ไอโซเลท การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียของ 4 ไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีและมีปริมาณสารสารสกัดที่สูง ได้แก่ JPN2, B14, Zin05 และ B19 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces kunmingensis*, *Streptomyces coerulescens*, *Streptomyces californicus* และ *Streptomyces variabilis* ตามลำดับ โดยมี % identity เท่ากับ 99 %

การเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดแยกสารทุติยภูมิจะใช้อาหารที่แตกต่างกัน โดย *Bacillus* 2 ไอโซเลทจะเพาะเลี้ยงบนอาหาร 2 ชนิด (Glucose yeast peptone broth medium และ 2) Yeast extract peptone dextrose agar) และเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 27 และ 37 °C เป็นเวลา 7 และ 15 วัน สำหรับแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท จะเพาะเลี้ยงบนอาหาร ISP2 broth บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน

การสกัดแยกสารทุติยภูมิจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้วิธี liquid-liquid partition โดยใช้ไดคลอโรมีเทนซึ่งจะได้สารกลุ่มมีขั้วน้อย และเอทิลอะซิเตทจะได้สารกลุ่มมีขั้วปานกลาง ผลของการสกัดพบว่าสารจาก Bacillus ทั้ง 2 ไอโซเลท มีปริมาณผลผลิตของสารสกัด (หมายเลข 1-32) ในช่วง 7-120 % yield (ได้สารสกัดในหน่วยมิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร) เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีขั้นต้นของสารสกัดในชั้นต่าง ๆ โดยวิธี thin layer chromatography พบว่าสารสกัดหมายเลข 4,8,12,16,19,20,23,24,28 และ 32 มีองค์ประกอบทางเคมีที่ใกล้เคียงกับสารสกัดจาก S1 และ S2 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเซลมะเร็งที่เคยมีการทดสอบในการทดลองขั้นต้นในการทดลองก่อนหน้า และมีร้อยละผลผลิตที่มากพอที่จะนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอต่อการศึกษาขั้นถัดไปได้ จึงได้นำสารสกัดทั้ง 10 ชนิดนี้มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเชิงปริมาณ พบว่าสารสกัดทั้ง 10 ชนิดมีปริมาณสารในกลุ่มฟินอลิคในช่วง 108-395 mg gallic acid equivalent/g extract, ปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์พบได้น้อย เฉพาะสารสกัดย่อยหมายเลข 16 มี 11 mg rutin equivalent/g extract, ปริมาณสารในกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคลไซด์ พบได้ในหลายสารสกัดแตกต่างกันไปในช่วง 4-337 mg digoxin equivalent/g extract, ปริมาณสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ตรวจไม่พบเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน berberine chloride และ ปริมาณสารในกลุ่มไทรเทอพีนอยด์พบในปริมาณค่อนข้างสูงในช่วง 98-237 mg ursolic acid equivalent/g extract เมื่อนำสารสกัดทั้ง 10 ชนิดนี้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นในโครงการย่อย 2 พบว่าสารสกัดหมายเลข 4, 8, 20, 23, 24, 28 และ 32 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HepG2 ในหลอดทดลองค่อนข้างสูงโดยในจำนวนนี้สารสกัดหมายเลข 20, 24 และ 32 มีร้อยละผลผลิตค่อนข้างมาก

สารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียพบว่าได้ปริมาณสารสกัดมีร้อยละผลผลิตในช่วง 3-21 mg% yield โดยชั้นไดคลอโรมีเทนของไอโซเลท JPN2 มีร้อยละผลผลิตค่อนข้างมากอีกทั้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลมะเร็ง HepG2 ในหลอดทดลองค่อนข้างสูง เชื้อไอโซเลท JPN2 (*Streptomyces kunmingensis* ระบุสปีชีส์ของเชื้อจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 16S rDNA ยีนแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI) จึงถูกเลือกนำไปเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณมากขึ้น (25 ลิตร) ได้สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน 858 mg (ร้อยละผลิต3.4) เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลมะเร็งตับในโครงการ 2 ต่อไป จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่าเชื้อที่นำมาศึกษาทั้ง 14 ไอโซเลท (จาก *Bacillus* sp. และ แอคติโนแบคทีเรีย) สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลมะเร็ง HepG2 ในหลอดทดลองค่อนข้างสูง มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อเนื่องเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้มาจากความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทยต่อไป

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
1. บทนำ	
หลักการเหตุผลและระบุสาเหตุที่ต้องดำเนินการวิจัย	5
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	5
2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	6
3. ระเบียบวิธีวิจัย	
เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย	13
การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย	13
การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S1 และ S2 และแอคติโนแบคทีเรีย	14
การวิเคราะห์สารทุติยภูมิแต่ละกลุ่มเชิงปริมาณ	15
4. ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ผลการวิจัย	
การจัดจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S1 และ S2	20
การจัดจำแนกชนิดเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากข้าว	26
ร้อยละและลักษณะของผลผลิตของการสกัดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus tequilensis* (S1) และ *Bacillus subtilis* (S2)	34
TLC fingerprint ของสารสกัดจากเชื้อ *Bacillus tequilensis* (S1) และ *Bacillus sublitis* (S2)	35
การวัดปริมาณกลุ่มสารทุติยภูมิในสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus tequilensis* (S1) และ *Bacillus sublitis* (S2)	37
ร้อยละและลักษณะของผลผลิตของการสกัดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย 12 isolates	40
TLC fingerprint ของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย 12 isolates	42
5. สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อแสนอแนะ	43
6. เอกสารอ้างอิง	44

1. หลักการเหตุผลและระบุสาเหตุที่ต้องดำเนินการวิจัย

แอคติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria) เป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญที่มีรายงานการพบสารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (Primary metabolites) และสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) หลายชนิดซึ่งกำหนดการสร้างโดยยีนบนโครโมโซมของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว สารเมตาบอไลต์ที่แอคติโนแบคทีเรียสร้างมีความหลากหลายทั้งชนิด และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านจุลชีพ(Antimicrobials) สารต้านมะเร็ง (Anticancer) และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulants) เป็นต้น [Jensen and William, 1994; Zheng et al., 2000; Fiedler et al., 2005; Jensen et al., 2007; William, 2008; Olano et al., 2009]

นอกจากความหลากชนิด (Species diversity) และความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) แอคติโนแบคทีเรียมีความหลากหลายของแหล่งอาศัย (Habitat diversity, Ecological diversity) ตัวอย่างแหล่งอาศัยสำคัญที่พบการแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ ส่วนต่างๆของพืช ดินและตะกอนดินต่างๆ เป็นต้น [Reddy et al., 2009; Oliveira et al., 2010; Ros et al., 2010] ทั้งนี้ดินเป็นแหล่งอาศัยที่มีความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียค่อนข้างสูง โดยยืนยันจากรายงานการวิจัยในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาที่มีรายงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในระดับนานาชาติ เช่น International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Antonie van Leeuwenhoek, FEMS Microbiology Ecology และ Current Microbiology เป็นต้น [Cho et al., 2008; Dastager et al., 2009; Chen et al., 2010; Kopecky et al., 2011] ทั้งนี้ดินในป่าไม้เขตร้อน เช่น ป่าไม้ในพื้นที่อนุรักษ์ของประเทศไทยที่กระจายตัวในอุทยานแห่งชาติและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ได้รับการคาดหมายว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ รวมทั้งแอคติโนแบคทีเรียในระดับสูง อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความหลากชนิด ความหลากหลายทางพันธุกรรม รวมทั้งชนิดและศักยภาพในการใช้ประโยชน์ของสารเมแทบอไลต์ที่ผลิตโดยเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียที่อาศัยในดินป่าไม้ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ของไทยมีรายงานค่อนข้างน้อย และจำกัด ดังนั้นการวิจัยภายใต้แผนงานที่นำเสนอจึงมุ่งเน้นในการศึกษาความหลากชนิดของแอคติโนแบคทีเรียหรือจุลชีพอื่นในดินป่าไม้ของอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความสมบูรณ์ของระบบนิเวศป่าไม้สูงมากแห่งหนึ่ง และแอคติโนแบคทีเรียที่อยู่ในดินหรือรากของพืชที่อยู่ใน จ.พิษณุโลก ประเทศไทย โดยใช้เทคนิคอนุกรมวิธานดั้งเดิมและสมัยใหม่ บูรณาการกับเทคนิคการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ทำให้นำสู่การค้นพบแอคติโนแบคทีเรียหรือแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีศักยภาพสูงในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความหลากชนิด และมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง รวมทั้งสรรสร้างให้เกิดองค์ความรู้พื้นฐานสำคัญในการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคตในด้านที่เกี่ยวข้อง เพื่อยังประโยชน์ด้านการแพทย์ และสาธารณสุขของไทย นำสู่ผลสัมฤทธิ์สูงสุดต่อคุณภาพทางสังคม ในการเพิ่มศักยภาพในการพึ่งตนเอง ความสามารถในการแข่งขันของประเทศ และการยกระดับคุณภาพชีวิตของประชาชนในประเทศไทย

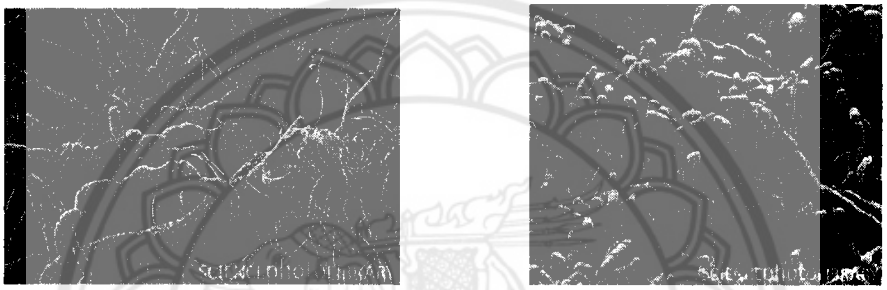
วัตถุประสงค์

เพื่อการแยกสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณมาก จากแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากดิน ซึ่งนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ การเกษตร และด้านอื่นๆ ในอนาคต

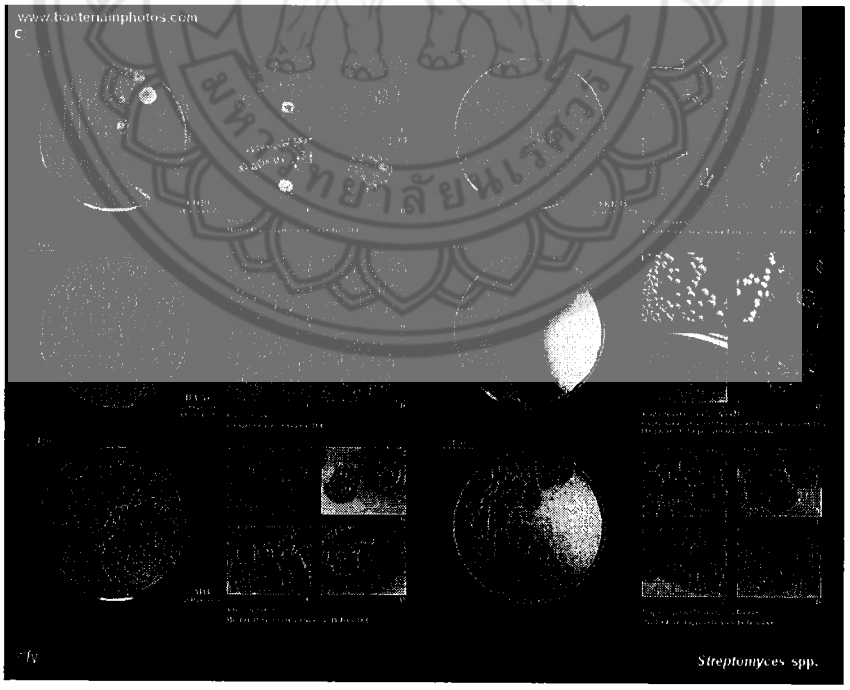
2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

แอคติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria)

แอคติโนแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสก้วนีนและไซโตซีน ในกรดนิวคลีอิกสูงกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ พบได้ทั่วไปในแหล่งอาศัยธรรมชาติ เช่น ดิน (Glazer and Nikaido, 1994) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา โดยมีเส้นใย (mycelium) แตกกิ่งก้าน และสามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า conidiospore หรือ conidia ซึ่งเป็นสปอร์แบบไม่มีถุงหุ้ม ลักษณะเป็นเม็ดเดี่ยวๆ เรียงกันเป็นสาย และสปอร์แบบที่มีถุงหุ้ม เรียกว่า sporangiospore อยู่ในถุงหุ้มที่เรียกว่า sporangium แอคติโนแบคทีเรีย มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายตั้งแต่ลักษณะเป็นทรงกลม ท่อน และเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา รวมถึงโคโลนีของเชื้อมีลักษณะที่หลากหลาย โดยอาจพบโคโลนีมีสีแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของรงควัตถุที่สร้างโดยแอคติโนแบคทีเรีย ต่างสายพันธุ์หรือชนิดกัน (Goodfellow and Brand, 1980) แสดงดังรูปที่ 1 และ รูปที่ 2



รูปที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่มา:www.sciencephoto.com/media/13158/view



รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีและสีของรงควัตถุของเซลล์แอคติโนแบคทีเรีย

ที่มา: http://www.bacteriainphotos.com/Streptomyces%20colonies.jpg

แอคติโนแบคทีเรีย ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ยกเว้นบางชนิดที่ไม่ต้องการหรือต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเพื่อการเจริญ ผนังเซลล์ประกอบด้วยชั้นของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) กรดมิวรามิก (muramic acid) กรดไดอะมิโนไพมีริก (diaminopimelic acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย แต่ไม่มีส่วนของไคติน (chitin) และ เซลลูโลส (cellulose) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ (major wall amino acid) และชนิดของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบภายในเซลล์ทั้งหมด สามารถแบ่งผนังเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรีย เป็น 4 ชนิด (ตารางที่ 1) และจัดแบบแผนน้ำตาลที่พบเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ แอคติโนแบคทีเรีย โดยสรุปในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอคติโนแบคทีเรีย

ชนิด	องค์ประกอบหลัก	กรดอะมิโนสำคัญที่พบ
I	L-Diaminopimelic acid (L-DAP)	glycine
II	meso-Diaminopimelic acid (meso-DAP)	glycine
III	meso*-Diaminopimelic acid (meso-DAP or OH-DAP)	None
IV	meso-Diaminopimelic acid (meso-DAP)	None

หมายเหตุ * อาจพบในรูปของ 3-hydorxy aminopimelic acid

ที่มา: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4 (William, 1989)

ตารางที่ 2 ชนิดและน้ำตาลที่พบเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แอคติโนแบคทีเรีย

ชนิด	น้ำตาลที่พบเป็นองค์ประกอบ
A	arabinose, galactose
B	madurose*
C	none
D	xylose, arabinose

หมายเหตุ *madurose คือ 3-O-methyl-D-galactose

ที่มา: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4 (William, 1989)

