การศึกษาคุณภาพสายพันธุ์แบคทีเรียหลังจัดเก็บด้วยวิธีการแช่แข็ง

ศิริพร จันทน์โรจน์ (นักศึกษา), วิมล จันทร์แจ่ม (อาจารย์ที่ปรึกษา)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง หัวหมาก กรุงเทพฯ 10240

การควบคุมคุณภาพจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้ของ Culture Collection แต่ละแห่ง ถือเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อความคงคุณภาพ และความถูกต้องของจุลินทรีย์ที่เก็บรักษานั้น การศึกษานี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์และพบได้บ่อยในผู้ป่วยที่ได้จัดเก็บไว้โดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นระยะเวลา 2-12 ปี จำนวน 300 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *S. aureus S. epidermidis S. pyogenes S. agalactiae S. pneumoniae E. faecium E. faecalis E. coli K. pneumoniae S. marcescens E. cloacae P. aeruginosa A. baumannii B. cepacia* และ *H. influenzae* นำมาตรวจสอบคุณภาพในด้านต่างๆ พบว่า ค่าความมีชีวิตของแบคทีเรีย (viability) ส่วนใหญ่มีค่าอยู่ระหว่าง 11-5 $\log_{10}$ โคโลนี/มล. และค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันทั้งในสปีชีส์เดียวกันและต่างสปีชีส์กันยกเว้นเชื้อกลุ่มตายง่าย ได้แก่ *S. pneumoniae และ H. influenzae* ค่าความมีชีวิตอยู่ระหว่าง 7-5 $\log_{10}$ โคโลนี/มล. ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยตาเปล่า ความคงคุณลักษณะด้านสรีรวิทยาโดยวิธีทางชีวเคมี พบว่ายังคงความบริสุทธิ์และคงคุณสมบัติทางสรีรวิทยา ส่วนการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้ universal primers ขยายยีนส่วน 16S rRNA ได้ผลผลิตยีนขนาดประมาณ 966 bp เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III ส่วนใหญ่ให้แถบ DNA ต่างกัน ยกเว้น ผลผลิตยีนของ *E .coli K. pneumoniae S. marcescens* และ *E. cloacae* ให้แถบ DNA เหมือนกัน แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I หรือ *Bst*BI จะให้แถบ DNA ต่างกัน ผลผลิตยีนของ *E. faecium* และ *E. faecalis* ให้แถบ DNA เหมือนกัน แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I จะให้แถบ DNA ต่างกัน สำหรับผลผลิตยีนของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Hae*III ดังกล่าว แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mnl*I จะให้แถบ DNA ต่างกัน ซึ่งใช้ยืนยันชนิดของเชื้อเดิมได้

Study for quality of bacterium strains after collection by freezing method

S. Chantaroj (Graduate Student), W. Chanchaem (Thesis Advisor)
Department of Biology, Faculty of Sciences, Ramkhamhaeng University, Humark, Bangkok 10240

Quality control of microbial cultures is a very important task in maintaining a culture collection. At the Department of Medical Sciences Thailand Culture Collection (DMST), most bacterial strains have been preserved by the freezing method. In this study, 300 strains of common pathogens including *S. aureus, S. epidermidis, S. pyogenes, S. agalactiae, S. pneumoniae, E. faecium, E. faecalis, E. coli, K. pneumoniae, S. marcescens, E. cloacae, P. aeruginosa, A. baumannii, B. cepacia* and *H. influenzae* those have been freezed for 2-12 years were studied for their viability, purity, phenotypes and genotype. It was found that mean of viability is about 11-5 $\log_{10}$CFU/ml and not significantly different among species except for some fastidious bacteria such as *S. pneumoniae* and *H. influenzae* that showed the viability value about 7-5 $\log_{10}$CFU/ml. From the results, all the cultures were pure as examined by eye and the phenotypes, morphology and biochemical properties were acceptable. The genotypic studies was done by PCR-RFLP technique with universal primers to amplify a portion of the 16S rRNA gene followed by restriction analysis. The sizes of the amplified products from bacteria were the same (996 bp), but the restriction patterns of PCR products generated by *Hae*III digestion were different. However PCR products from *E .coli K. pneumoniae, S. marcescens*, and *E. cloacae* had the same *Hae*III digestion pattern but had different patterns when digested with *Dde*I or *BstB*I. PCR products from *E. faecium*, and *E. faecalis* gave the same *Hae*III digestion pattern but could be differentiated by *Alu*I digestion. PCR products from *S. aureus* and *S. epidermidis* could not be digested by *Hae*III but showed different patterns when they were digested with *Mnl*I.

แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูสายพันธุ์ใหม่ *Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., ในกลุ่ม α-Proteobacteria

ภัทรพร ยุคแผน[1], ทวีศักดิ์ มะลิมาศ[1], วันเชิญ โพธาเจริญ[1], สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์[2], มรกต ตันติเจริญ[1], และยูโซะ ยามาดะ[3]
[1]ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศช. หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี 12120 , [2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330
[3] JICA Senior Overseas Volunteer, Japan International Corporation Agency, Tokyo 151-8558, Japan

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของดีเอนเอบริเวณ 16S rDNA และ 16S-23S rDNA (ITS) ของแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่คัดแยกได้ระหว่างการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในประเทศไทย พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความลำดับวิวัฒนาการใกล้ชิดกับแบคทีเรียสกุล *Kozakia* และ *Asaia* แต่มีลำดับวิวัฒนาการแตกต่างไปจากแบคทีเรียทั้งสองสกุล ซึ่งจากการศึกษาความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA และ 16S-23S rDNA (ITS) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูชนิดอื่น 90.7-93.2% and 54.1-71.7% ตามลำดับ แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถแยกความแตกต่างจากแบคทีเรียสกุล *Kozakia* และ *Asaia* ได้โดยการศึกษารูปแบบที่ได้จากการตัดจำเพาะของดีเอนเอบริเวณ 16S-23S rDNA (ITS) ด้วยเอนไซม์ *Bcc*I and *Hha*I ซึ่งจะได้รูปแบบ

