

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายและสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของ แอสคิโนมัยซีทที่มีความสัมพันธ์กับสาหร่ายน้ำจืด ขนาดใหญ่กินได้บางชนิด	
ผู้เขียน	นางสาวธนิตรา อินทโสทธิ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ดร. วสุ ปฐมอารีย์ รศ.ดร. ยุวดี พีรพรพิศาล ดร. จีรพร เพกเกาะ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาแอสคิโนมัยซีทที่มีความสัมพันธ์กับสาหร่าย *Nostoc commune* และ *Nostochopsis* spp. คัดแยกแอสคิโนมัยซีทในอาหารทั้งหมด 12 ชนิด พบแอสคิโนมัยซีททั้งหมด 80 ไอโซเลต 50 ไอโซเลต แยกได้จาก *Nostoc commune* โดยอาหาร SCA ที่เติมสารสกัดสาหร่ายให้จำนวนไอโซเลตที่สูงที่สุด คือ 10 ไอโซเลต ส่วน *Nostochopsis* spp. แยกได้ 30 ไอโซเลต ซึ่งอาหาร HTA ให้จำนวนไอโซเลตสูงที่สุด คือ 7 ไอโซเลต นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารมีอิทธิพลต่อการคัดแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีท โดยพบว่า แอสคิโนมัยซีทที่แยกจากสาหร่าย *N. commune* ในอาหาร Starch casein agar (SC) มีจำนวนมากที่สุด ( $2.5 \times 10^4 + 5.2$  CFU.g<sup>-1</sup>) ในขณะที่แอสคิโนมัยซีทที่แยกจากสาหร่าย *Nostochopsis* spp. ในอาหาร Minimal medium ที่เติมสารสกัดจากสาหร่าย (MM+Nt) ให้จำนวนโคโลนีสูงที่สุด ( $2.25 \times 10^4$  CFU.g<sup>-1</sup>) เมื่อจัดกลุ่มแอสคิโนมัยซีทโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้จากการเจริญบนอาหาร ISP2 ISP3 และ ISP6 แบ่งได้เป็นสองกลุ่มหลัก คือ กลุ่ม streptomycetes และ non-streptomycetes ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มย่อยคือ filamentous actinomycetes และ non-filamentous actinomycetes จินัสหลักคือ *Streptomyces* เมื่อเทียบกับฐานอนุวิธานพบว่ามีความสอดคล้องกัน

ความหลากหลายของแอสคิโนแบคทีเรียที่ไม่ใช้อาหารในการเพาะเลี้ยงซึ่งมีความสัมพันธ์กับ *N. commune* โดยวิธีการโคลนและหาลำดับเบสบนตำแหน่งยีนส์ 16S rRNA จากการศึกษาได้โคลนทั้งหมด 70 โคลน ผลของการ BLAST และต้นไม้วิวัฒนาการสอดคล้องกัน และพบว่าโคลนที่ได้ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของแอสคิโนแบคทีเรีย โดย *Microbacterium* และ *Pseudonocardia* เป็นชนิดที่มีความ

หลากหลายมากที่สุด นอกจากนี้พบว่ามี 5 โคลน มีความเหมือนกับลำดับเบสของแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนแบคทีเรียที่ทราบอยู่แล้วในระดับต่ำ และแยกกลุ่มออกมา อาจเป็นไปได้ว่าผลจากการศึกษาครั้งนี้ บ่งชี้ว่า แอกติโนแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับ *Nostoc commune* จะเป็นจีโนมใหม่และชนิดใหม่ ยิ่งไปกว่านั้น ส่วนโค้งของ rarefaction บ่งบอกชัดเจนว่ายังไม่ถึงจุดอิ่มตัว นั่นหมายถึงการเก็บตัวอย่างโคลนที่มากขึ้นจะทำให้พบความหลากหลายที่มากขึ้นตามไปด้วย จากค่าความสม่ำเสมอของ Shannon-Wiener and Chao1 indexes แสดงให้เห็นค่าที่สูง และมีค่าความครอบคลุมเท่ากับ 71.11% ซึ่งแสดงถึงความไม่ครอบคลุมของตัวแทนของกลุ่มตัวอย่าง ถึงกระนั้นความหลากหลายของโคลนที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ก็มีค่าที่สูงกว่าการรายงานที่ผ่านมา