แอคติโนแบคทีเรีย มีความสำคัญในระบบนิเวศ และมีบทบาทต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน โดยแอคติโนแบคทีเรีย มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่หลายชนิด เช่น เซลลูโลส ไคติน และลิกนิน เป็นต้น ทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้แอคติโนแบคทีเรีย สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีประโยชน์ เช่น สารต้านจุลชีพ สารต้านมะเร็ง และวิตามินชนิดต่างๆ เป็นต้น (Berdy, 2005) สำหรับสารต้านจุลชีพที่มีใช้ในปัจจุบันประมาณสองในสามผลิตโดยแอคติโนแบคทีเรีย (Takizawa et al., 1993) ตัวอย่างสารต้านจุลชีพที่ได้จากแอคติโนแบคทีเรีย เช่น streptomycin, gentamycin และ rifamycin คิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ของสารต้านจุลชีพ ที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อในปัจจุบัน (Ningthoujam et al., 2009) อย่างไรก็ตามการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับแอคติโนแบคทีเรีย ในระยะแรกๆ มักเป็นการศึกษาจากแหล่งอาศัยในระบบนิเวศบนบกเป็นส่วนใหญ่ จวบจนในช่วงทศวรรษที่ผ่านมามีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความหลากชนิดของแอคติโนแบคทีเรีย ในแหล่งอาศัยตามธรรมชาติ โดยเฉพาะในระบบนิเวศทางทะเล และค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ อย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน โดยนักวิทยาศาสตร์ในต่างประเทศ

การจัดจำแนกแอคติโนแบคทีเรีย (Classification of Actinobacteria)

การจัดจำแนกแอคติโนแบคทีเรีย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ ตามหลักการใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4 (William, 1989) แบ่งแอคติโนแบคทีเรียเป็น 8 กลุ่มได้แก่ *Norcadioforms*, *Actinomycetes* with multilocular sporangia, *Actinoplanetes*, *Streptomycetes*, *Maduromycetes*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomycetes* และกลุ่มที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มที่กล่าวมาทั้งหมด

1. *Nocardioforms*

เป็นแอคติโนแบคทีเรีย กลุ่มที่เส้นใยมีการแตกหักเป็นแบบแท่งหรือกลม บางสายพันธุ์มีการสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) บางสายพันธุ์สร้างโคนิเดีย แอคติโนแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ยกเว้น Oerskoviae ซึ่งเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ เชื้อในกลุ่มนี้ผนังเซลล์เป็นแบบที่หนึ่ง (I) (องค์ประกอบหลัก คือ L-DAP และ glycine) ในสกุล Nocardia และ Rhodococcus ผนังเซลล์มีกรดมัยโคลิก (mycolic acid) และมีแบบแผนน้ำตาลในเซลล์เป็นชนิด A (องค์ประกอบหลัก คือ arabinose และ galactose)

2. *Actinomycetes* with multilocular sporangia

เป็นแอคติโนแบคทีเรีย กลุ่มที่มีการสร้างผนังกั้นตามยาว และตามขวาง สร้างสปอร์ขนาดใหญ่ มีทั้งหมด 3 สกุล ได้แก่ Dermatophilus, Geodermatophilus และ Frankia โดยมีลักษณะแตกต่างกัน คือ Geodermatophilus มีเส้นใยง่ายๆ ที่ยังไม่พัฒนามากนัก thallus ทั้งหมดสร้างเป็น sporangium ส่วน Dermatophilus เส้นใยจะมีการพัฒนามากขึ้น มีการสร้าง multilocular sporangium แบบยาว โดยทั้งสองสกุลสามารถสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (motile spores) สำหรับสกุล Frankia สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ในสภาพไมโครแอโรฟิลิก (microaerophilic condition) หรือสภาพที่มีออกซิเจนจำกัดมาก มีการสร้าง

sporangium และ เส้นใยบริเวณ intercalary swelling ตอนปลายหรือ lateral branches แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศ

3. *Actinoplanetes*

แอคติโนแบคทีเรียในกลุ่มนี้มี 5 สกุล ได้แก่ *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Pilimelia*, *Dactylosporangium* และ *Micromonospora* ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตในแหล่งน้ำ เพราะเป็นกลุ่มที่สร้างสปอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ในน้ำในช่วงหนึ่งของวงจรชีวิต ยกเว้น *Micromonospora* สำหรับพวกที่สร้างสปอร์แบบเคลื่อนที่ได้ใน sporangia หรือ vesicle ซึ่งมีการพัฒนาที่ส่วนปลายของ sporangiophore มีทั้งขนาดสั้น และยาว สปอร์มักถูกสร้างอยู่ใน sporangium ที่ถูกปกคลุมไว้ด้วยกิ่งก้านที่แตกหัก หรือบางทีก็เป็นเส้นใยของ sporogenous hyphae ตรงหรือขดเป็นเกลียว ส่วนของ multisporous sporangia มีหลายรูปร่าง โดยลักษณะสำคัญของแอคติโนแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ เจริญโดยไม่มีการแตกหัก มีการแตกกิ่งก้านแล้วสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยที่มีผนังกั้น ผนังเซลล์เป็นแบบ III (องค์ประกอบหลัก คือ meso-DAP และ OH-DAP) และมีแบบแผนน้ำตาลในเซลล์เป็นชนิด D (องค์ประกอบหลัก คือ xylose และ arabinose) ในส่วนของ Micromonospora จะสร้างสปอร์แบบไม่เคลื่อนที่ เกิดขึ้นเดี่ยวๆ ไม่มีก้านหรือมีเพียงสั้นๆ มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีลักษณะกลม รูปไข่หรือวงรี บางครั้งพบตุ่มหรือหนามที่ผิว

4. *Streptomycetes* และเชื้อในสกุลที่เกี่ยวข้อง

แอคติโนแบคทีเรีย กลุ่มนี้ประกอบด้วย 5 สกุล ได้แก่ *Streptomyces*, *Streptovertcillium*, *Kineosporia*, *Intrasporangium* และ *Sporichthya* ลักษณะสำคัญคือ เส้นใยอากาศ เป็นแบบไม่มีผนังกั้น และเมื่อเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์เป็นลูกโซ่ มีจำนวนสปอร์ตั้งแต่ 3 สปอร์ขึ้นไป เช่น Streptomyces และ Streptoverticillium ส่วนในสกุล *Kineosporia*, *Intrasporangium* และ *Sporichthya* มีการสร้างสายใยอากาศน้อย หรืออาจไม่สร้าง และสปอร์มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ลักษณะบริเวณผิวของโคโลนีมีลักษณะย่นเมื่อมีอายุมาก สปอร์ที่สร้างขึ้นบริเวณผิวหน้าของเส้นใยมีลักษณะเป็นฝุ่นผง เชื้อในกลุ่มนี้มี L-DAP ผนังเซลล์เป็นแบบ I และมีไกลซีนเป็นองค์ประกอบ

5. *Masuromycetes*

แอคติโนแบคทีเรียกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 7 สกุล ได้แก่ *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora* และ *Streptosporangium* ต้องการออกซิเจนในการเจริญ สร้างเส้นใยราบที่มีการแตกแขนง ไม่มีสปอร์ แต่มีเส้นใยอากาศซึ่งมีการสร้าง arthrospore ที่มีลักษณะเป็นสายสั้น หรือใน sporangia ที่มีตั้งแต่หนึ่งถึงหลายสปอร์ โดยในสกุล Microbispora มีการสร้างสปอร์สายสั้นๆ แบบสองสปอร์ (disporous) ในสกุล Actinomadura มีการสร้างสปอร์แบบหลากหลาย ในบางสายพันธุ์มีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์แบบเคลื่อนที่ได้ ได้แก่ Planobispora, Planomonospora และ Spirillospora ส่วนสายพันธุ์มีการสร้างสปอร์แบบเคลื่อนที่ไม่ได้ ได้แก่ Streptosporangium ผนังเซลล์ของเชื้อในกลุ่มนี้เป็นแบบ III (meso-DAP) น้ำตาลในเซลล์เป็นแบบ type B คือน้ำตาล 3-O-methyl-D-galactose (madurose)

6. Thermomonospora และสกุลที่ใกล้เคียง

แอคติโนแบคทีเรีย ในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล ได้แก่ Thermomonospora, Actinosynnema, Nocardiopsis และ Streptoalloterichus โดยพบว่า Thermomonospora สร้างสปอร์แบบเดี่ยว ส่วน Actinosynnema และ Nocardiopsis สร้างสปอร์เป็นสาย และเชื้อในกลุ่มของ Streptoalloterichus สร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ โดยเชื้อในกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ และสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยที่แตกกิ่งก้านชูขึ้นในอากาศ ผนังเซลล์เป็นแบบ III (องค์ประกอบหลัก คือ meso-DAP) ไม่มีกรดมัยโคลิกในชั้นเปปติโดไกลแคน แต่มีฟอสโฟไลปิด (phospholipids) เมนาควิโนน (menaquinone, MK) และกรดไขมัน (fatty acids) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเซลล์ที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มี MK-9 (H4, H6 และ H8) เป็น isoprenologes เช่น T. sensustricto, T. mesophila และกลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มที่มี MK-10 (H6 และ H8) เป็น isoprenologes เช่น T. alba, T. fusa และ T. mesouviformis เป็นต้น

7. Thermoactinomycetes

แอคติโนแบคทีเรีย กลุ่มนี้มี Thermoactinomyces เพียงสกุลเดียว เป็นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง สร้างสปอร์เดี่ยว ซึ่งเป็นเอนโดสปอร์อย่างแท้จริง ทนความร้อนได้ดี มีคุณสมบัติของเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียครบถ้วน ปริมาณเบสกัวนีนและไซโตซีนที่พบในกรดนิวคลีอิกต่ำกว่าพวกแอคติโนแบคทีเรียทั่วๆ ไป มีความสัมพันธ์ในสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ Bacillus นอกจากนั้นแอคติโนแบคทีเรีย กลุ่มนี้มีการสร้างเส้นใยอากาศ โดย T. dichotomous มีสีเหลือง ส่วนชนิดอื่นเส้นใยอากาศมีสีขาว เป็นพวกต้องการออกซิเจนในการเจริญ และเป็นพวกที่ชอบย่อยสลายเศษซาก และเกือบทั้งหมดเป็นพวกที่ชอบเจริญในที่มีอุณหภูมิสูง เจริญได้ไม่ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส ผนังเซลล์เป็นแบบที่ III (องค์ประกอบหลัก คือ meso-DAP) แต่จะไม่มีลักษณะของน้ำตาลและกรดอะมิโน ส่วนเมนาควิโนนเป็นแบบไม่อิ่มตัว เช่น MK-7 หรือ MK-9 ในสปอร์มีกรดไดพิโคลินิกเป็นองค์ประกอบ

8. แอคติโนแบคทีเรียกลุ่มอื่น

แอคติโนแบคทีเรีย กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ยังหาความสัมพันธ์กับแอคติโนแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ไม่ได้ ทำให้ไม่สามารถจัดเข้าอยู่ในกลุ่มอื่นได้ มี 4 สกุล ประกอบด้วย *Glycomyces, Kibdelosporangium, Kitasatospora* และ *Saccharothrix* โดยพบว่าทุกสกุลมีการสร้างสปอร์บนสายใยอากาศ

ตารางที่ 3 ลักษณะสำคัญของแอคติโนแบคทีเรีย 7 กลุ่ม

กลุ่ม	ชนิดของผนังเซลล์	แบบแผนของน้ำตาล	ปริมาณกัวนีนและไซโตซีน (%)	สปอร์แรงเงีย
Nocardioforms	I	A	59-79	-
Multilocular sporangia	III	B, C, D	57-75	+,-
Actinoplanetes	II	D	71-73	+
Streptomycetes	I	-	69-78	-
Maduromycetes	III	B, C	64-74	+,-
Thermomonospora	III	major C	64-73	-
Thermoactinomycetes	III	C	52-55	-

ผู้วิจัยให้ความสำคัญกับวิธีการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่มีความเป็นไปได้มาก และมีข้อได้เปรียบมากกว่าวิธีอื่นๆ คือการลดการ growth และ proliferation ที่จำเพาะที่ตัวเซลล์มะเร็ง โดยการลดการนำเข้าของ nutrients ซึ่งจำเป็นในการนำไปใช้การ growth และ proliferation ของเซลล์มะเร็ง โดยที่ไม่ส่งผลกระทบกับเซลล์ปกติอื่นๆของร่างกาย หลักการของวิธีการนี้ มีข้อมูลที่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน คือ เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีอัตราของขบวนการ aerobic glycolysis สูงกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "Warburg effect" ถูกค้นพบโดย Otto Warburg ในปี 1923 ลักษณะที่สำคัญของ Warburg effect ของเซลล์มะเร็งคือ มีการขนส่ง glucose เข้าเซลล์ และขบวนการ glucose consumption ในอัตราที่สูงกว่าเซลล์ปกติ แต่พบว่ามี lactate production ในอัตราที่สูงด้วย ถึงแม้ว่าเซลล์จะอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงพอในขบวนการ oxidative glucose consumption ก็ตาม (aerobic respiration) ซึ่งในเซลล์ปกติ การพบ lactate จะเกิดขึ้นในกรณี anerobic respiration หรือขาดออกซิเจน ปรากฏการณ์ Warburg effect นี้พบว่า mitochondria respiration ลดลง activity ของ enzyme glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็น enzyme ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน pyruvate เป็น lactate ซึ่งจะถูกขับออกจากเซลล์เข้าสู่กระแสเลือด ทำให้สิ่งแวดล้อมรอบๆเซลล์มะเร็งมีสภาพที่เป็นกรด นอกจากนี้ยังพบว่า activity ของ enzyme glycogen synthase ลดลง ซึ่งเป็น enzyme ที่ทำหน้าที่สร้าง glycogen จาก glucose และเซลล์มะเร็งจะมีอัตราของ lipogenesis ที่เกิดจาก de novo fatty acid synthesis (endogenous fatty acid synthesis) สูงมากกว่าเซลล์ปกติซึ่งมีค่อนข้างต่ำ ในเซลล์ปกติจะมีการสร้าง lipid จากอาหาร (dietary หรือ exogenous lipid) และจะมี de novo fatty acid ที่ค่อนข้างต่ำ การที่เซลล์มะเร็งมี de novo fatty acid synthesis ที่สูง ก็เพื่อใช้ในการสร้าง cell membrane และส่วนประกอบต่างๆของ cell membrane ซึ่งได้แก่ phospholipids, cholesterol, sphingolipids และ lipid rafts ส่วนประกอบต่างๆเหล่านี้รวมเรียกว่า microdomains ซึ่งมีความสำคัญ คือเกี่ยวข้องกับขบวนการ signal transduction, intracellular

trafficking, cell polarization และ cell migration เป็นต้น ขบวนการ de novo fatty acid ในเซลล์มะเร็งมีลักษณะที่สำคัญที่แตกต่างจากเซลล์ปกติ คือ ต้องอาศัยสารตั้งต้นภายในเซลล์คือ citrate รวมทั้งการมี lipogenic enzyme expression และ activity ที่เพิ่มขึ้น citrate ซึ่งเป็น key intermediate ในขบวนการ catabolism และ anabolism ของ eukaryotic cells มีแหล่งที่มาทั้งในเซลล์เองและนอกเซลล์ แหล่งที่มาภายในเซลล์ citrate จะถูกสร้างและเก็บอยู่ใน mitochondrial matrix และใช้ในขบวนการ citric acid cycle ในเวลาที่เซลล์ต้องการ energy citrate จะถูก oxidize ได้เป็น NAH และ FADH2 รวมทั้ง ATP แต่เมื่อเวลาที่เซลล์อยู่ในช่วง excess energy citrate จะถูก transport ออกจาก mitochondrial matrix ผ่าน inner mitochondrial membrane โดย mitochondrial citrate transport protein (CTP) และจะผ่าน outer membrane โดย anion selective channel ออกสู่ cytoplasm lipogenic enzyme ที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการ de novo fatty acid synthesis คือ ATP citrate lyase (ACL) , acetyl-CoA carboxylase (ACC) และ fatty acid synthase (FASN) ACL จะทำหน้าที่เปลี่ยน cytosolic citrate ให้เป็น acetyl CoA และ oxaloacetate ซึ่ง acetyl CoA จะเป็นแหล่ง immediate carbon source ในการสร้าง fatty acid , triglyceride และ cholesterol acetyl-CoA ส่วน ACC ทำหน้าที่ในการสร้าง malonyl-CoA จาก acetyl CoA และ FASN ทำหน้าที่สร้าง long chain fatty acid