แตกต่างไปจากแบคทีเรียทั้งสองสกุล แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่นี้มีลักษณะโคโลนีสีชมพู ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สามารถออกซิไดซ์แอซิเตตและ แลคเตต ไม่สามารถผลิตเมือก สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีกลูโคส 30% สามารถเจริญในอาหารแข็งแมนนิทอลได้ดี และสามารถเจริญบนอาหารแข็งกลูตาเมทได้เล็กน้อย สามารถผลิตกรดจากเอธานอลได้ และมียูบิควิโนน-10 ดังนั้นจึงได้เสนอแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่และให้ชื่อว่า *Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov โดยมีสายพันธุ์ AC28^T (BCC 15763^T) ซึ่งได้คัดแยกจากดอกขิงแดงในจังหวัดเชียงใหม่เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ (Type strain)

Neoasaia chiangmaiensis gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the α-*Proteobacteria*

P. Yukphan[1], T. Malimas[1], W. Potacharoen[1], S. Tanasupawat[2], M. Tanticharoen[1], and Y. Yamada[3]
[1]BIOTEC Culture Collection (BCC), BIOTEC Central Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathumthani 12120, Thailand
[2]Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand, [3]JICA Senior Overseas Volunteer, Japan International Corporation Agency, Tokyo 151-8558, Japan

In a study on acetic acid bacteria diversity in Thailand, one strain was isolated in Chiang Mai. Phylogenetic trees based on 16S rDNA and 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences represented that the isolate had a close relationship to the genera *Kozakia* and *Asaia*, but constituted an independent cluster. Similarity values to other acetic acid bacteria in the two sequences were respectively 90.7-93.2% and 54.1-71.7%. The isolate was distinguished from strains of the two genera by restriction analysis of 16S-23S rDNA ITS regions with *Bcc*I and *Hha*I. The colony was pale-pink. Cells are non-motile. The isolate did not either oxidize acetate and lactate or produce a mucous substance, but grew well on 30% (w/v) D-glucose. The isolate grew on glutamate agar and mannitol agar, but the growth on glutamate agar was not intense. Acid was produced from ethanol. Major ubiquinone was Q-10. *Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov. is proposed. The type strain is AC 28^T (BCC 15763^T), which was isolated from a flower of red ginger.

การจำแนก *Gluconobacter frateurii* Mason and Claus 1989 ใหม่ โดยอาศัยรูปแบบที่ได้จากการตัดจำเพาะบริเวณ 16S-23S rDNA internal transcribed spacer

ทวีศักดิ์ มะลิมาศ [1], ภัทรพร ยุคแผน[1], ไม ทาคาฮาชิ [2], วันเชิญ โพธาเจริญ[1], สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์[3], ยาซูโยชิ นาคากาวา [2], มรกต ตันติเจริญ[1], และยูโซะ ยามาดะ[1]

[1]ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศช. หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี 12120, [2]Biological Resource Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Kisarazu 292-0818, Japan, [3]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330

แบคทีเรีย *Gluconobacter frateurii* จำนวน 23 สายพันธุ์ที่เก็บรักษา ณ NITE Biological Resource Center (NBRC) ถูกนำมาจำแนกใหม่ในระดับสปีชีส์ โดยอาศัยรูปแบบที่ได้จากการตัดจำเพาะบริเวณ 16S-23S rDNA ITS เปรียบเทียบกับตัวแทน (type strains) ของสายพันธุ์ใกล้เคียงสองสายพันธุ์ คือ *G. frateurii* (NBRC 3264^T) และ *G. thailandicus* (BCC 14116^T) โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิด ได้แก่ *Bsp1286*I *Mbo*II *Ava*II *Taq*I *Bso*BI และ *Bst*NI แบคทีเรียทั้งหมดถูกจำแนกออกเป็น 6 กลุ่ม คือกลุ่ม III-1 ถึง III-5 และ IV โดย กลุ่ม III-1 และกลุ่ม III-4 ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อย III-1a III-1b III-4a และ III-4b ตามลำดับ ซึ่งจากรูปแบบจากการตัดจำเพาะของ *G. frateurii* สายพันธุ์ที่เป็นตัวแทน (NBRC 3264^T) และ *G. frateurii* สายพันธุ์ NBRC 3265 และ NBRC 3270 ถูกจัดจำแนกไว้ในกลุ่ม III-2 ส่วน *G. thailandicus* สายพันธุ์ที่เป็นตัวแทน (BCC 14116^T) และ *G. thailandicus* สายพันธุ์ NBRC 3254 NBRC 3256 NBRC 3258 NBRC 3255 และ NBRC 3257 ถูกจัดไว้ในกลุ่ม III-3 จากการศึกษารูปแบบที่ได้จากการตัดจำเพาะนี้สอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ผลการทดลองทั้งหมดนี้ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 23 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษา มีความแตกต่างกันตามธรรมชาติทางด้านอนุกรมวิธาน ซึ่งเรียกได้ว่าเป็น *G. frateurii* complex

Re-identification of strains assigned to *Gluconobacter frateurii* Mason and Claus 1989 based on restriction analysis of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions

T. Malimas[1], P. Yukphan[1], M. Takahashi[2], W. Potacharoen[1], S. Tanasupawat[3], Y. Nakagawa[2], M. Tanticharoen[1], and Y. Yamada[1]

[1]BIOTEC Culture Collection, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathumthani 12120, Thailand, [2]Biological Resource Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Kisarazu 292-0818, Japan, [3]Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Twenty-three strains assigned to *Gluconobacter frateurii* maintained at Culture Collection NBRC were re-identified at the species level on the basis of restriction analysis of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) regions by digestion with six restriction endonucleases *Bsp*1286I, *Mbo*II, *Ava*II, *Taq*I, *Bso*BI, and *Bst*NI, along with the type strains of *Gluconobacter frateurii* (NBRC 3264^T) and *Gluconobacter thailandicus* (BCC 14116^T). The strains examined were divided into six groups, designated Group III-1–III-5 and Group IV. Group III-1 and Group III-4 were divided into two subgroups, respectively Subgroup III-1a and Subgroup III-1b and Subgroup III-4a and Subgroup III-4b. The type strain of *G. frateurii* constituted Group III-2, together with strains NBRC 3265 and NBRC 3270. On the other hand, the type strain of *G. thailandicus* constituted Group III-3, together with strains NBRC 3254, NBRC 3256, NBRC 3258, NBRC 3255, and NBRC 3257. These groupings were supported phylogenetically. The results obtained indicate that the 23 strains have a heterogeneous nature taxonomically, and can be referred to as the so-called *G. frateurii* complex.

การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่ทำงานในสภาวะรุนแรงจากเชื้อราต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทย

วราศิรินทร์ สอนเล็ก, อุกฤกษ์ รัตนโฉมศรี, เบญจพร บัวบาน, รัชดาภรณ์ ศรีปราง, วีระวัฒน์ แช่มปรีดา, สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์ และลิลี เอื้อวิไลจิตร

หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค 113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถ.พหลโยธิน คลองหลวง ปทุมธานี 12120

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตที่ย่อยสารออแกนิกได้ดี เนื่องจากผลิตเอนไซม์ต่างๆเช่น ไซแลนเนส เซลลูเลส ที่ย่อยสารโพลิเมอร์ตามธรรมชาติได้ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีความสำคัญในกระบวนการด้านเทคโนโลยีชีวภาพ และมีการใช้มากในอุตสาหกรรมต่างๆ ห้องปฏิบัติการเอนไซม์ที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทคได้ทดสอบเชื้อรา 766 ชนิด เพื่อดูการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส เซลลูเลส และ อะไมเลส ในสภาวะรุนแรง เช่น ที่อุณหภูมิสูง pH สูงและต่ำ ผลที่ได้พบว่า มีเชื้อรา 278 สายพันธุ์ที่ผลิตเซลลูเลสที่ทำงานได้ในสภาวะรุนแรง มีเชื้อรา 440 สายพันธุ์ที่ผลิตไซแลนเนสที่ทำงานได้ในสภาวะรุนแรง และมีเชื้อราอีก 55 สายพันธุ์ที่ผลิตอะไมเลสที่ทำงานได้ในสภาวะรุนแรง เชื้อราที่ผลิตเซลลูเลสนั้น ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม เอนโดไฟต์ ราจากมูลสัตว์ ไลเคนส์ และราที่ทนร้อน ส่วนราที่ผลิตไซแลนเนสได้นั้นอยู่ในกลุ่ม เอนโดไฟต์ ราดิน ราจากทราย ไลเคนส์ และราทนร้อน ส่วนราที่ผลิตอะไมเลสได้จะเป็นราที่อยู่ในกลุ่มราทนร้อน จากนั้นได้ทำการคัดเลือกเอนไซม์ 111 ชนิด (จาก 95 สายพันธุ์) เพื่อทำการทดสอบเพิ่มเติมเรื่อง ระดับการทำงาน (activity) ของเอนไซม์ สภาวะเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ การทนร้อน ทนกรดและด่าง ซึ่งผลที่ได้จะถูกรวบรวมอยู่ในแคตาลอกเอนไซม์ การศึกษานี้จะให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับข้อมูลของเอนไซม์ในประเทศไทยแก่อุตสาหกรรมในประเทศ และยังให้ข้อมูลในการศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกชนิดของเอนไซม์และการปรับปรุงเอนไซม์

Characterization of extremozymes isolated from various fungi collected in Thailand

W. Sornlek, U. Rattanachomsri, B. Buaban, R. Sriprang, V. Champreda, S. Tanapongpipat and L. Eurwilaichitr

BIOTEC Central Research Unit, 113 Thailand Science Park, Paholyothin Road, Klong Luang, Pathumthani 12120

Fungi are well-known agents of decomposition of organic matters, therefore their abilities to produce enzymes involving in hydrolyzing natural polymers such as xylanases, cellulases, and amylases are very important to in present day biotechnology as these enzymes can be used in a wide range of industries. Our laboratory has tested 766 fungal strains for activity of extreme xylanases, cellulases and amylases based on their activity in extreme environments, such as high temperature or high pH or low pH. The results showed that there were 278 strains producing extreme cellulases, 440 strains producing extreme xylanases and 55 strains producing extreme amylases. These extreme cellulases producers were of endophytic, dung, lichens and thermotolerant fungi, while extreme xylanases producers are of endophytic, soil, sand, lichens and thermotolerant fungi, and extreme amylases producers were of thermotolerant fungi. Then 111 extremozymes (from 95 fungi) were quantitatively assayed for activity and tested for optimal pH, optimal temperature, thermostability, and pH stability. The results were collected in the enzyme catalogue. This study will provide the first comprehensive enzyme database in Thailand for local industries. In addition, it will confer a basic knowledge for further studies, e.g. enzyme classification and enzyme improvement.

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากเชื้อราเอนโดไฟท์ ที่แยกจากพืชสกุล *Garcinia*

เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร[1], ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย[1], วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล[2] และจริยา สากยโรจน์[3]
[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
[3] Phylogenetics lab 113 อุทยานวิทยาศาตร์ประเทศไทย ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชสกุล *Garcinia* 5 ชนิดจากภาคใต้ของประเทศไทยประกอบไปด้วย ส้มแขก (*Garcinia atroviridis*) มะพูด (*G. dulcis*) มังคุด (*G. mangostana*) ชะมวง (*G. nigrolineata*) และ *G. scortechinii* ได้เชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 1,979 isolates ทำการสุ่มเลือกเชื้อราที่มีลักษณะ colony แตกต่างกันจำนวน 377 isolates (19.0%) นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) แล้วทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อราที่อายุ 2 และ 3 สัปดาห์ ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยวิธี agar well diffusion จากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่นำมาทดสอบทั้งหมด 377 isolates พบว่ามีเชื้อราเอนโดไฟท์ ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จำนวน 70 isolates (18.5%) แบ่งเป็นเชื้อราเอนโดไฟท์ 34 isolates (48.6%) ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ methicillin-resistance *S. aureus* สายพันธุ์ SK1 (MRSA) สำหรับฤทธิ์ต้านเชื้อรานั้น พบว่ามีเชื้อราเอนโดไฟท์ถึง 37 isolates (52.8%) ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012 และมีเพียง 3 isolates (4.2%) เท่านั้นที่ยับยั้ง *Candida albicans* ATCC90028 แต่เชื้อราเอนโดไฟท์ทุก isolate ที่นำมาทดสอบ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC29522, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 และเชื้อรา *Microsporum gypseum* เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ ไปสกัดด้วย ethyl acetate แล้วนำสารสกัดไปหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี agar microdilution พบว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา 6 และ 4 สาร จากเชื้อราเอนโดไฟท์ 6 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC25923 และ MRSA ได้ตามลำดับ โดยมี ค่า MIC ระหว่าง 32-512 μg/ml สารสกัดจากเชื้อราเอนโดไฟท์ 2 สาร จากเชื้อรา 2 สายพันธุ์ ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC90028 ให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 128-200 μg/ml และมีสารสกัดจากเชื้อรา 3 สาร จากเชื้อรา 4 สายพันธุ์ ที่ยับยั้งเชื้อ *C. neoformans* ATCC90012 ได้ โดยมีค่า MIC ระหว่าง 64->128 μg/ml เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพทั้งหมด 22 สายพันธุ์ไปจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ศึกษายีนส่วน Internal transcribed spacer (ITS1 และ ITS2) พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ มีความหลากหลาย กระจายอยู่ใน 6 อันดับ (Order) ได้แก่ Hypocreales Diaporthales Xylariales Pleosporales Eurotiales และ Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis

Antimicrobial activity from endophytic fungi isolated from *Garcinia* spp.

S. Phongpaichit[1], N. Rungjindamai[1], V. Rukachaisirikul[2] and J. Sakayaroj[3]
[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112,
[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90012,
[3]Phylogenetics lab, 113 Thailand Science Park, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120

A total of 1,979 endophytic fungi were isolated from healthy plant tissues of 5 *Garcinia* species from southern Thailand; *Garcinia atroviridis, G. dulcis, G. mangostana, G. nigrolineta* and *G. scortechinii.* Three hundred and seventy seven isolates (19.0%) were randomly selected according to colony morphology to screen for their antimicrobial activities against seven human pathogens. Fungal isolate was inoculated into 300 ml Potato dextrose broth (PDB) and incubated at room temperature for two to three weeks. Culture filtrates were then checked for their antimicrobial activities by agar well diffusion method. Seventy out of 377 isolates (18.6%) demonstrated antimicrobial activity. Among these, 34 isolates (48.6%) inhibited *Staphylococcus aureus* ATCC29523 and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA SK1), 37 isolates (52.8%) inhibited *Cryptococcus neoformans* ATCC90012, and only 3 isolates (4.2%) inhibited *Candida albicans* ATCC90028. All isolates had no activity against *Escherichia coli* ATCC29522, *Pesudomonas aeruginosa* ATCC27853, and *Microsporum gypseum.* Ethyl acetate extracts of the culture broth were then tested for their minimum inhibitory concentrations (MICs) by agar microdilution method. Six and four Extracts from 6 fungal isolates inhibited *S. aureus* ATCC 25923 and MRSA respectively with MIC values of 32-512 μg/ml. Two extracts inhibited *C. albicans* with MICs of 128-200 μg/ml and three extracts from four fungal isolates exhibited MICs of 64->128 μg/ml against *C. neoformans*. Based on Internal Transcribed Spacer (ITS1 and ITS2) analyses, 22 antimicrobial producing fungi belong to 6 orders; Hypocreales, Diaporthales, Xylariales, Pleosporales, Eurotiales, and Dothideomycetes et Chaetothyriomycetes incertae sedis.

การศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายของราที่พบบนปาล์มในประเทศไทย

อีวาน เบนจามิน กาเรท โจนส์
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 113 ถ. พหลโยธิน ต. คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

ปาล์มเป็นพืชที่อยู่กระจายตัวทั่วไปในประเทศไทย ในสภาวะพื้นที่ต่างๆ เช่น เขต terrestrial เขตป่าพรุ จากรายงานพบว่ามีปาล์มกระจายอยู่ในประเทศไทยประมาณ 31 สกุล และพบว่ากว่า 30 สปีชีส์ เป็นพืชท้องถิ่น พบปาล์มหลายสปีชีส์ในประเทศไทยเป็นกลุ่มเดียวกับประเทศเพื่อนบ้าน คือมาเลซีย (ประมาณ 100 สปีชีส์) ปาล์มสกุล *Calamus* พบมากที่สุดในประเทศไทย (42 สปีชีส์) และพบปาล์มในเขตภาคใต้ของประเทศไทยมากที่สุด (ประมาณ 125 สปีชีส์) ราแซพโพรไฟท์ เอนโดไฟท์ และราสาเหตุของโรคที่พบบนปาล์มมีรายงานมาแล้วกว่า 1,580 taxa แต่ยังไม่มีการศึกษาใดที่มีข้อมูลอธิบายได้ว่าทำไมปาล์มจึงเป็นพืชที่พบความหลากหลายของรามาก และในการศึกษาครั้งนี้จะทำการทดสอบและค้นคว้าหาปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพของราที่พบบนปาล์ม

Comparative fungal diversity studies on palms in Thailand

E. B. Gareth Jones
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), 113 Pahonyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120

Palms are widely distributed in Thailand and occur in a variety of habitats: terrestrial, acidic peat swamps and brackish estuarine areas where they generally occur as an under-storey community (Tomlinson, 1990). Some 155 indigenous palms in 31 genera have been reported for Thailand of which 30 species are endemic. Thailand shares many palms (100 species) with its neighbouring country Malaysia. The largest genus in Thailand is the climbing rattan (*Calamus*) with 42 species (Hodel and Vatcharakorn, 1998). The southern part of the principality supports the greatest number of palms (125 species) (Hodel and Vatcharakorn, 1998). A wide range of saprobic, endophytic and parasitic fungi colonize palms with over 1,580 taxa recorded to date. Why palms support such a rich diversity of fungi has not been explored in any detail, and this study will examine the factors that govern their success in growing in habitats that are often environmentally harsh.