จากการศึกษากิจกรรมการต้านจุลชีพพบว่า แอกติโนมัยซีสที่แยกได้จาก *Nostoc commune* ที่เลี้ยงในอาหาร Med.30 มีความสามารถยับยั้งเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ส่วนในอาหาร M52 มี 21 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* O157 ได้ ในขณะที่เชื้อที่แยกได้จาก *Nostochopsis* spp. พบว่ามี 20 ไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหาร Med.30 และ 18 ไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร M52 สามารถยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซเลต NCMn07 และ NTRHn08 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ใช้ในการศึกษานี้ได้ทั้ง 7 ชนิด ซึ่งไอโซเลตทั้งสอง เมื่อบ่งชี้ชนิดโดยเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA กับแหล่งข้อมูล Eztaxon พบว่า NCMn07 มีความคล้ายคลึง 81% กับ *Streptomyces atrovirens* NRRL B-16357<sup>(T)</sup> ในขณะที่ NTRHn08 มีความคล้ายคลึง 97% กับ *Streptomyces griseoflavus* LMG 19344<sup>(T)</sup>

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

<b>Thesis Title</b>	Diversity and Antimicrobial Properties of Actinomycetes Associated with Some Edible Freshwater Macroalgae
<b>Author</b>	Miss Thanitsara Inthasotti
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)
<b>Advisory Committee</b>	Dr. Wasu Pathom-aree Advisor Assoc. Prof. Yuwadee Peerapornpisal Co-advisor Dr. Jeeraporn Pekkoh Co-advisor

## ABSTRACT

In this study, actinomycetes associated with *Nostoc commune* and *Nostochopsis* spp. were investigated. Actinomycetes were isolated through the use of twelve different types of media. In terms of overall isolation, a total of 80 isolates of actinomycetes were obtained. Fifty isolates were obtained from *Nostoc commune*. SCA+algae extract produced the highest number of isolates at 10. On the other hand, thirty isolates were obtained from *Nostochopsis* spp., for which the HTA medium gave the highest number of isolates at 7. The effects of the isolation media were recorded. The highest numbers of actinomycetes associated with *N. commune* was found in the starch casein agar (SC) ( $2.5 \times 10^4 + 5.2$  CFU.g<sup>-1</sup>). Whereas, the Minimal medium with extracts (MM+Nt) revealed the highest number of isolates of actinomycetes that were associated with *Nostochopsis* spp. ( $2.25 \times 10^4$  CFU.g<sup>-1</sup>). The morphology of all the isolates on ISP1, ISP2 and ISP6 medium were used for the purposes of classification. Two groups (streptomycetes and non-streptomycetes) and 2 subgroups (filamentous actinomycetes and non-filamentous actinomycetes) were found. In addition, *Streptomyces* was found to be the majority genus. The results of morphological observations and the molecular study were congruent.

The diversity of the independent culture of actinobacteria associated with *Nostoc commune* Voucher Bornet&Flahault was assessed by the cloning and sequencing of the actinobacterial-derived partial 16S rRNA gene. In total, 70 clones were obtained. The phylogenetic tree of all clone sequences was congruent with the BLAST result. The majority of the clones were found to be actinobacteria. *Microbacterium* and *Pseudonocardia* were considered the most diverse genera. However, there were 5 clones that revealed very few similarities with any known actinobacterial sequences and formed a separate cluster. This was probably because our results suggested that some of the *Nostoc commune* associated actinobacteria are considered novel at the genus and species level. Moreover, the rarefaction curve clearly did not reach the saturation point which indicated that greater sampling of the clone library probably resulted in an additional level of diversity. The Shannon-Wiener and Chao1 indexes were also investigated. The evenness of the clone library was considered high. In addition, the coverage value was 71.11% indicating that this library did not cover all of the diversity presented in the samples. Nevertheless, the diversity of the clone library obtained in the present study was considered more diverse than those previously reported.

From a study of the antimicrobial activities, actinomycetes isolated from *Nostoc commune*, which were cultured in M30, showed an inhibitory effect against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In M52 medium, *Escherichia coli* O157 was inhibited by 21 isolates. On the other hand, the isolates from *Nostochopsis* spp., yielded 20 isolates which were incubated in Med.30, while 18 isolates that were cultured in M52 revealed the inhibitory effects against *Aeromonas hydrophila*. Moreover, NCMn07 and NTRHn08 showed significant activities against all 7 pathogens. These 2 strains were identified by comparing with the data in Eztaxone using 16S rDNA sequence and these indicated that NCMn07 produced 81% in terms of similarities to *Streptomyces atrovirens* NRRL B-16357<sup>(T)</sup>, while isolate NTRHn08 revealed 97% in similarities to *Streptomyces griseoflavus* LMG 19344<sup>(T)</sup>.