มีงานวิจัยที่ยับยั้ง enzymes ที่ใช้ในขบวนการ de novo fatty acid synthesis รายงานถึงการลดลงของ fatty acid ภายในเซลล์มะเร็ง ซึ่งส่งผลลด cell proliferation การสูญเสีย cell viability และลด tumor size ซึ่งในขณะที่การยับยั้ง lipid biosynthesis นี้ไม่ส่งผลกระทบต่อทั้ง cell proliferation และ viability ของเซลล์ปกติ นอกจากผลที่กล่าวมาแล้ว การยับยั้ง de novo fatty acid synthesis ยังมีประสิทธิภาพในการลดการเกิด metastasis ด้วย เนื่องจาก metastasis เกิดจากการที่เซลล์มะเร็งเคลื่อนที่จาก primary tumor เข้าสู่กระแสเลือด และเดินทางไปยังอวัยวะต่างๆ metastasis ถือว่าเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตในผู้ที่เป็นมะเร็ง ดังนั้นการยับยั้ง de novo fatty acid synthesis สามารถเกิดขึ้นได้กับเซลล์มะเร็งทุกเซลล์ทั้งที่ primary tumor และที่ metastasis tissue อีกทั้งยังเป็นวิธีการที่มีความจำเพาะสูงในการยับยั้งการ growth , proliferation และการ metastasis ของเซลล์มะเร็งเท่านั้นโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติอื่นๆของร่างกาย นอกจาก enzyme ACL, ACC และ FASN แล้ว carnitine palmitoyltransferase-1 (CTP-1) ซึ่งควบคุม mitochondrial fatty acid oxidation ยังเป็น enzyme ที่ต้องคำนึงถึง เนื่องจากการศึกษา anticancer drugs หลายๆชนิดพบว่า มีผลข้างเคียงคือเกิด anorexia และbody weight loss เนื่องจากมีการกระตุ้น CTP-1 ดังนั้นการวิจัยที่พยามยามหาสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง de novo fatty acid synthesis โดยไม่มีผลต่อ CTP-1 จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดอีกวิธีหนึ่งในการรักษามะเร็ง และนำไปสู่การทดลองใช้ในสัตว์ทดลอง ทั้งด้านการรักษา ป้องกันมะเร็ง และยับยั้งการ metastasis ของมะเร็ง ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การสร้างยาที่ใช้กับมนุษย์ได้ในอนาคตแทนการใช้ chemotherapy

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยประกอบด้วย

1. เชื้อแบคทีเรียแยกได้จากดินในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ เขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว ประเทศไทยจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท S1 และ ไอโซเลท S2 โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ
2. เชื้อแอคติโนแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน และรากพืช ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตารางที่ 4 เชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดิน และพืช

ไอโซเลท	แยกได้จาก
JPN 2	ดินรอบรากขิงที่ปลูกใน อ.บางกระทุ่ม จ. พิษณุโลก
LPL 6	ดินรอบรากขิงที่ปลูกใน อ.บางกระทุ่ม จ. พิษณุโลก
HML 2	ดินรอบรากขิงที่ปลูกใน อ.บางกระทุ่ม จ. พิษณุโลก
Zin 13	รากของข้าว ที่ปลูกใน อ. บางระกำ จ.พิษณุโลก
Al 08	รากของข้าว ที่ปลูกใน อ. บางระกำ จ.พิษณุโลก
Zin05	รากของข้าว ที่ปลูกใน อ. บางระกำ จ.พิษณุโลก
Tm 32	รากของข้าว ที่ปลูกใน อ. บางระกำ จ.พิษณุโลก
AlP 03	รากของข้าว ที่ปลูกใน อ. บางระกำ จ.พิษณุโลก
B 14	รากของข้าว ที่ปลูกใน อ. บางระกำ จ.พิษณุโลก
Bar 14	รากของข้าว ที่ปลูกใน อ. บางระกำ จ.พิษณุโลก
Bor 09	รากของข้าว ที่ปลูกใน อ. บางระกำ จ.พิษณุโลก
B 19	รากของข้าว ที่ปลูกใน อ. บางระกำ จ.พิษณุโลก

3.2 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

3.2.1 การจัดจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ เขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยดูลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และการย้อมสีแบบแกรม ศึกษาลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้างเอนโดสปอร์ และวิเคราะห์หาลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีนที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTECH) ตรวจสอบความถูกต้องของ Chromatograms ด้วยโปรแกรม Bioedit โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ด้วยวิธี BLASTN search เพื่อตรวจสอบความเหมือนกัน (identity) ของลำดับ นิวคลีโอไทด์

3.2.2 การจัดจำแนกชนิดของแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท

3.2.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การศึกษาลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค incline slide culture โดยการขีดเชื้อให้เป็นช่องตาราง (cross-hatch) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ HT Agar แล้วฝังแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slips) ลงไปบนบริเวณรอยขีดของเชื้อ โดยให้แผ่นกระจกปิดสไลด์เอียงทำมุม 30- 40 องศา หลังจากที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจนเชื้อสร้างสปอร์ แล้วค่อยๆดึงแผ่นกระจกปิดสไลด์ที่มีเชื้อแอคติโนแบคทีเรียเจริญติดอยู่มาทำการย้อมสีแบบ simple stain โดยใช้สี crystal violet ตรวจดูลักษณะการสร้างสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ตามเอกสารของ Whitman, et al., (2012) เพื่อจัดจำแนกชนิดของแอคติโนแบคทีเรียเบื้องต้น

3.2.2.2 การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยดำเนินการส่งเชื้อที่ได้ ไปวิเคราะห์ยังบริษัท Macrogen Inc. Service ที่ประเทศเกาหลีใต้ ตรวจสอบความถูกต้องของ Chrommatograms ด้วยโปรแกรม BioEdit โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอคติโนแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ด้วยวิธี BLASTN search เพื่อตรวจสอบความเหมือน (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ศึกษาสายพันธุ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของแอคติโนแบคทีเรียโดยการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA version 7.0 (Tamura et al., 2011) ดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้ เพื่อนำมาเทียบเคียงกัน ด้วยวิธี multiple sequences alignment ด้วยการใช้โปรแกรม Clustal W version 7.0 (Higgins et al., 1994) แก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการตัดบางส่วนออก (Trim) จากนั้นใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนประมาณ 1000 เบส ของยีน 16S rRNA ในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วย Neighbor-Joining tree (Bootstrap 1000 ครั้ง)

3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S1 และ S2 และแอคติโนแบคทีเรียเพื่อนำมาสกัดสาร

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S1 และ S2 จากดินในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ เขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว

นำเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียไอโซเลท S1 และ S2 มาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2 ชนิด คือ Glucose yeast peptone broth medium (F1) และ Yeast extract peptone dextrose agar (F2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงที่ได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในวันที่ 7 และ วันที่ 15 เพื่อนำมาทดสอบการสร้างสารทุติยภูมิที่ได้จากเชื้อ

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย

นำเชื้อบริสุทธิ์ของแอคติโนแบคทีเรียมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Hickey-Tresner Agar (HT agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะลงบนอาหารบริเวณที่มีเชื้อเจริญ นำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญ จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในอาหาร International Streptomyces Project Medium- 2 (ISP2 broth) pH 7 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ในขวดรูป

ชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 14 วัน

3.3.3 การเตรียมสารสกัดแบบหยาบ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ

หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อตามระยะเวลาที่ได้กำหนดไว้ จากนั้นนำอาหารที่เลี้ยงเชื้อมาแยกเอาเชื้อออกจากอาหารโดยการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนของอาหารเหลวไปสกัดด้วยตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ในอัตราส่วน ปริมาณของเหลว : ปริมาณไดคลอโรมีเทน (1:2) ทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นเปลี่ยนสารละลายเป็น เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) ในอัตราส่วนปริมาตรของเหลว : ปริมาตรเอทิลอะซิเตต (1:2) ทำซ้ำ 3 ครั้ง ส่วนสุดท้ายที่ได้จะเป็นส่วนของชั้นน้ำ รวบรวมตัวทำละลายแต่ละชนิดที่สกัดได้ไปทำให้แห้งด้วยวิธีระเหยแบบลดความดัน (evaporation) ที่ 45 °C จากนั้นจึงนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในลำดับต่อไป

3.4 การวิเคราะห์สารทุติยภูมิแต่ละกลุ่มเชิงปริมาณ

3.4.1 Total phenolics content

การหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิคในสารสกัดโดยใช้หลักการเกิดสีจากปฏิกิริยาระหว่าง 10% Folin-ciocalteu reagent solution และสารกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งหากสารสกัดมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก จะให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm โดยเทียบกับสารมาตรฐานคือ gallic acid มีวิธีการทดสอบดังต่อไปนี้

3.4.1.1 การเตรียม stock solution ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ

1. การเตรียม stock solution ของสารตัวอย่าง โดยชั่งสารตัวอย่าง 1 mg เติมเมทานอลบริสุทธิ์จนครบปริมาตร 1 ml (ได้ความเข้มข้นของ stock solution ของสารตัวอย่าง คือ 1 mg/ml หรือ 1 µg/µl)

2. การเตรียม 10% folin-ciocalteu reagent solution โดยดูด Folin-ciocalteu reagent 10 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 ml

3. การเตรียม saturated $NaHCO_3$ solution โดยชั่ง $NaHCO_3$ 6 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 ml

3.4.1.2 การทำ calibration curve ของสารมาตรฐาน gallic acid

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ gallic acid ให้มีปริมาณ gallic acid 5-35 µg ใน methanol ml เติม 10% Folin-ciocalteu reagent solution 1 ml เขย่าผสมเป็นเวลา 5 นาที เติม saturated NaHCO3 solution 1 ml (ได้ความเข้มข้น 0, 1.67, 3.33, 6.67, 10 และ 13.33 µg/ml ตามลำดับ) รอทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 725 nm

3.4.1.3 การหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid

นำสารสกัดเข้มข้น 1 mg/ml ใน methanol 1 ml มาทำ ปฏิกิริยากับ 10% Folin-ciocalteu reagent solution 1 ml เขย่าผสมเป็นเวลา 5 นาที เติม saturated $NaHCO_3$ solution 1 ml รอทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 725 nm คำนวณกลับหาปริมาณสารฟีนอลิคโดยเทียบกับสาร

มาตรฐาน gallic acid จากกราฟมาตรฐาน แสดงผลเป็นปริมาณของ total phenolic content ในหน่วย mg gallic acid equivalent/ g extract

3.4.2 Total Flavonoids content

การหาปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดโดยใช้หลักการเกิดสีจากปฏิกิริยาระหว่าง 2% $AlCl_3$ solution และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งหากสารสกัดมีสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ จะให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm โดยเทียบกับสารมาตรฐาน rutin มีวิธีการทดสอบดังต่อไปนี้

3.4.2.1 การเตรียม stock solution ของสารต่าง ๆ

1. การเตรียม stock solution ของสารตัวอย่าง ชั่งสารตัวอย่าง 5 mg เติม ethanol:water สัดส่วน 1:1 จนครบปริมาตร 5 ml (ได้ความเข้มข้นของ stock solution ของสารตัวอย่าง คือ 1 mg/ml หรือ 1 µg/µl)

2. การเตรียม 2% $AlCl_3$ solution โดยชั่ง $AlCl_3$ 2 กรัม แล้วเติม methanol จนครบปริมาตร 100 ml

3.4.2.2 การทำ calibration curve ของสารมาตรฐาน rutin

เตรียมสารละลายมาตรฐาน rutin ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน ethanol:water สัดส่วน 1:1 ให้มี rutin ในปริมาณ 0-100 µg ใน 1 ml เติม 2% $AlCl_3$ solution ปริมาตร 1 ml (ได้ความเข้มข้น 0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0 และ 50.0 µg/ml ตามลำดับ) รอทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 nm

3.4.2.3 การหาปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน rutin

นำสารสกัดเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 1 ml มาเติม 2% $AlCl_3$ solution 1 ml ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 nm คำนวณกลับหาปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยเทียบกับสารมาตรฐาน rutin จากกราฟมาตรฐาน แสดงผลเป็นปริมาณของ total flavonoid content ในหน่วย mg rutin equivalent/ g extract

3.4.3 Total alkaloids content

การหาปริมาณสารกลุ่มอัลคาลอยด์ในสารสกัดโดยใช้หลักการเกิดสีจากปฏิกิริยาระหว่าง bromocresol green (BCG) และสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ซึ่งหากสารสกัดมีสารประกอบกลุ่มอัลคาลอยด์ เมื่อนำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มจะให้สารละลายสีเหลืองในชั้นคลอโรฟอร์มเมื่อปรับ pH ของสารละลายเป็น 4.7 โดย reaction mixture ดังกล่าวจะให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm เทียบกับสารอัลคาลอยด์มาตรฐานคือ berberine chloride มีวิธีการทดสอบดังต่อไปนี้

3.4.3.1 การเตรียม stock solution ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ

1. การเตรียม stock solution ของสารตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่าง 0.5 mg แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 5 ml (ได้ความเข้มข้นของ Stock solution ของสารตัวอย่าง คือ 0.1 mg/ml หรือ 0.1 µg/µl)

2. การเตรียม Phosphate buffer solution (pH 4.7) โดยปรับ pH ด้วย 2 M Sodium Phosphate (Na2HPO4) และ 0.2 M citric acid

- 2 M Sodium Phosphate เตรียมโดยชั่ง Sodium Phosphate (Na2HPO4) 7.16 กรัม แล้วเติมน้ำจนครบปริมาตร 100 ml