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราทะเลแอสโคไมโคตาและความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย

อีวาน เบนจามิน กาเร็จ โจนส์, จริยา สากยโรจน์ และอิทธิชัย ชาติมาลา
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 113 ถ พหลโยธิน ต. คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120

โครงการวิจัยนี้ได้ดำเนินการสิ้นสุดแล้ว มุ่งศึกษาหาสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับชีวโมเลกุลของราทะเล โดยวิเคราะห์จากลำดับเบสสายไรโบโซมอลดีเอ็นเอของราทะเลแอสโคไมโคตาในอันดับ Halosphaeriales Lulworthiales และกลุ่มที่ไม่สามารถจัดจำแนกในอันดับที่เหมาะสมได้จำนวน 22 สกุล รวมทั้งราทะเลกลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศอีก 15 สกุล เช่น *Torpedospora Swampomyces Haligena Remispora Carbosphaerella Ceriosporopsis Marinospora Naufragella Ocostaspora Zalerion Cirrenalia Dendryphiella* และ *Sigmoidea* ผลงานการวิจัยได้นำเสนอราสกุลและชนิดใหม่ๆ โดยอ้างอิงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล ได้แก่ *Morakotiella Halosigmoidea Cumulospora varia Cirrenalia sphaerocephala Lulworthia rostrupiella Lulworthia* sp. และ *Thalespora* เป็นต้น นอกจากนี้ยังรวบรวมข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของราทะเลในประเทศไทยได้ทั้งสิ้น 153 ชนิด โดยแบ่งเป็นกลุ่ม เบสิดิโอไมโคตา 3 ชนิด แอสโคไมโคตา 116 ชนิด ราที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 27 ชนิด และสตรามิโนไพล์ 7 ชนิด

Molecular phylogeny of selected genera of marine ascomycota and their biodiversity in Thailand

E. B. Gareth Jones, J. Sakayaroj and I. Chatmala
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), 113 Pahonyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120

One hundred fifty three fully identified marine fungi have been recorded for Thailand, representing 116 Ascomycota, 3 Basidiomycota, 7 Stramenopiles and 27 anamorphic taxa, a further 26 have been incompletely identified and 48 taxa await further study bringing the total to 230 taxa. The phylogenetic relationship of 37 genera has been investigated (22 Ascomycota, 15 anamorphic taxa). The study has focused mainly on genera classified in the Halosphaeriales and Lulworthiales, both orders with predominantly marine species. Molecular data confirm the correct disposition of the genera *Carbosphaerella, Ceriosporopsis, Haligena, Marinospora, Naufragella, Ocostaspora, Remispora* in the Halosphaeriales. Assignment of other genera cannot be resolved at the present time until further sequences are available in the GenBank: *Torpedospora, Swampomyces.* A number of anamorphic taxa can now be assigned to their teleomorphic order/family as the result of this study: *Dendryphiella* (Pleosporaceae, Pleosporales), *Sigmoidea marina* (*Corollospora*, Halosphaeriaceae, Halosphaeriales) and others can be assigned to the Lulworthiales. It has been shown be sequence analysis that both marine *Sigmoidea* species do not belong in that genus, and will be transferred to a new genus *Halosigmoidea*. A number of new anamorphic fungi have been described by us: *Cumulospora varia, Cirrenalia sphaerocephala*, and the ascomycetes await description: *Lulworthia rostrupiella, Lulworthia* sp., and the marine *Thalespora.*

การประยุกต์ใช้คุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะในการตรวจสอบผลกระทบของการปนเปื้อนโลหะหนักต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ในน้ำทิ้งจากชุมชนและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ลัดดาวรรณ จันทโหม[1] (นักศึกษา), นุกูล อินทระสังขา[1] (อาจารย์ที่ปรึกษา), นพดล ศุกระกาญจน์[1] (อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม), หิริหัทยา เพชรมั่ง[2] (อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม)

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ต.เขารูปช้าง อ.เมือง จ.สงขลา 90000

[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ต.เขารูปช้าง อ.เมือง จ.สงขลา 90000

ผลพวงจากการขยายตัวอย่างรวดเร็วของภาคอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม ส่งผลให้ประเทศไทยประสบกับปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อม มีรายงานการปนเปื้อนของสารพิษตกค้างหลายชนิดในสิ่งแวดล้อม เช่น ตัวทำละลาย โลหะหนัก สารฆ่าแมลง และยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะโลหะหนักซึ่งย่อยสลายยาก และมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในระดับสูง แต่พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีส่วนของ Extrachomosomal DNA หรือ Plasmid ปรากฏบนสารพันธุกรรม จะมีความสามารถในการต้านทานโลหะหนักและยาปฏิชีวนะ และส่วนของยีนต้านทานโลหะหนักและยาปฏิชีวนะนี้สามารถเคลื่อนย้ายไปสู่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ จึงนำไปสู่แนวความคิดการตรวจสอบการปนเปื้อนของโลหะหนักโดยใช้แบคทีเรียที่ต้านทานยาปฏิชีวนะ เป็นดัชนีในตัวตรวจวัดปริมาณการปนเปื้อนโลหะหนักเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ทางเคมี ผลการศึกษาเบื้องต้นจากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำจากคลองสำโรง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา จำนวน 5 จุด มาทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะ 4 ชนิดคือ Streptomycin Kanamycin Tetracycline และ Chloramphenicol และทดสอบการต้านโลหะหนัก 4 ชนิด คือ เหล็ก สังกะสี ทองแดง และ ปรอท พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณที่เป็นแหล่งชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม มีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและโลหะหนักอยู่ในระดับสูง แต่ความหลากหลายของสายพันธุ์ค่อนข้างต่ำ สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ต้านทานต่อโลหะหนักจำนวน 11 สายพันธุ์ ซึ่งใช้สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดโลหะหนักต่อไป สรุปได้ว่าการปนเปื้อนของสารพิษตกค้างในดินและน้ำเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม

Application of antibiotic resistance to monitor the heavy metals contamination impacts to microbial diversity from domestic and aquaculture wastewaters

L. Chanthahom[1] (Graduate Student), N. Intrasungkha[1] (Thesis Advisor), N. Sukrakanchana[1] (Thesis Co-advisor), H. Phetmung[2] (Thesis Co-advisor)

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla 90000

[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla 90000

The rapid increase of industrial and agricultural activities in Thailand has resulted in environmental pollution problems. Contamination of the environment by various types of various hazardous wastes i.e. solvents, heavy metals, pesticides and antibiotics have been reported. In particular, heavy metals which are non-biodegradable exhibit high toxic effects to various organisms. However, it was found that many microorganisms containing extrachromosomal DNA and some elements i.e. plasmids, transposons or integrons confer antibiotic and heavy metal resistance. These genetic materials are easily transferable among phylogenetically distant bacteria. This led to the objective of the present study which aims to isolate various bacteria as an indicator for the contamination of heavy metals using antibiotic resistance characteristics in conjunction with the chemical analysis method. Bacterial strains were isolated from soil and water collected from 5 sites of Samrong canal (Muang district, Songkhla province, Thailand). The preliminary results showed that bacterial strains isolated from industrial and community areas and exhibit a high resistance to antibiotics (Streptomycin, Kanamycin, Tetracycline and Chloramphenicol) and also had a high resistance to heavy metals such as (Fe, Zn, Cu and Hg). However, a very low diversity of bacterial strains was found. Eleven strains of heavy metal resistance bacteria were selected in order to further study their heavy metal bioremediation efficiency. It can be concluded that the contamination of soil and water by hazardous wastes contributes immensely to gene mutation and the decrease of microbial diversity in environment.

การศึกษาหาความแตกต่างและการวิวัฒนาการของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ชนิดที่มีโครงสร้างของไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ต่างกันโดยวิธี พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

สุมาลี ตั้งประดับกุล[1], พินน์นรา โรจน์วิรัตน์[2], อัญชสา คณานุรักษ์[2] และสุดา ตันพิบูลย์ศักดิ์[1]
[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400, [2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400

การศึกษาการใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี เพื่อการแยกความแตกต่างของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่มีโครงสร้างของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (แอลพีเอส) ที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีรายงานการศึกษาโครงสร้างของไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่สกัดจากเชื้อ *B. pseudomallei* จากแหล่งต่างๆ ทั้งในประเทศไทยเทียบกับเชื้อที่แยกได้จากประเทศออสเตรเลีย ซึ่งพบว่าเชื้อที่แยกได้จากประเทศไทยส่วนมากจะมีโครงสร้างของแอลพีเอส เป็นชนิดที่เป็นขั้นบันได เรียกว่า Typical ส่วนเชื้อทีแยกได้ในประเทศออสเตรเลียส่วนใหญ่จะให้โครงสร้างของแอลพีเอส เป็นชนิดไม่มีขั้นบันได เรียกว่าเป็น Atypical การวิจัยนี้จึงได้นำข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอลพีเอส คือ WaaF gene ที่ได้มีศึกษาว่ามีส่วนเกี่ยวข้องในขบวนการสังเคราะห์แอลพีเอส โดยนำมาเป็นยีนเป้าหมายเพื่อศึกษาความแตกต่างในระดับนิวคลีโอไทด์ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่จะสามารถแยกความต่างได้อย่างน้อย 3 เอนไซม์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี จากการศึกษาเชื้อตัวอย่างในแหล่งต่างๆ ทั้งที่ได้จากผู้ป่วย สัตว์และแหล่งดินในประเทศไทย ออสเตรเลีย ลาว และฮ่องกง จำนวน 141 ตัวอย่าง พบแบบแผนของ พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี แบ่งเป็น 4 กลุ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับแบบแผนของ LPS ซึ่งมี 3 แบบ หลังจากนำข้อมูลแบบแผนพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี มาวิเคราะห์สร้าง Phylogenic tree เปรียบเทียบกับการสร้าง Phylogenic tree ที่นำข้อมูลจากพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีรวมกับ LPS สามารถหาความสัมพันธ์ในการกระจายของเชื้อเป็น 6 แบบ ที่น่าสนใจคือเชื้อที่มาจากแหล่งดินจะมีแบบแผนที่แตกออกจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน แต่เนื่องจากมีจำนวนน้อยจึงน่าจะทำเพิ่ม ส่วนการหาความสัมพันธ์กับการก่อความรุนแรงของการก่อโรคยังไม่ได้วิเคราะห์ซึ่งจะเพิ่มเติมในภายหลัง

Differentiation and evolutionary study based on lipopolysaccharide (LPS) structure of *Burkholderia pseudomallei* using PCR-RFLP technique

S. Tungpradabku1[1], P. Rojwiratana[2], A. Kananurak[2], S. Tunpiboonsak[1]
[1]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, [2]Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400

The project aims to differentiate *B. pseudomallei* having different lipopolysaccharide (LPS) structures using the PCR-RFLP technique. Recently, have been reported the different LPS structures found in *B. pseudomallei*. In particular, the major LPS structures found in *B. pseudomallei* isolated from Thailand are ladder patterns, which is the so-called typical pattern. In contrast, the major LPS structures of *B. pseudomallei* isolated from Australia are smear patterns, the so-called atypical pattern. Our study is focused on a gene, the WaaF gene, which is involved in LPS biosynthesis. A pair of specific primers was designed based on the WaaF gene sequence. Polymerase chain reaction followed by restriction endonuclease (PCR-RFLP) analysis was performed. At least three restriction enzymes, *Eco*RI, *Pst*I, *Not*I, were used to differentiate the different LPS structures among 141 isolates from different sources, such as patients, animals, and the environment from Thailand, Australia, Laos and Hong Kong. The results showed that the different PCR-RFLP patterns divided into 4 types. In addition, the comparative LPS pattern of all 141 isolates were detected in three profiles. Phylogenic trees constructed using under PCR-RFLP and PCR-RFLP+LPS were compared. The results showed the relationships among these 141 isolates with 6 characters or branches. Interestingly, the bacteria from soil isolates have distinct character that separates them from the other. However, the number of bacteria from soil isolates was too small. Thus we should investigate using higher numbers of samples. The results from this study were found to be related with the distribution of *B. pseudomallei* found in this region. Moreover, the different PCR-RFLP patterns and phylogenetic trees in this study still could not explain the differences in virulent properties of the bacteria, which needs more analysis of the data.

การหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมสังเคราะห์โดยรากลุ่ม Xylariaceae

ประเสริฐ ศรีกิติกุลชัย[1], อนุพงศ์ คล้ายสุบรรณ[2], นฤมล พลายงาม[2], สมศักดิ์ ศิวิชัย[1] และ อีวาน เบญจามิน กาเร็ท โจนส์[1]
[1] ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) 113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120, [2] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม กรุงเทพฯ 10900

ราไซลาเรียมีความสามารถในการย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้ สีย้อมสังเคราะห์มีโครงสร้างเป็นวง aromatic คล้ายลิกนิน งานวิจัยนี้ได้เลือกราไซลาเรีย 4 สายพันธุ์คือ *Xylaria* sp. BCC 7558 *Xylaria* sp. BCC 7559 *Xylaria* sp. BCC 7571 และ *Xylaria* sp. BCC 7794 เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสีย้อมสังเคราะห์ 4 ชนิด คือ Poly R-478 Malachite Green Carbinol Base (MG) Remazol Brilliant Blue R (RB) และ Crystal Violet ทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว ผลการทดลองพบว่า ราไซลาเรียทุกสายพันธุ์สามารถย่อยสลายสีย้อมสังเคราะห์บนอาหารแข็งได้ ส่วนในอาหารเหลวนั้นพบว่าราไซลาเรียที่สามารถย่อยสลายสีย้อมสังเคราะห์ต่างๆ 50% ในระยะเวลา 5 วัน คือ สี Poly R-478 ถูกย่อยสลายโดยราไซลาเรีย สายพันธุ์ BCC 7571 และ BCC 7794 สี MG ถูกย่อยสลายโดยราไซลาเรีย สายพันธุ์ BCC 7794 สี RB ถูกย่อยสลายโดยราไซลาเรีย สายพันธุ์ BCC 7559 BCC 7571 และ BCC 7794 สี Crystal Violet ถูกย่อยสลายโดยราไซลาเรีย สายพันธุ์ BCC 7558 BCC 7559 BCC 7571 และ BCC7794 ราไซลาเรียสายพันธุ์ BCC 7794 ถูกเลือกเพื่อนำมาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายสีย้อมสังเคราะห์ในอาหารเหลว DDM โดยศึกษาปัจจัยของ ความเข้มข้นของสีย้อมสังเคราะห์ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่าความเข้มข้นของสี Poly R-478 และ RB ที่เหมาะสมคือ 0.2 กรัมต่อลิตร Crystal Violet และ MGที่เหมาะสมคือ 0.1 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการย่อยสลายสี Poly R-478 คือ กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร + Malt extract 15 กรัมต่อลิตร สี RB คือ กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ส่วนสี Crystal Violet และ MG คือ กลูโคส 2 กรัมต่อลิตร + Malt extract 3 กรัมต่อลิตร ส่วนแหล่งของไนโตรเจนใช้ Peptone ซึ่งความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ 0.1, 0.5, 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรในการย่อยสลายสีต่างๆ คือ MG, Poly R-478, RB และ Crystal Violet ตามลำดับ

Optimization of synthetic dyes degrading by Xylariaceous fungi in Thailand

P. Srikitikulchai[1], A. Klaysuban[2], N. Plaingam[2], S. Sivichai[1] and E.B. Gareth Jones[1]
[1]BIOTEC, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 113 Thailand Science Park, Pahonyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, [2]Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Chandrakasem Rajabhat University, Bangkok 10900

The Xylariaceous fungi have ability to degrade lignin in wood cell. Synthetic dyes have structural aromatic ring as lignin. Four strains (*Xylaria* sp. BCC 7558; *Xylaria* sp. BCC 7559; *Xylaria* sp. BCC 7571 and *Xylaria* sp. BCC 7794) were selected to evaluate their ability to decolourize 4 synthetic dyes (Poly R-478, Malachite Green Carbinol Base (MG), Remazol Brilliant Blue R (RB) and Crystal Violet) on agar plates and in liquid culture. All strains decolourized all the synthetic dyes on agar plates. The following dyes were decolourized: 50% decolourization in 5 days for Poly R-478 (*Xylaria* sp. BCC 7571; *Xylaria* sp. BCC 7794); MG (*Xylaria* sp. BCC 7794); RB (*Xylaria* sp. BCC 7559; *Xylaria* sp. BCC 7571; *Xylaria* sp. BCC 7794), and Crystal Violet (*Xylaria* sp. BCC 7558; *Xylaria* sp. BCC 7559; *Xylaria* sp. BCC 7571; *Xylaria* sp. BCC 7794). *Xylaria* sp. BCC 7794 was selected to study in concentration of synthetic dyes, carbon and nitrogen source for optimization of synthetic dyes degradation in Dye Decolourization Medium (DDM). The optimum concentration of Poly R-478 and RB were 0.2 g/l. Crystal Violet and MG were 0.1 g/l for optimum concentration. Glucose 10 g/l+ Malt extract 15 g/l was optimum for Poly R-478 degradation. Glucose 20 g/l was suitable to degrade RB and Glucose 2 g/l+ Malt extract 3 g/l was optimum for Crystal Violet and MG. Optimum concentration of nitrogen source (peptone) were 0.1, 0.5, 0.5 and 1.0 g/l for MG, Poly R-478, RB and Crystal Violet, respectively.