- 0.2 M Citric acid เตรียมโดยชั่ง Citric acid 3.84 กรัม เติมน้ำจนครบปริมาตร 100 ml

3. การเตรียม Bromocresol green solution โดยนำ BCG 6.98 mg ให้ความร้อน 50-60°C ผสมกับ 2 N sodium hydroxide 3 ml แล้วเติมน้ำจนครบปริมาตร 100 ml (เก็บให้พ้นแสง เตรียมใช้ทันที)

- 2 N Sodium Hydroxide เตรียมโดยชั่ง Sodium Hydroxide 1.6 กรัม เติมน้ำจนครบปริมาตร 20 ml

3.4.3.2 การทำ Calibration curve ของสารมาตรฐาน berberine chloride

เตรียม สารละลายมาตรฐาน BCG โดยมีปริมาณ BCG 2, 5, 10, 15 และ 20 µg ในน้ำปริมาตรรวม 1 ml (ได้ความเข้มข้นของ reaction mixture เป็น 0.40, 1.00, 2.00, 3.00 และ 4.00 µg/ml ตามลำดับ) เติม phosphate buffer solution (pH 4.7) ขวดละ 2 ml เติม bromocresol green solution ขวดละ 2 ml นำไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 5 ml โดยใช้ vortex ในการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที ดูดเอาชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ไปวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 nm

3.4.3.3 การหาปริมาณสารกลุ่มอัลคาลอยด์ในสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน berberine chloride

นำ Stock solution ของสารตัวอย่างใส่ในหลอดทดลองมีฝาปิด โดยดูดมา 300 µl เติม Phosphate buffer solution (pH 4.7) 600 µl เติม Bromocresal green (BCG) solution 600 µl นำไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2.5 ml โดยใช้ vortex ในการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที ดูดเอาชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ไปวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง uv-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 nm คำนวณกลับหาปริมาณสารกลุ่มอัลคาลอยด์โดยเทียบกับสารมาตรฐาน berberine chloride จากกราฟมาตรฐาน แสดงผลเป็นปริมาณของ total alkaloids content ในหน่วย mg berberine chloride equivalent/ g extract

3.4.4 Total triterpenoids content

การหาปริมาณสารกลุ่มไตรเทอพีนอยด์ในสารสกัดโดยใช้หลักการเกิดสีจากปฏิกิริยาระหว่าง Vanillin-acetic solution และสารกลุ่มไตรเทอพีนอยด์ ซึ่งหากสารสกัดมีสารประกอบกลุ่มไตรเทอพีนอยด์จะให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 573 nm โดยสารมาตรฐานคือ ursolic acid มีวิธีการทดสอบดังต่อไปนี้

3.4.4.1 การเตรียม Stock solution ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ

1. การเตรียม stock solution ของสารตัวอย่าง โดยชั่งสารตัวอย่าง 2 mg เติม acetic acidจนครบปริมาตร 2 ml (ได้ความเข้มข้นของ Stock solution ของสารตัวอย่าง คือ 1 mg/ml หรือ 1 µg/µl)

2. การเตรียม 5% vanillin-acetic solution (ในการทดสอบจะใช้ freshly preparation) โดยชั่ง vanillin 5 กรัม แล้วเติม acetic acid จนครบปริมาตร 100 ml

5.4.4.2 การทำ calibration curve ของสารมาตรฐาน ursolic acid

เตรียม สารละลายมาตรฐานของ ursolic acid ความเข้มข้น 1 mg/ml ให้มีปริมาณ ursolic acid 0, 2, 4, 8, 20 และ 40 µg ตามลำดับ เติม acetic acid จนครบปริมาตร 100 µl เติม 5% vanillin-acetic solution 200 µl (ได้ความเข้มข้นของ reaction mixture 0, 2, 4, 8, 20 และ 40.0 µg/ml ตามลำดับ) เติม sulfuric acid 400 µl แล้วนำไป incubated ที่ 70 °C นาน 30 นาที หลังจากนั้น เติม acetic acid 300 µl นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 573 nm

3.4.4.3 การหาปริมาณสารกลุ่มไตรเทอพีนอยด์ในสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน ursolic acid

นำ Stock solution ของสารตัวอย่างใส่ในขวดแก้วมีฝา 100 µl เติม 5%vanillin-acetic solution 200 µl เติม sulfuric acid 400 µl incubated ที่อุณหภูมิ 70°C รอทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที เติม acetic acid 300 µlนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง uv-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 573 nm คำนวณกลับหาปริมาณสารกลุ่มไตรเทอพีนอยด์โดยเทียบกับสารมาตรฐาน ursolic acid จากกราฟมาตรฐาน แสดงผลเป็นปริมาณของ total triterpenoid content ในหน่วย mg ursolic acid equivalent/ g extract

3.4.5 Total cardiac glycoside content

การหาปริมาณสารกลุ่มอัลคาลอยด์ในสารสกัดโดยใช้หลักการเกิดสีจากปฏิกิริยาระหว่าง Baljet's reagent และสารกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ซึ่งหากสารสกัดมีสารประกอบกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์จะให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 495 nm โดยใช้ digoxin เป็นสารมาตรฐาน มีวิธีการทดสอบดังต่อไปนี้

3.4.5.1 การเตรียม Stock solution ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ

1. การเตรียม stock solution ของสารตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่าง 1 mg เติม ethanol:water สัดส่วน 1:1 จนครบปริมาตร 1 ml (ได้ความเข้มข้นของ stock solution ของสารตัวอย่าง คือ 1 mg/ml หรือ 1 µg/µl)

2. การเตรียม Baljet's reagent (ในการทดสอบจะใช้ freshly preparation) โดยนำ picric acid solution 95 ml ผสมกับ 10% NaOH 5 ml

- Picric acid solution เตรียมโดยชั่ง Picric acid 1 กรัม แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 ml

- 10% NaOH เตรียมโดยชั่ง NaOH 10 กรัม แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 ml

3.4.5.2 การทำ calibration curve ของสารมาตรฐาน digoxin

นำสารละลายมาตรฐาน digoxin ความเข้มข้น 1 mg/ml ให้มี digoxin 0, 20, 50, 100, 150 และ 200 µg ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วย ethanol:water สัดส่วน 1:1 จนครบปริมาตร 1 ml เติม Baljet's reagent ขวดละ 1 ml ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นขวดละ 2 ml (ได้ความเข้มข้น 0, 5, 12.5, 25, 37.5 และ 50 µg/ml ตามลำดับ) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 495 nm

3.4.5.3 การหาปริมาณสารกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ในสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน digoxin

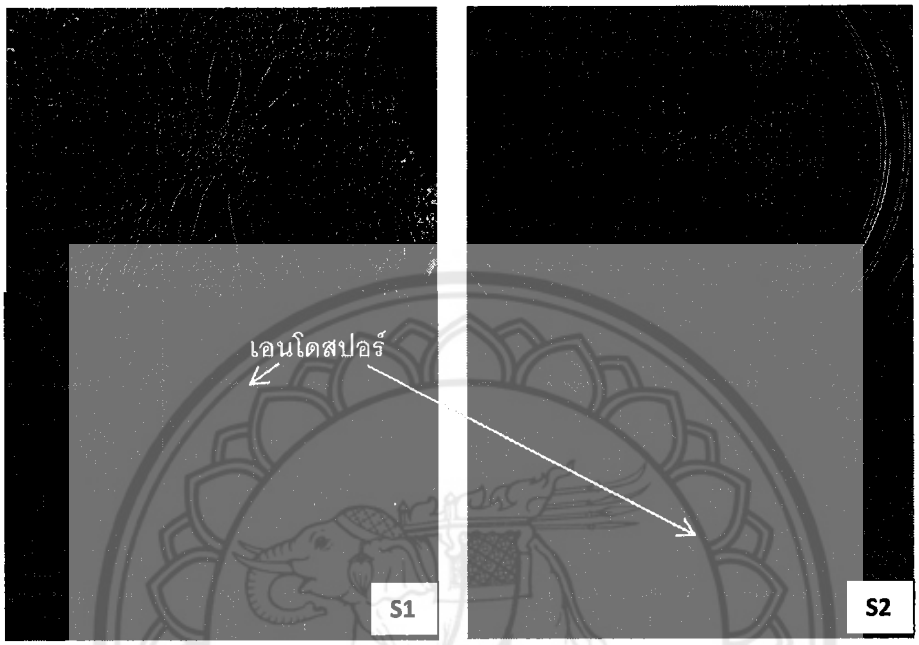
นำ stock solution ของสารตัวอย่างใส่ในขวดแก้วมีฝา 200 µl เติม Baljet's reagent ขวดละ 200 µl ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นขวดละ 400 µl นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 495 nm คำนวณกลับหาปริมาณสารกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคไซด์โดยเทียบกับสารมาตรฐาน digoxin จากกราฟมาตรฐาน แสดงผลเป็นปริมาณของ total cardiac glycoside content ในหน่วย mg digoxin equivalent/ g extract

4. ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ผลการวิจัย

4.1 การจัดจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท S1 และ S2

4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ไอโซเลท S1 และ S2 เมื่อเจริญบนอาหาร NA พบว่ามีโคโลนีสีขาวครีม ไม่พบการสร้าง pigment การศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสีแบบแกรม พบว่า ไอโซเลท S1 และ S2 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน มีการสร้างเอนโดสปอร์ดังรูป 3



รูปที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท S1 และ S2

4.1.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีน

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในพื้นที่ป่าอนุรักษ์เขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาวพบว่าได้ลำดับเบสดังนี้

ลำดับเบสของแบคทีเรียสายพันธุ์ S1

CAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCC
TGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTA
CAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCT
CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG
GCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGG
GGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG

ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGC
TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC
CTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTT
GGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCT
TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATC
CCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGGTGAATACGTTCCCGGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAG

ลำดับเบสของแบคทีเรียสายพันธุ์ S2

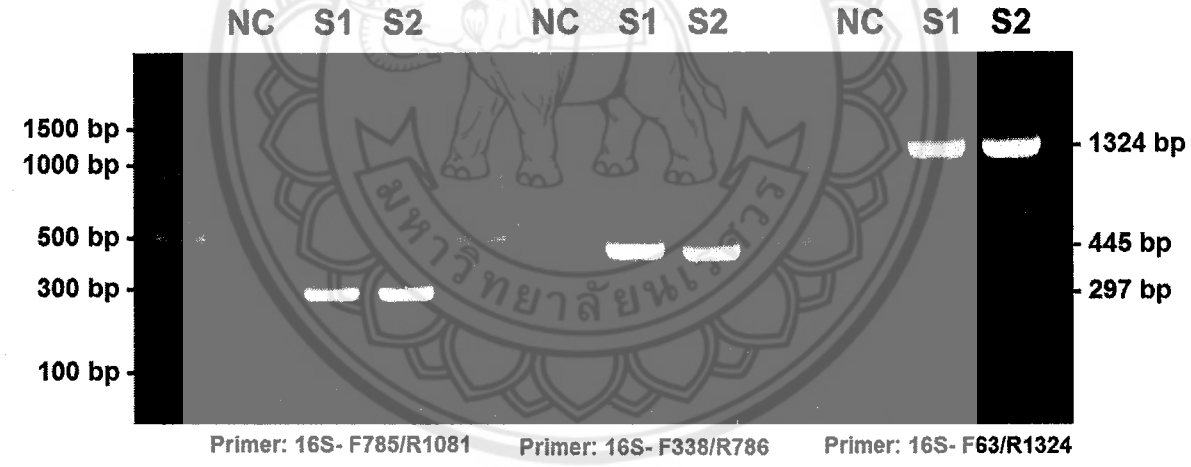
CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTC
CCTGATGTACGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
CGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTAC
AGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACC
TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTC
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGG
CTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGG
GAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGC
TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
GGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA
TCCTCTGACAATCCTAGAAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTTGCATGGTTGTCGT
CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT
CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGC
CAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAG
TTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGG
GTGAAGTC

เมื่อนำลำดับเบสที่ได้มาเทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ด้วยวิธี BLASTN search เพื่อตรวจสอบความเหมือนกัน (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ S1 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ

16S rDNA ในฐานข้อมูล พบว่าแบคทีเรียตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Bacillus tequilensis* และ *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* มากที่สุด 99.86% และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ S2 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus subtilis subsp. subtilis* มากที่สุด โดยมีเปอร์เซนต์ identity เท่ากับ 99.86% ดังเอกสารแนบ รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์ / IDENTIFICATION'S REPORT จาก BIOTEC

การยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อโดยทำการสกัดสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) จากตัวอย่างเชื้อและนำไปเพิ่มปริมาณตำแหน่งของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primer ที่จับที่ปริเวณ V3-V4 region ของ 16S rDNA (445 bp PCR product), V5-V6 region ของ 16S rDNA (297 bp PCR product) และ other partial sequence ของ 16S rDNA (1,324 bp PCR product) หลังจากนั้นทำการบริสุทธิ์ (Purification) ตัวอย่าง วัดความเข้มข้นและตรวจสอบคุณภาพ แล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยเทคนิค DNA sequencing ณ สถานบริการวิชาการทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยนำผลการวิเคราะห์มาเทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI

ผลการวิเคราะห์ลำดับ DNA ของเชื้อตัวอย่าง S1 และ S2



รูปที่ 4 ผลการเพิ่มปริมาณตำแหน่งของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

BLAST result

Sample S1 & S2 cultures

sequencing by primer annealed exon 5 and 6 (Expected size 297 bp)

>A1-56_290
GGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCT
TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGC
ATGGTTGTCGTCAGCTCG

>A2-56_290
GGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCT
TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGC
ATGGTTGTCGTCAGCTCG

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus tequilensis strain SDI-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	536	536	100%	1e-148	100%	KT021491.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain SeqTM5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	534	534	99%	4e-148	100%	MG814031.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain SeqPW10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	534	534	99%	4e-148	100%	MG814023.1
Bacillus mojavensis strain HR6A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	534	534	99%	4e-148	100%	KY963558.1
Uncultured bacterium clone DEF4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	534	534	99%	4e-148	100%	MG807417.1
Uncultured bacterium clone DEF2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	534	534	99%	4e-148	100%	MG807415.1
Bacillus siamensis strain Sp37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	534	534	99%	4e-148	100%	MG788345.1
Bacillus velezensis strain 10075 chromosome, complete genome	534	4805	99%	4e-148	100%	CP025939.1
Bacillus subtilis strain BJ3-2 chromosome, complete genome	534	5348	99%	4e-148	100%	CP025941.1
Bacillus velezensis strain p36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	534	534	99%	4e-148	100%	MG786694.1

รูปที่ 5 ผลเทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI (A:S1; B:S2) โดยใช้ primer ที่จับที่บริเวณ V3-V4 region ของ 16S rDNA

BLAST result

S1 & S2 cultures

sequencing by primer annealed exon 3 and 4 (Expected size 445 bp)

>A3-34_429

GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATC
GTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACC
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAG
GGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGA

>A4-34_429

GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATC
GTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACC
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAG
GGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGA

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain TN 0404 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	100%	0.0	100%	KY777343.1
Bacillus subtilis strain CH 01 05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	100%	0.0	100%	KY510927.1
Bacillus subtilis strain GF1_16SF_brmvyas_tejalpopat 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	100%	0.0	100%	MG976619.1
Bacillus subtilis strain APK 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	100%	0.0	100%	MG970277.1
Bacillus subtilis strain 2M6E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	100%	0.0	100%	MG966486.1
Bacillus subtilis strain C3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	100%	0.0	100%	KY983582.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain SeqTM5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	100%	0.0	100%	MG814031.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain SeqTK7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	100%	0.0	100%	MG814027.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain SeqMR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	100%	0.0	100%	MG814019.1
Bacillus subtilis strain ZS2N6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	100%	0.0	100%	MF136418.1

รูปที่ 6 ผลเทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI (A:S1; B:S2) โดยใช้ primer ที่จับที่บริเวณ V5-V6 region ของ 16S rDNA

วิ QR
ศ2
.A35
ด1499
1049857

สำนักหอสมุด

BLAST result

Sample S1 & S2 cultures

sequencing by primer annealed partial seq. in database (Expected size 1,324 bp) 22 มี.ค. 2565

>A5-R1387_382

AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGT
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGA
ACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAA

>A6-R1387_382

AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGT
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGA
ACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAA

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus siamensis strain TN 0503 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	706	706	100%	0.0	100%	KY777345.1
Bacillus subtilis subsp. subtilis strain TN 0404 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	706	706	100%	0.0	100%	KY777343.1
Bacillus siamensis strain TN 0204 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	706	706	100%	0.0	100%	KY777338.1
Bacillus subtilis strain M1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	706	706	100%	0.0	100%	MG977677.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain WF50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	706	706	100%	0.0	100%	MG766133.1
Bacillus subtilis strain A1F10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	706	706	100%	0.0	100%	MG766132.1
Bacillus subtilis strain GF1_16SR_brmvyas_tejalpopat 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	706	706	100%	0.0	100%	MG976620.1
Bacillus velezensis strain APJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	706	706	100%	0.0	100%	MG970354.1
Bacillus velezensis strain APG 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	706	706	100%	0.0	100%	MG970353.1
Bacillus velezensis strain APF 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	706	706	100%	0.0	100%	MG970351.1

รูปที่ 7 ผลเทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI (A:S1; B:S2) โดยใช้ primer ที่จับที่บริเวณ other partial sequence ของ 16S rDNA

เชื้อที่คัดแยกมาจากแหล่งดิน ทั้ง 2 ตัวอย่าง (ดินซองป่าดิบแล้ง ป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรังของอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว ประเทศไทย) ได้รับการพิสูจน์ยืนยันว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูป 3-1 ถึง รูปที่ 3-4) อาจจะเป็นสายพันธุ์ *B. tequilensis, B. subtitis* subsp. *subtitis* หรือ *B. siamnensis*

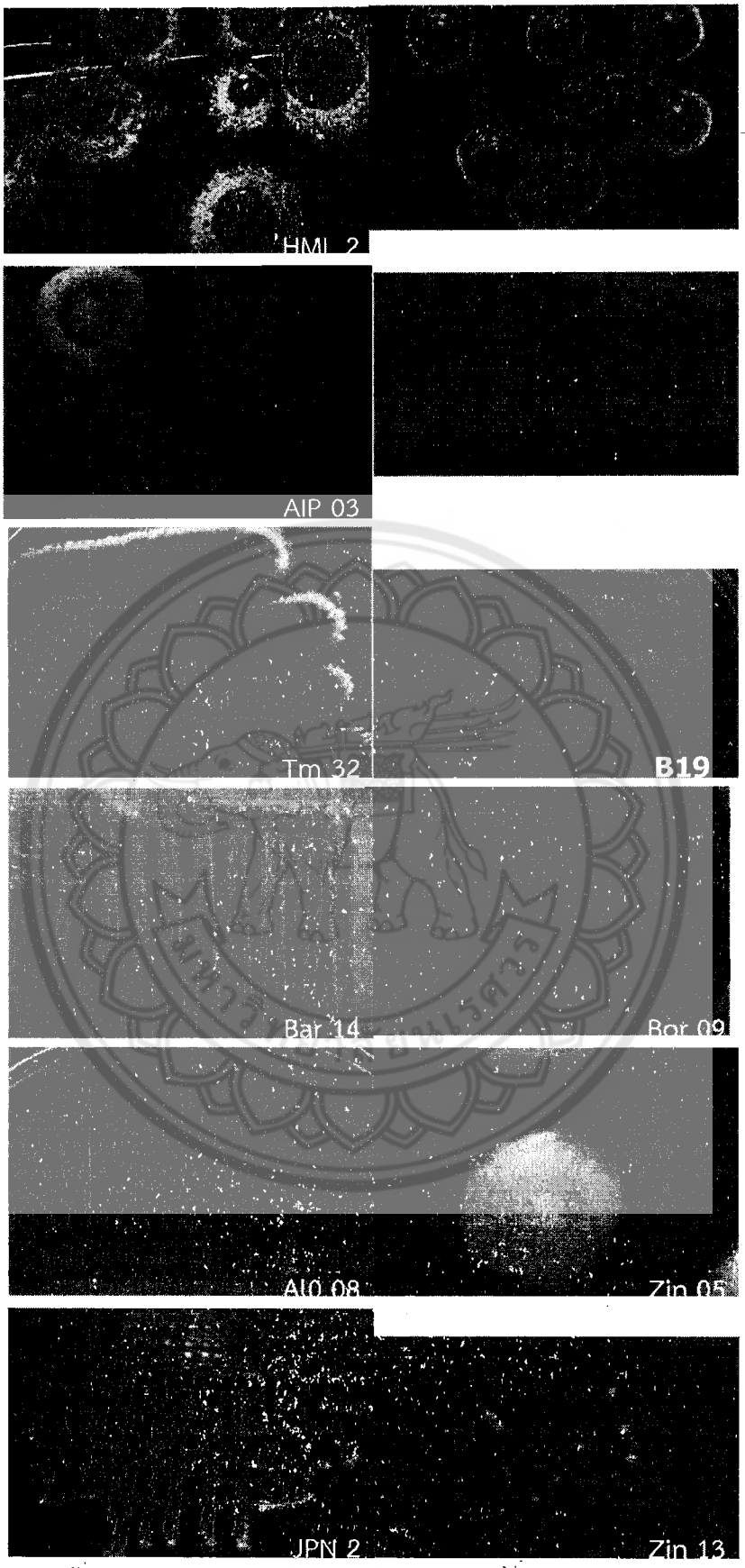
4.2 การจัดจำแนกชนิดเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบรากข้าวใน อ.บางกระทุ่ม จ. พิษณุโลก และ รากของต้นข่าใน อ. บางระกำ จ. พิษณุโลก

4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะสปอร์ของแอคติโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

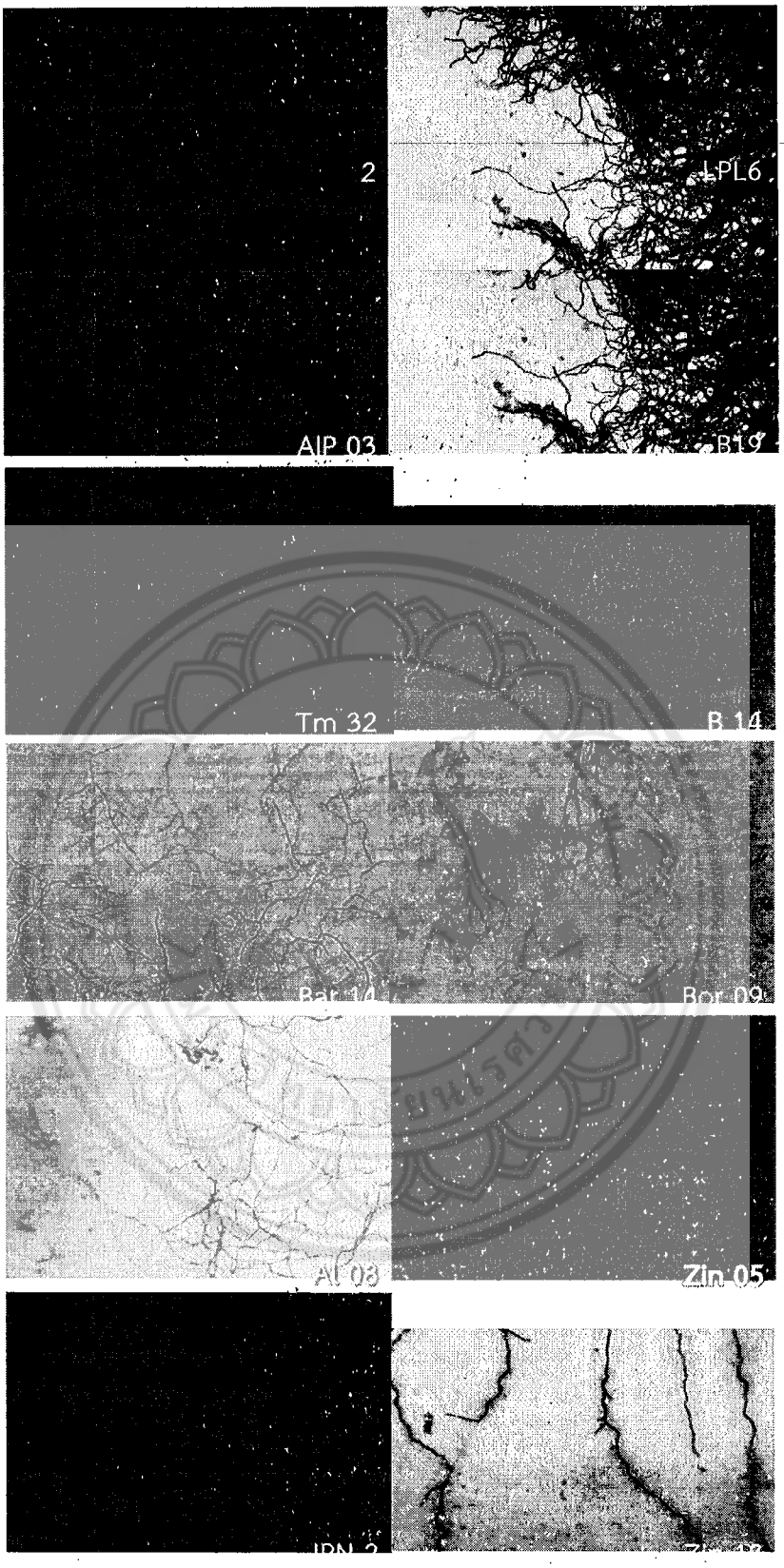
แอคติโนแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีทั้งหมด 12 สายพันธุ์ได้แก่ ไอโซเลท JPN 2, Zin 13, Al 08, Zin 05, Bar 14, Bor 09, Tm 32, LPL 6, HML 2, B 14, B19 และ AIP 03 เชื้อทั้ง 12 ไอโซเลท มีการสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ในวันที่ 2-3 ของการเจริญบนอาหาร HT agar มีการสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) และสปอร์ ในวันที่ 5-7 ของการเจริญ เชื้อส่วนใหญ่มีการสร้างสปอร์ต่อเป็นสายยาวมากกว่า 20 สปอร์ ซึ่งเป็นลักษณะของจีนัส *Streptomyces* sp. ยกเว้น ไอโซเลท LPL 6 และ HML 2 ที่มีการสร้างสปอร์ 2 สปอร์ต่อกัน ซึ่งเป็นลักษณะของจีนัส *Microbispora* sp. ดังตารางที่ 5 รูปที่ 8 และ 9 อย่างไรก็ตามจะได้มีการนำเอาไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในได้ดีไปทำการจัดจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์หาลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีน ต่อไป

ตารางที่ 5 ลักษณะการสร้างสปอร์ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย

ไอโซเลท	จำนวนสปอร์	จีนัส
LPL 6 , HML 2	2	*Microbispora* sp.
JPN 2, Zin 13, Al 08, Zin05, Tm 32, AIP 03, B 14, Bar 14, Bor 09, B 19	>20	*Streptomyces* sp



รูปที่ 8 ลักษณะโคโลนีเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย ทั้ง 12 ไอโซเลทเมื่อเจริญบนอาหาร HT agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 9 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย ทั้ง 12 ไอโซเลทเมื่อเจริญบนอาหาร HT agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อที่ให้ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด 4 ไอโซเลท ได้แก่ JPN2, B14, Zin05 และ B19 โดยได้ดำเนินการส่งเชื้อที่ได้ ไปวิเคราะห์ยังบริษัท Macrogen Inc. Service ที่ประเทศเกาหลีใต้ ตรวจสอบความถูกต้องของ Chrommatograms ด้วยโปรแกรม BioEdit โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอคติโนแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ด้วยวิธี BLASTN search เพื่อตรวจสอบความเหมือน (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า เชื้อแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทมีลำดับเบส ของยีน 16S rRNA ดังตารางที่ 6 โดยไอโซเลท JPN2, B14, Zin05 และ B19 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces kunmingensis*, *Streptomyces coerulescens*, *Streptomyces californicus* และ *Streptomyces variabilis* ตามลำดับ โดยมี % identity เท่ากับ 99 %

ตารางที่ 6 ลำดับเบสของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียให้ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด 4 ไอโซเลท และสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด

ไอโซเลท	ลำดับเบสของยีน 16S rRNA	สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด (% identity)
JPN2	AATTTTGTTTTACTGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCT TAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGAT TAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCT TCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGG ATAATACTTCCGTCCTCCTGGACGGTGGTTGAAAGCTCCGG CGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGA GGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGA GAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG CGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGC CTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAG TGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCC AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGA ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCG GTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGA TACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCC TGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACC GGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAG GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG TAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGAC ATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCC	*Streptomyces kunmingensis* (99%)

	CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAA TTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAA TTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACA CCGGAAAACCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCGGTG TACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCTGTG TTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAG ACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA AGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTAC AATGGCCGATACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGC GAATCTCAAAAAGTCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCA ACTCGACCCCATGAAGTTGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATC AGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC CGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGG TGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGA CTGGCGATTGGGACGAAGTCTAAAAGGGGGGAACCAAAAG GGGCGGAACC	
B14	TATGGAAACATAGGAAGGCGGAGATTGTTGTTCCTGGGTTT TGTAATTTTGGTACCAAGCCACCCTTATTGATTTTTTTTTCC CTGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCA AGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAA CGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGG ACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGAGCC ACTTGGGCATCCAAGTGGTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAG GATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGG CTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGA CCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCC TGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGT TGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTA CCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGA AAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGC AGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTA GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCG AAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAA AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	*Streptomyces coerulescens* (99%)

	CGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCAC GTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGG GGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGG GGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACG CAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAA CGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGT GGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTGCCAG CAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGG GGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCA TGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCG GTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCA AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACC CCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGC TGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC ACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAA CCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGAT TGGGACGAAGTCGTACAAAGGGTAACCAAAATAGTTTGGAA CATGGCTCCGAGAGTCACAAACA	
Zin05	TCAGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGC AAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGA ACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGG GACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCT GTCCTGCATGGGACGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGG ATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGC CTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGAC CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCT GATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT GTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTA CCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGATGTGA AAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGC TAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTA GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCG AAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAA AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	*Streptomyces californicus* (99%)

	CGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACG TCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGG GAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGG GGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGC AACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAG CATCAGAGATGGTGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGG TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTA AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCTGTGTTGCCAGCA TGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGG GTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCAT GCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGG TACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAA AAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCC CATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCT GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA CGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAAC CCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATT GGGACGAAGTCGTAAAAAGGGGAACCAAAAGGGGTGG	
B19	TGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCA CTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATA CTGACCCGCTTGGGCATCCAAGCGGTTCGAAAGCTCCGGC GGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAG GTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG AGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC GAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCC TTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGT GACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAA TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGG TTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGAT ACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCT GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCG GTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGG AGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACA TTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCC GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAAT	*Streptomyces variabilis* (99%)

	TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAAT TCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACAC CGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCCTTGTGGTCGGTGT ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTG TTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGA CCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAA GTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACA ATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCG AATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAA CTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCA GCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC GCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGT GGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGAC TGGCGATTGGGACGAATCTAAAAGGG	

4.3 ร้อยละและลักษณะของผลผลิตของการสกัดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus tequilensis* (S1) และ *Bacillus subtilis* (S2)

การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่แตกต่างกัน อุณหภูมิในการเลี้ยงต่างกัน และจำนวนวันที่เลี้ยงต่างกัน จะได้ปริมาณผลผลิตในแต่ละชั้นต่างกันแสดงดังตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่า *B. sublitis* (S2) ที่เลี้ยงโดยอาหาร Yeast extract peptone dextrose agar (F2) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน แล้วสกัดด้วย dichloromethane และ ethyl acetate ให้ร้อยละผลผลิตค่อนข้างสูง คือ ประมาณ 266 และ 301.97 mg ตามลำดับ

ตารางที่ 7 แสดงหมายเลขของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus tequilensis* (S1) และ *Bacillus subtilis* (S2) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน แสดงร้อยละผลผลิตและลักษณะทั่วไปของสารสกัดที่ได้ (สารสกัดหมายเลข 1-32)

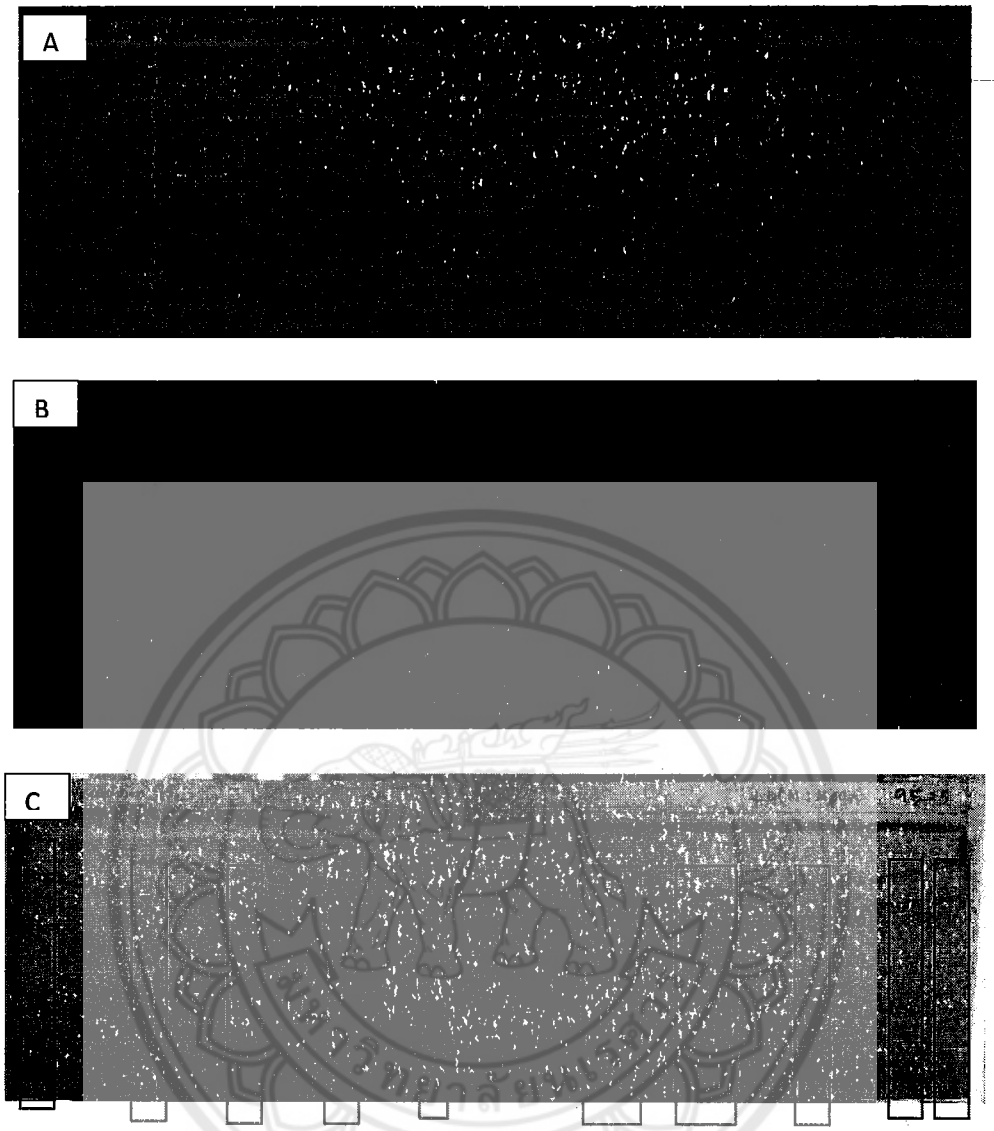
หมายเลขสารสกัด	ชนิดอาหาร/เชื้อ	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง	อุณหภูมิ (°C)	ชั้นสารละลายอินทรีย์	น้ำหนักสาร (mg)	ร้อยละผลผลิต (mg%)	ลักษณะทั่วไป
1	F1S1	7	27	DCM	17.90	7.16	Clear yellow,
2	F2S1	7	27	DCM	67.20	26.88	Brown, viscous
3	F1S1	7	27	EtOAc	24.30	9.72	Brown, viscous
4	F2S1	7	27	EtOAc	49.83	19.93	Brown, viscous
5	F1S2	7	27	DCM	15.77	6.31	Brown, viscous
6	F2S2	7	27	DCM	72.97	29.19	Dark
7	F1S2	7	27	EtOAc	24.40	9.76	Brown, viscous
8	F2S2	7	27	EtOAc	66.63	26.65	Brown, viscous
9	F1S1	7	37	DCM	12.63	5.05	Light brown,
10	F2S1	7	37	DCM	102.67	41.07	Brown, viscous
11	F1S1	7	37	EtOAc	13.00	5.20	Yellow, viscous
12	F2S1	7	37	EtOAc	119.90	47.96	Brown, viscous
13	F1S2	7	37	DCM	16.70	6.68	Brown, viscous
14	F2S2	7	37	DCM	226.70	90.68	Brown, viscous
15	F1S2	7	37	EtOAc	48.47	19.39	Dark brown,
16	F2S2	7	37	EtOAc	301.97	120.79	Red crimson,
17	F1S1	15	27	DCM	10.67	4.27	Yellow, viscous
18	F2S1	15	27	DCM	65.07	26.03	Brown, viscous
19	F1S1	15	27	EtOAc	19.13	7.65	Brown, viscous

หมายเลขสารสกัด	ชนิดอาหาร/	ระยะเวลาการ	อุณหภูมิ (°C)	ชั้นสารละลาย	น้ำหนักสาร (mg)	ร้อยละผลผลิต	ลักษณะทั่วไป
20	F2S1	15	27	EtOAc	77.20	30.88	Brown, viscous
21	F1S2	15	27	DCM	16.00	6.40	Light brown,
22	F2S2	15	27	DCM	124.47	49.79	Brown, viscous
23	F1S2	15	27	EtOAc	21.53	8.61	Yellow, viscous
24	F2S2	15	27	EtOAc	128.77	51.51	Yellow, viscous
25	F1S1	15	37	DCM	13.17	5.27	Yellow, viscous
26	F2S1	15	37	DCM	94.17	37.67	Orange, viscous
27	F1S1	15	37	EtOAc	23.17	9.27	Yellow, viscous
28	F2S1	15	37	EtOAc	178.80	71.52	Brown, viscous
29	F1S2	15	37	DCM	17.53	7.01	Brown, viscous
30	F2S2	15	37	DCM	103.13	41.25	Dark brown,
31	F1S2	15	37	EtOAc	16.93	6.77	Yellow, viscous
32	F2S2	15	37	EtOAc	160.57	64.23	Yellow, viscous

หมายเหตุ *Bacillus tequilensis* (S1), *Bacillus sublitis* (S2), Glucose yeast peptone broth medium (F1), Yeast extract peptone dextrose agar (F2)

4.4 TLC fingerprint ของสารสกัดจากเชื้อ *Bacillus tequilensis* (S1) และ *Bacillus sublitis* (S2)

จากรูปที่ 10 แสดง TLC fingerprint ของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง Bacillus sp. ทั้งสองชนิด จำนวน 32 สารสกัด เพื่อใช้พิจารณาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดที่ได้ เมื่อเทียบกับสารสกัด S2A และ S1A ซึ่งเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลมะเร็งตับจากการทดลอง preliminary study สภาวะที่ใช้ในการทดลองคือ normal phase TLC plate โดยใช้ developing solvent เป็น dichloromethane:methanol อัตราส่วน 95:5 ภายใต้ UV lamp ความยาวคลื่น 254 nm (6A), ความยาวคลื่น 365 nm (6B) และหลังจากการ spray 10% sulfuric acid solution in alcohol แล้วให้ความร้อน 110 °C (6C) จะเห็นได้ว่า สารสกัดหมายเลข 4, 8, 12, 16, 19, 20, 23, 24, 28 และ 32 มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกับ สารสกัด S1A และ S2A ซึ่งเป็นสารสกัดในชั้นเอทิลอะซีเตทจากการเลี้ยงเชื้อ S1 และ S2 จากการทดลองขั้นต้นก่อนหน้า ซึ่งเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ค่อนข้างดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลมะเร็งตับ อีกทั้งมีร้อยละผลผลิตมากเพียงพอที่สามารถจะเพาะเลี้ยงให้ได้สารสกัดในปริมาณมากได้ จึงนำสารสกัดหมายเลขดังกล่าวไปทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลมะเร็งในหลอดทดลองต่อไป

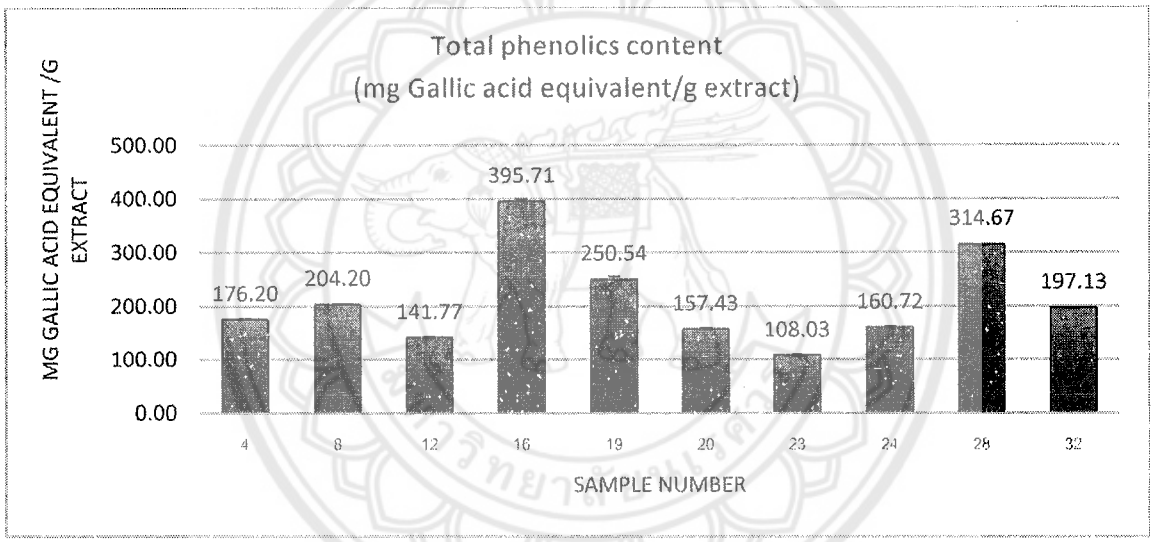


รูปที่ 10 แสดง TLC fingerprint ของสารสกัดจาก *Bacillus tequilensis* (S1) และ *Bacillus sublitis* (S2) หมายเลข 1-32 (สำหรับ S2A และ S1A คือสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลมะเร็งตับจากการทดลอง preliminary study) เมื่อใช้ developing solvent เป็น dichloromethane:methanol อัตราส่วน 95:5 ภายใต้ UV lamp ความยาวคลื่น 254 nm (A), ความยาวคลื่น 365 nm (B) และหลังจากการ spray 10% sulfuric acid solution in alcohol แล้วให้ความร้อน 110 °C (C)

4.5 การวัดปริมาณกลุ่มสารทุติยภูมิในสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เชื้อ *Bacillus tequilensis* (S1) และ *Bacillus sublitis* (S2)

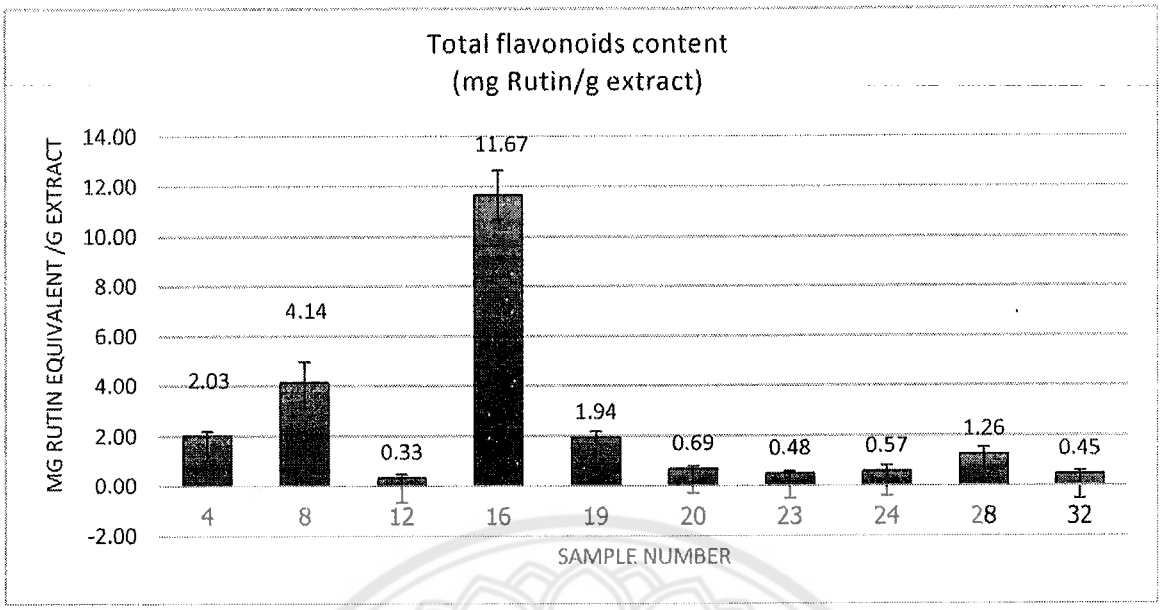
จากรูปที่ 11-15 และตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. ทั้งสองชนิด มีสารทุติยภูมิเป็นองค์ประกอบอย่างหลากหลายในสัดส่วนต่าง ๆ กัน ทั้งสารในกลุ่ม phenolic, flavonoids, triterpenoids และ cardiac glycoside แต่ตรวจไม่พบสารในกลุ่ม alkaloids โดยสารสกัดหมายเลข 16 มีสารกลุ่ม phenolics, flavonoids triterpenoids และ cardiac glycosides ในปริมาณสูงกว่าสารสกัดชนิดอื่น แสดงดังตารางที่ 8 องค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลายในสารสกัดเหล่านี้ พร้อมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลมะเร็งชนิดต่าง ๆ ในโครงการ 2 ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อ S1 และ S2 ต่อการนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ประโยชน์ในทางการรักษาและป้องกันโรคมะเร็งเป็นอย่างยิ่ง