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของราน้ำในสกุล *Cudoniella*, *Hymenoscyphus* และ ราน้ำ ในกลุ่มอินโกเดียนที่สัมพันธ์กัน

นัฐวุฒิ บุญยืน[1,2], สมศักดิ์ ศิวิชัย[2], ไนเจล เลสลีย์ ไฮเวลโจนส์[2] และจิรพันธ์ วรพงษ์[1,3]

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถ.พระรามหก เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

[2]ห้องปฏิบัติการราวิทยา ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ 113 ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120, [3]สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ถ.พุทธมณฑลสาย 4 ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170

การศึกษาวิวัฒนาการระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ดีเอนเอของลำดับเบสในบริเวณ ITS1-2 และ 5.8S rDNA ของตัวอย่างราน้ำและกลุ่มอินโกเดียนทั้งหมด 19 สายพันธุ์ พบว่ามีวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน ราน้ำในสกุล *Cudoniella Hymenoscyphus* และราน้ำในกลุ่มอินโกเดียนถูกพิสูจน์ว่ามีวิวัฒนาการมากกว่าหนึ่งบรรพรุษ ผลการศึกษายังบ่งชี้ได้ว่าลักษณะของการย้อมติดสีและไม่ติดสีที่ปลายบนถุงสปอร์แอสคัสของราน้ำ *C. indica* (SS708, CBS430.94) และ *H. varicosporoides* (CBS 651.66) ถือว่าไม่ใช่ลักษณะรูปร่างที่สำคัญที่จะนำมาใช้ในการแยกราน้ำทั้งสองดังกล่าว อีกทั้งยังพบว่าการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของราดังกล่าวมีความเหมือนกันอย่างมีนัยสำคัญถึง 98-99.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าเป็นหลักฐานที่กล่าวเป็นนัยได้ว่า *H. varicosporoides* และ *C. indica* เป็นสายพันธุ์เดียวกันและมีบรรพบุรุษร่วมกัน ยิ่งไปกว่านั้นผลการศึกษาราน้ำ *H. varicosporoides* พบว่าควรมีชื่อในช่วงการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศว่า *T. varicosporoides* ซึ่งสอดคล้องตามข้อเสนอของ ศิวิชัย และคณะ (2546)

A molecular phylogenetic study of selected *Cudoniella*, *Hymenoscyphus* and their related species from freshwater habitats

N. Boonyuen[1,2], S. Sivichai[2], N.L Hywel-Jones[2] and J. Worapong[3,1]

[1]Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Rd., Bangkok 10400, [2]BIOTEC, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, 113 Pahonyothin Rd. Khlong 1, Khlong Luang, Pathum Thani 12120, [3]Center for Biotechnology, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Bhudthamonthon 4 Rd., Nakorn Pathom 73170

Phylogenetic analysis based on ITS1-5.8S-ITS2 DNA sequences suggested that 19 selected strains of Helotiaceae in this study are a monophyletic group. However, *Cudoniella*, *Hymenoscyphus* and their anamorph genera proved to be polyphyletic. Additionally, the results have shown that the presence or absence of a staining reaction of the apical ring is not a phylogenetically reliable character used to distinguish between two species of *Cudoniella indica* (SS708 and CBS430.94) and *Hymenoscyphus varicosporoides* (CBS 651.66). The significant identity 99-99.5% of ITS1-5.8S-ITS2 sequences and the phylogenetic evolutionary trees are strong evidences suggesting that these two species are synonymous fungi sharing a recent common ancestor while the anamorph of *H. varicosporoides* should be classified under the species of *T. varicosporoides* as proposed by Sivichai et al. (2003).

การศึกษาแหล่งอาหารที่เหมาะสมในการพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเชื้อราจากไลเคน เพื่อการสร้างและตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

วีระ ศรีอินทร์สุทธิ, สมศักดิ์ ศิวิชัย, พัชราภรณ์ วงษา, ปาจรีย์ ไม้ทิพย์ และไนเจล เลสลีย์ ไฮเวล-โจนส์
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ 113 ถนนพหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของราจากไลเคนจำนวน 50 สายพันธุ์พบว่า 32% มีฤทธิ์ในการยับยั้งวัณโรค 8% มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Candida albican* 2% มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์เยื่อบุปากในคน และ 56% มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริม ในขณะที่ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งมาลาเรียและมะเร็งในเต้านม เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลดีที่สุดเพื่อการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเชิงลึกพบว่ามีราจากไลเคน 5 สายพันธุ์ที่มีสารสำคัญในการออกฤทธิ์ และขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการตรวจสอบทางเคมีต่อไป ในการศึกษาการเพิ่มสารอาหารปฐมภูมิ 2 ชนิด คือสารสกัดจากสาหร่ายเกลียวทองและอาหารเลี้ยงสาหร่าย BBM เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญของเชื้อราจากไลเคน และเลี้ยงเชื้อแบบผสมกับเชื้อรา *Candida albicans* เพื่อเหนี่ยวนำให้ราจากไลเคนสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ผลที่ได้พบว่า ราจากไลเคน 10 สายพันธุ์ให้ผลที่แตกต่างกัน โดยราส่วนใหญ่ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้ง (90%) และราบางตัวมีฤทธิ์อ่อนในการยับยั้ง (10%) อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้คาดว่ามีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง ซึ่งต้องศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

A study on optimal media in the development of culture technique of lichenized fungi for the production and screening of bioactive compounds

V. Sri-indrasutdhi, S. Sivichai, P. Wongsa, P. Maithip and Nigel L. Hywel-Jones
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park, 113 Pahonyothin Rd., Khlong 1, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Primary screening of bioactive compounds from 50 strains of lichenized fungi were found 32% anti-tuberculosis, 8% anti-fungi (*Candida albicans*), 2% anti-oral human epidermal cell and 56% anti-*Herpes simplex* virus while inactive in anti-malaria and anti-breast cancer. A study of secondary screening from the best results of selected lichenized fungi were found 5 strains have shown the strongly active compound and now we demonstrate in chemical technique at BIOTEC bioresources laboratory. A study on optimal media by added 2 algal primary resources (Spirulina extract and BBM) for increase the growth of cultures and mix culture with *Candida albicans* for inducing the bioactive compound to inhibit the growth of fungi. Ten selected strains of lichenized fungi were inactive (90%) and weakly active (10%). However, we expect some effects to react with mix culture and require more knowledge to study in the future.