4.5.1 Total Phenolics content



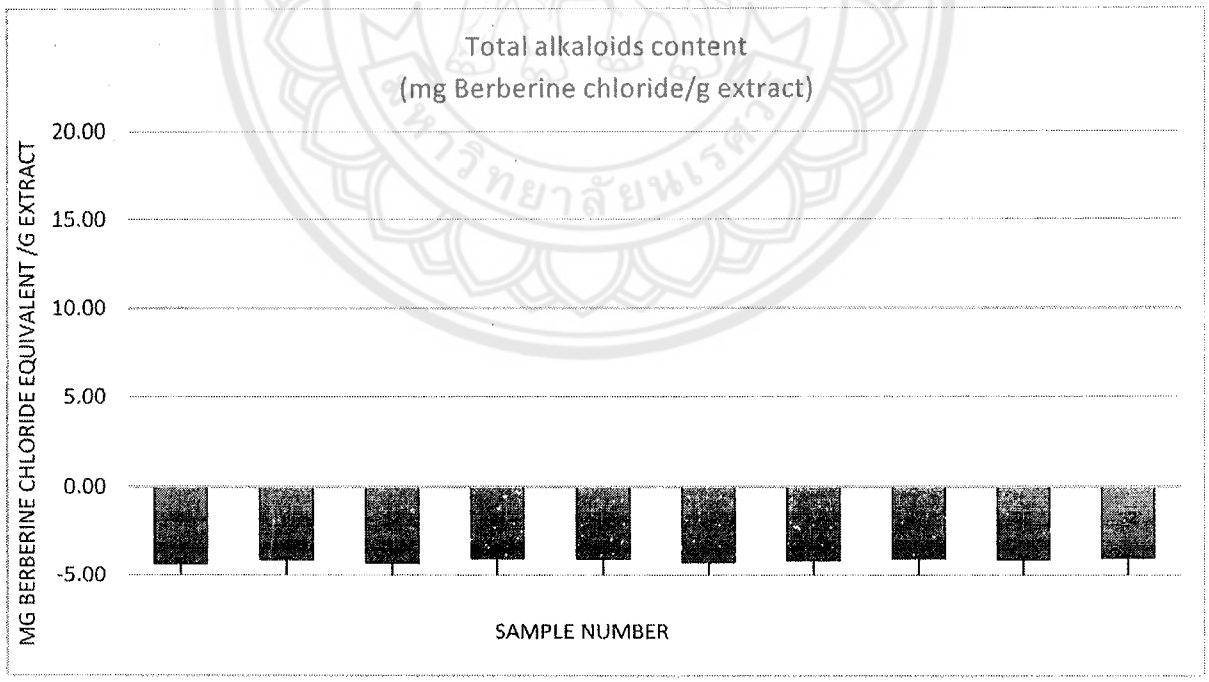
รูปที่ 11 แสดง total phenolic content ของสารสกัดหมายเลข 4, 8,12,16,19,20,23,24,28,32 ในหน่วย mg gallic acid

4.5.2 Total flavonoids content



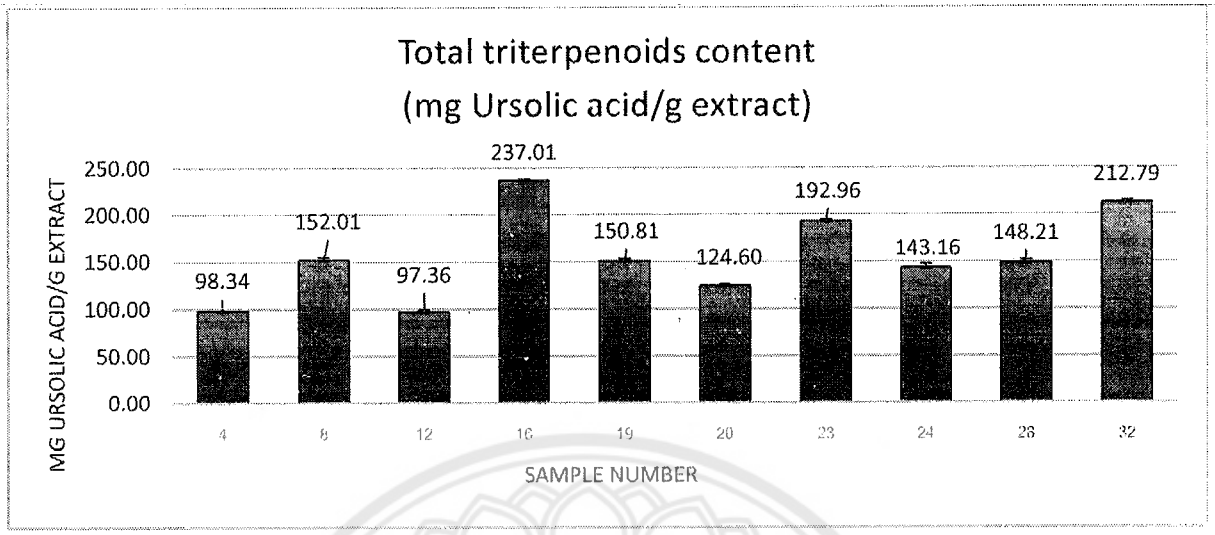
รูปที่ 12 แสดง total flavonoids content ของสารสกัดหมายเลข 4, 8,12,16,19,20,23,24,28,32 ในหน่วย mg rutin equivalent/ gram extract

4.5.3 Total alkaloids content



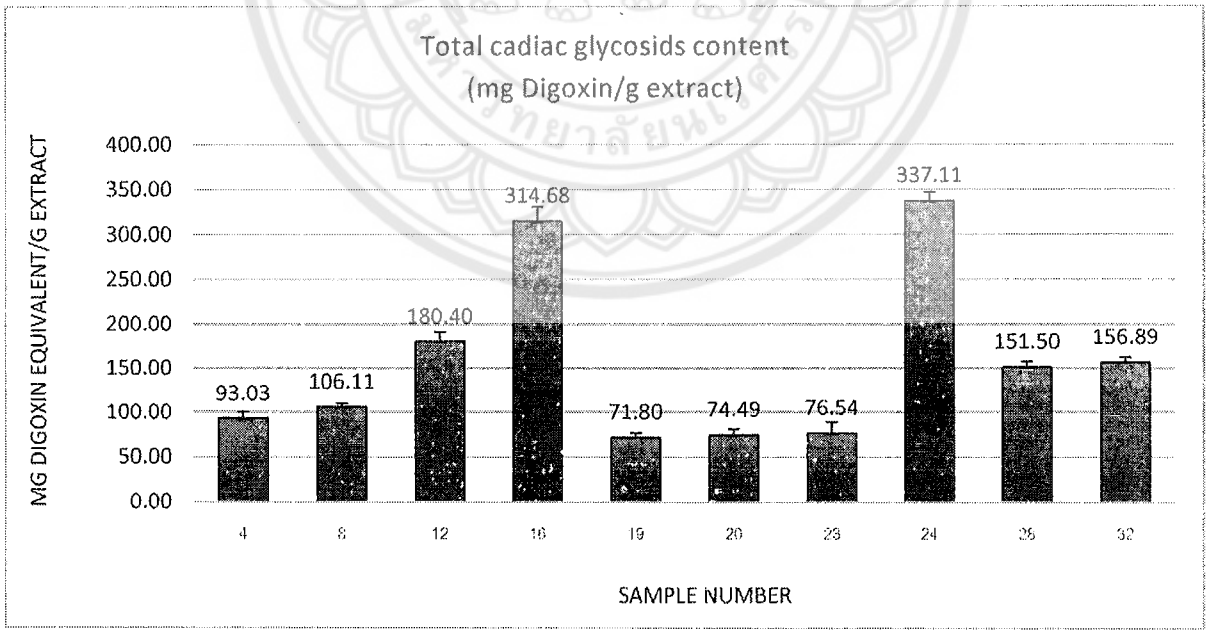
รูปที่ 13 แสดง total alkaloids content ของสารสกัดหมายเลข 4, 8,12,16,19,20,23,24,28,32 ในหน่วย mg berberine equivalent/ gram extract

4.5.4 Total triterpenoids content



รูปที่ 14 แสดง total triterpenoids content ของสารสกัดหมายเลข 4, 8,12,16,19,20,23,24,28,32 ในหน่วย mg ursolic acid equivalent/ gram extract

4.5.5 Total Cardiac glycoside content



รูปที่ 15 แสดง total cardiac glycosides content ของสารสกัดหมายเลข 4, 8,12,16,19,20,23,24,28,32 ในหน่วย mg digoxin equivalent/ gram extract

ตารางที่ 8 สรุปองค์ประกอบทางเคมีเชิงปริมาณของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus tequilensis (S1) และ Bacillus sublitis (S2)*

Sample Number	Total phynolics content (mg gallic acid equivalent/ g extract)		Total flavonoids content (mg rutin equivalent/g extract)		Total triterpenoids content (mg ursolic acid equivalent/g extract)		Total alkaloids content (mg berberine equivalent/ g extract)		Total cardiac glycosides content (mg digoxin equivalent/ g extract)	
	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD
4	176.20	1.13	2.03	0.19	98.34	0.29	-4.35	0.31	93.03	7.03
8	204.20	0.52	4.14	0.82	152.01	2.86	-4.11	0.12	106.11	4.09
12	141.77	0.76	0.33	0.14	97.36	2.09	-4.3	0.08	180.4	10.07
16	395.71	4.54	11.67	0.99	237.01	1.07	-4.05	0.11	314.68	16.09
19	250.54	4.93	1.94	0.26	150.81	2.31	-4.07	0.05	71.8	4.67
20	157.43	1.38	0.69	0.10	124.60	1.31	-4.26	0.03	74.49	6.48
23	108.03	0.53	0.48	0.09	192.96	1.71	-4.16	0.06	76.54	12.29
24	160.72	0.93	0.57	0.24	143.16	4.22	-4.04	0.04	337.11	10.09
28	314.67	0.10	1.26	0.27	148.21	3.19	-4.09	0.15	151.5	6.29
32	197.13	0.43	0.45	0.14	212.79	2.05	-4.01	0.13	156.89	5.53

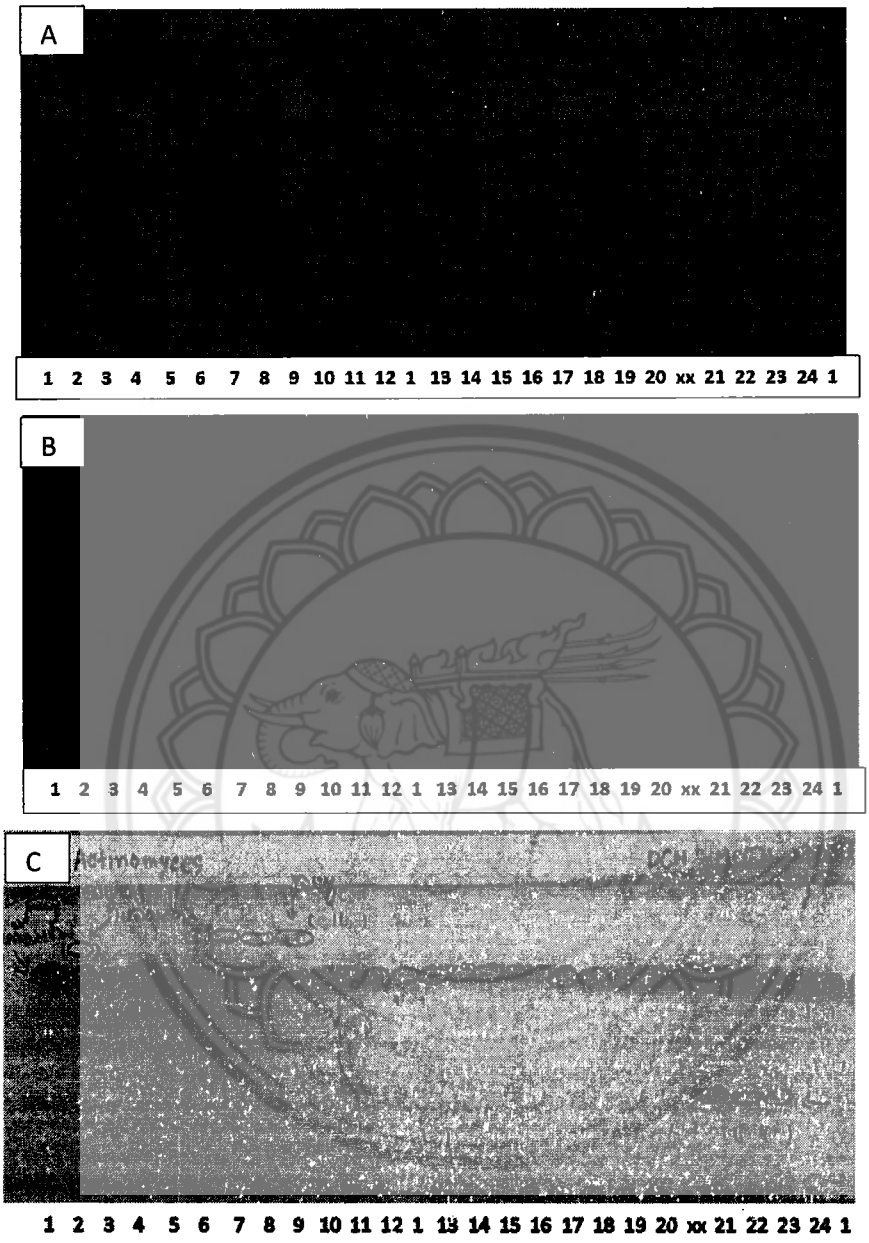
4.6 ร้อยละและลักษณะของผลผลิตของการสกัดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย12 isolates

การเลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรียที่แยกสกัดได้จากดิน ในประเทศไทย จำนวน 12 เชื้อ แสดงร้อยละผลผลิตและลักษณะทางกายภาพดังตารางที 9 จะเห็นได้ว่าสารสกัดในชั้นไดคลอโรมีเทนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ JPN2 มีร้อยละผลผลิตที่ค่อนข้างสูง ประกอบกับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลมะเร็งค่อนข้างดี สารสกัดนี้จึงถูกเลือกให้นำไปเลี้ยงในปริมาณมากถึง 25 ลิตร ได้ผลผลิต 858 มิลลิกรัม เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในสัตว์ทดลองในโครงการ 2 ต่อไป

ตารางที่ 9 แสดงหมายเลขของสารสกัดที่ได้จากการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย 12 isolates แสดงร้อยละผลผลิตและลักษณะทั่วไปของสารสกัดที่ได้ (สารสกัดหมายเลข 1-24)

หมายเลขสารสกัด	ไอโซเลท	ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัด	น้ำหนักสารสกัด (mg)	%yields (mg)	ลักษณะทางกายภาพ
1	JPN2	dichloromethane	35.9	21.1	หนืด สีน้ำตาล
2	B14	dichloromethane	12.3	8.2	หนืด สีน้ำตาลอ่อน
3	B19	dichloromethane	6.6	4.4	หนืด สีน้ำตาล
4	Bar14	dichloromethane	7.7	5.1	หนืด สีน้ำตาลเข้ม
5	Bor09	dichloromethane	6.9	6.3	หนืด สีน้ำตาล
6	Zin05	dichloromethane	4.7	3.3	หนืด สีน้ำตาล
7	Zin13	dichloromethane	11.5	7.2	หนืด สีเหลือง
8	Al08	dichloromethane	6.9	3.6	หนืด สีน้ำตาล
9	TM32	dichloromethane	8.8	5.9	หนืด สีน้ำตาล
10	LPL6	dichloromethane	7.9	5.6	หนืด สีน้ำตาลอ่อน
11	HML2	dichloromethane	4.9	2.45	หนืด สีน้ำตาล
12	AIP03	dichloromethane	20.3	13.5	ผงแห้ง สีน้ำตาลอ่อน
13	JPN2	Ethyl acetate	11.9	7.0	หนืด สีน้ำตาล
14	B14	Ethyl acetate	10.9	7.3	หนืด สีน้ำตาลอ่อน
15	B19	Ethyl acetate	26.0	17.3	ผงแห้ง สีเหลืองอ่อน
16	Bar14	Ethyl acetate	23.1	15.4	หนืด สีน้ำตาล
17	Bor09	Ethyl acetate	7.2	6.5	หนืด สีน้ำตาล
18	Zin05	Ethyl acetate	11.3	8.1	หนืด สีน้ำตาลเข้ม
19	Zin13	Ethyl acetate	14.0	8.7	หนืด สีน้ำตาลแดง
20	Al08	Ethyl acetate	29.8	15.7	หนืด สีน้ำตาลเข้ม
21	TM32	Ethyl acetate	17.1	11.4	หนืด สีน้ำตาลเข้ม
22	LPL6	Ethyl acetate	8.0	5.3	หนืด สีเหลืองอ่อน
23	HML2	Ethyl acetate	8.3	4.15	หนืด สีเหลืองอ่อน
24	AIP03	Ethyl acetate	12.3	8.2	หนืด สีน้ำตาล

4.7 TLC fingerprint ของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย 12 isolates



รูปที่ 16 แสดง TLC fingerprint ของสารสกัดจาก เชื้อแอคติโนแบคทีเรีย 12 isolates หมายเลข 1-24 เมื่อใช้ developing solvent เป็น dichloromethane:methanol อัตราส่วน 95:5 ภายใต้ UV lamp ความยาวคลื่น 254 nm (A), ความยาวคลื่น 365 nm (B) และหลังจากการ spray 10% sulfuric acid solution in alcohol แล้วให้ความร้อน 110 oC (C)

รูปที่ 16 แสดงลักษณะของ TLC fingerprint แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรีย แล้วสกัดแยกโดยใช้ไดคลอดโรมีเทน หรือเอทิลอะซีเตท จำนวนรวม 24 สารสกัด จะเห็นได้ว่าจำนวนสารที่แสดงใน TLC ของสารหมายเลข 1 คือสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนของเชื้อ JPN2

สายพันธุ์ Streptomyces kunmingensis มีหลายจุด แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของสารทุติยภูมิที่เชื้อสร้างขึ้น ประกอบกับผลการทดลองหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลมะเร็งในหลดทดลองในโครงการ 2 พบว่ามีฤทธิ์ที่ดี สารสกัดชั้นดังหล่าวจึงถูกเลือกที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในปริมาณมากขึ้นถึง 25 ลิตร เพื่อให้ได้สารสกัดที่เพียงพอต่อการทดลองในสัตว์ทดลองในโครงการย่อยที่ 2

5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.5 ผลการจัดจำแนกแบคทีเรีย 14 ไอโซเลทจากดินและพืชในประเทศไทย โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณยีน 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว ประเทศไทย คือ ไอโซเลท S1 และ S2 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus tequilensis* และ *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* มากที่สุด โดยมีความเหมือนเท่ากับ 99.86% และ 99.86% ตามลำดับ แบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลทที่แยกได้จากดินรอบรากขิงและ รากของข้าวพบว่าจัดอยู่ในกลุ่มของแอคติโนแบคทีเรียโดย จัดอยู่ในจีนัส *Microbispora* sp. 2 ไอโซเลท (HML2 และ LPL) และ *Streptomyces* sp. 10 ไอโซเลท โดย JPN2, B14, Zin05 และ B19 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces kunmingensis*, *Streptomyces coerulescens*, *Streptomyces californicus* และ *Streptomyces variabilis* ตามลำดับ โดยมี % identity เท่ากับ 99 %

5.6 ผลของการสกัดพบว่าสารจาก *Bacillus* sp ทั้ง 2 ไอโซเลท โดยใช้ไดคลอโรมีเทนหรือเอทิลอะซีเตทในสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกันพบว่า มีปริมาณผลผลิตของสารสกัด ในช่วง 7-120 mg% yield

5.7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเชิงปริมาณของสารสกัดหมายเลข 4,8,12,16,19,20,23,24,28 และ 32 พบว่ามีปริมาณสารในกลุ่มฟินอลิคในช่วง 108-395 mg gallic acid equivalent/g extract, ปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์พบได้น้อย เฉพาะสารสกัดย่อยหมายเลข 16 มี 11 mg rutin equivalent/g extract, ปริมาณสารในกลุ่มคาร์ดิแอคไกลโคลไซด์ พบได้ในหลายสารสกัดแตกต่างกันไปในช่วง 4-337 mg digoxin equivalent/g extract, ปริมาณสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ตรวจไม่พบเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน berberine chloride และ ปริมาณสารในกลุ่มไทรเทอพีนอยด์พบในปริมาณค่อนข้างสูงในช่วง 98-237 mg ursolic acid equivalent/g extract

5.8 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรียอยู่ในช่วง 3-21 mg% yield โดยชั้นไดคลอโรมีเทนของไอโซเลท JPN2 มีร้อยละผลผลิตค่อนข้างมากร่วมกับมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลมะเร็งตับในหลอดทดลองได้ดีจึงถูกเลือกไปศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งตับในสัตว์ทดลองต่อไปในโครงการที่ 2

6 เอกสารอ้างอิง

1. Berdy, J.C. 1995. Bioactive microbial metabolites. Journal of Antibiotics. 58: 1-28
2. Berman, V.S., Greenstein, M., Carte, G.T. 2004. Mining marine microorganisms as a source of new antimicrobials and antifungal. Current Medical Chemistry-Anti-Infective Agents. 3: 181-195.
3. Bruns, A., Philipp, H., Cypionka, H. and Brinkhoff, T. 2003. Aeromicrobium marinum sp. nov., an abundant pelagic bacterium isolated from the German Wadden Sea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53: 1917-1923.
4. Colquhoun, J. A., Mexson, J., Goodfellow, M., Ward, A. C., Horikoshi, K. and Bull, A. T. 1998. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. Antonie van Leeuwenhoek. 74: 27-40.
5. Fenical, W. and Jensen, P.R. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. Nature Chemical Biology. 2: 666-673.
6. Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P.R. 2007. Phytogenetic diversity of Gram positive bacteria cultured from marine sediments. Applied and Environmental Microbiology. 73: 3272-3282.
7. Goodfellow, M. and Haynes, J. A. 1984. Actinomycetes in marine sediments. In Biological, Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes, pp. 452-472. Edited by L. Ortiz-Ortiz, L.F. Bojalil and V. Yakoleff. New York: Academic Press.
8. Goodfellow, M., Simpson, K.E. 1987. Ecology of Streptomyces. Frontiers in Applied Microbiology. 2: 97-125.
9. Han, S. K., Nedashkovzkaya, O. I., Mikhailov, V. V., Kim, S. B. and Bae, K. S. 2003.
10. 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.
11. Hong, S. G., Lee, Y. K., Yim, J. H., Chun, J. and Lee, H. K. 2008. Sanguibacter antarcticus sp. nov., isolated from Antarctic sea sand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58: 50-52.
12. Huang, Y., Dai, X., He, L., Wang, Y-N., Wang, B-J., Liu, Z. and Liu, S-J. 2005. Sanguibacter marinus sp. nov., isolated from coastal sediment. International Journal of Systematic
13. and Evolutionary Microbiology. 55: 1755-1758.
14. Jensen, P.R., Dwight, R., Fenical, W. 1991. Distribution of actinomycetes in near shore tropical marine sediments. Applied and Environmental Microbiology. 57: 1102-1108.
15. Kageyama, A., Haga, T., Kasai, H., Shizuri, Y., Omura, S. and Takahashi, Y. 2008. Marihabitans asiaticum gen. nov., sp. nov., a meso-diaminopimelic acid-

containing member of the family Intrasporangiaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58: 2429-2432.

16. Kanoh, K., Matsuo, Y., Adachi, K., Imagawa, H., Nishizawa, M., Shizuri, Y. 2005. Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived Thermoactinomyces sp. YM3-251. Journal of Antibiotics (Tokyo). 58: 289-292.
17. Kim, S. B., Nedashkovskaya, O. I., Mikhailov, V. V., Han, S. K., Kim, K. O., Rhee, M. S. and Bae, K. S. 2004. Kocuria marina sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54: 1617-1620.
18. Kokare, C. R., Mahadik, K. R., Kadam, S. S. and Chopade, B. A. 2004. Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic Actinopolyspora species AH1 from the west coast of India. Current Science. 86: 593-597.
19. Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: StackebrandtE, Goodfellow M (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, New York, pp 115–175.
20. Lee, S. D. 2008. Brevibacterium marinum sp. nov., isolated from seawater. International Journal of Systematic and EvolutionaryMicrobiology. 58: 500-504.
21. Lee, D. W. and Lee, S. D. 2008. Tessaracoccus flavescens sp. nov., isolated from marine sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58: 785-789.
22. Maldonado, L. A., Fenical, W., Goodfellow, M., Jensen, P. R., Kauffman, C. K. and Ward, A. C. 2005a. Salinispora gen nov., sp. nov., Salinispora arenicola sp. nov., and S. tropica sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55: 1759-1766.
23. 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.
24. Matsumoto, A., Kasai, H., Matsuo, Y., Omura, S., Shizuri, Y. and Takahashi, Y. 2009. Ilumatobacter fluminis gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from the sediment of an estuary. Journal of General and Applied Microbiology. 55: 201-205.
25. Michelle, J. S., Sy, T., Ginger T, Venkat R. M., Kin S. L. 2008. Seawater requirement for the production of lipoxazolidinones by marine actinomycete strain NPS8920. Journal of Indian Microbiology and Biotechnology. 35: 761-765.
26. Mitchell, S.S., Nicholson, B., Teisan, S., Lam, K.S., Potts, B.C.M. 2004. Aureoverticillactam, a novel 22-atom macrocyclic lactam from the marine actinomycete Streptomyces aureovuticillatus. Journal of Natural Product. 67: 1400-1402.

27. Ningthoujam, D.S., Sanasam, S., Nimaichand, S. 2009. Screening of actinomycete isolates from niche habitats in Manipur for antibiotic activity. American Journal of Biochemisry and Biotechnology. 5: 221-222.
28. Pathom-aree, W., Y. Nogi, I. C. Sutcliffe, A. C. Ward, K. Horikoshi, A. T. Bull and M. Goodfellow. 2006c. Dermacoccus abysii sp. nov., a novel piezotolerant actinomycete isolated from the Mariana Trench. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56: 1233-1237.
29. Pathom-aree, W., Y. Nogi, I. C. Sutcliffe, A. C. Ward, K. Horikoshi, A. T. Bull and M. Goodfellow. 2006d. Dermacoccus barathri sp. nov. and Dermacoccus profundi sp. nov., novel actinomycetes isolated from the deepest sea mud of Mariana Trench. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56: 2303-2307.
30. Sabry, S. A., Ghanem, N. B., Abu-Ella, G. A., Schumann, P., Stackebrandt, E. and Kroppenstedt, R. M. 2004. Nocardiopsis aegyptia sp. nov., isolated from marine sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54: 453-456.
31. 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. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54: 191-194.
32. Takami, H., Inoue, A., Fuji, F. and Horikoshi, K. 1997. Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. FEMS Microbiology Letters. 152: 279-285.
33. Takeuchi, M. and Hatano, K. 1998. Proposal of six new species in the genus Microbacterium and transfer of Flavobacterium marinotypicum ZoBell and Upham to the genus Microbacterium as Microbacterium maritypicum comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 48: 973-982.
34. Takizawa, M., Colwell, R.R., Hill, R.T. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in Chesapeak Bay. Applied and Environmental Microbiology. 59: 97-1002.
35. Tamura, T. and Sakane, T. 2005. Asanoa iriomotensis sp. nov., isolated from mangrove soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55: 725-727.
36. Thawai, C., Tanasupawat and Kudo, T. 2008. Micromonospora pattaloongensis sp. nov., isolated from a Thai mangrove forest. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58: 1516-1521.
37. Vobis, G. 1997. Morphology of Actinomycetes. In Atlas of Actinomycetes (Miyodo, S., ed.). The Society for Actinomycetes Japan. p. 181-190. Japan.
38. William, R.H. 1989. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology.Vol. 4. Baltimore. Williams&Wilkins. U.S.A.

39. Yi, H. and Chun, J. 2004. Nocardioides aestuarii sp. nov., isolated from tidal flat sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54: 2151-2154.
40. Yi, H., Schumann, P. and Chun, J. 2007. Demequina aestuarii gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete of a suborden Micrococcineae, and reclassification of Cellulomonas fermentans Bagnara et al. 1985 as Actinotalea fermentans gen. nov., comb. nov. . International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57: 151-156.
41. Zhao, H., Kassama, Y., Young, M., Kell, D.B. and Goodacre, R. 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: 6619-6627.