บทคัดย่อ

244851

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่มเชื้อ *Bacillus* spp. และ actinomycetes เพื่อนำมายับยั้งเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางพารา โดยทำการแยกเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 206 ไอโซเลทและ actinomycetes 151 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินและตัวอย่างยางพาราแผ่น นำมาทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางพาราในภาคใต้ของไทยจำนวน 6 ไอโซเลท ซึ่งประกอบด้วย *Aspergillus* spp. 2 ไอโซเลท *Penicillium* sp. 1 ไอโซเลท *Fusarium* sp. 1 ไอโซเลท *Rhizopus* sp. 1 ไอโซเลท และ *Cladosporium* sp. 1 ไอโซเลท ด้วยวิธี dual culture technique พบว่า 85% ของเชื้อ actinomycetes สามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างน้อย 1 ไอโซเลท ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* spp. เพียง 16% ที่แสดงฤทธิ์ต้านรา ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะเชื้อ actinomycetes ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดจำนวน 30 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP-2 นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบฤทธิ์ต้านราด้วยวิธี agar dilution พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes AC41 และ AC51 สามารถยับยั้งเชื้อราทุกไอโซเลทได้มากกว่า 80% น้ำเลี้ยงเชื้ออีกส่วนหนึ่งได้นำไปสกัดด้วย ethyl acetate แล้วนำสารสกัดหยาบมาหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution สารสกัดจากเชื้อปฏิปักษ์ actinomycetes 8 ไอโซเลท คือ AC37, AC41, AC51, AC70, AC72, AC74, AC78 และ AC84 สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ทั้ง 6 ไอโซเลท โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 8-200 μg/ml ซึ่งเชื้อ AC41 และ AC51 ให้ค่า MIC ดีที่สุดอยู่ในช่วง 16-64 μg/ml มีค่าใกล้เคียงกับสารต้านราพาราไนโตรฟีนอลที่ให้ค่า MIC ในช่วง 32-128 μg/ml เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารต้านเชื้อราของ AC41 และ AC51 โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 3 ปัจจัย คือ การเขย่า พีเอช และอุณหภูมิ พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดในการสร้างสารต้านเชื้อรา คือ เลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชเริ่มต้น 7 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อปฏิปักษ์ actinomycetes ทั้ง 8 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ทุกตัว ได้นำมาจำแนกด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีวโมเลกุล พบว่าจัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC41 และ AC51 ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นโดยการชุบสารและหยดเชื้อ *Aspergillus* sp. SR9 และ *Penicillium* sp. PR02 ลงไปบนแผ่นยาง พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. AC41 และ AC51 ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ ส่วนสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/ml สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ประมาณ 9 วัน ใกล้เคียงกับสารต้านราพาราไนโตรฟีนอล ซึ่งดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมสารที่สังเกตพบการเจริญของเชื้อราในวันที่ 5 เมื่อนำแผ่นยางชุบสาร

สกัด AC51 ความเข้มข้น 16 MIC (512 μg/ml) ในสภาพธรรมชาติ สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ 32 วัน ส่วนการเติมสารสกัด AC51 ในขั้นตอนการตกตะกอนของการเตรียมยางแผ่นและหยดเชื้อบนยางแผ่นที่เตรียมได้พบว่าที่ความเข้มข้น 32 MIC ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. SR9 ได้ แต่สามารถควบคุม *Penicillium* sp. PR02 ได้ใกล้เคียงกับสารต้านราพาราไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 8 MIC สำหรับในสภาพธรรมชาติพบว่าสารสกัด ความเข้มข้น 32 MIC สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ใกล้เคียงกับสารต้านราพาราไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 32 MIC และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด พบว่าสารสกัด *Streptomyces* sp. AC51 ทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราทำให้มีการรั่วไหลของสารออกมานอกเซลล์ ทำการแยกสารจากส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตทจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. AC51 แยกได้สาร tetrangulol methyl ester เป็นสารหลัก และสาร 8-*O*-methyltetrangomycin และ tetrangulol

ABSTRACT

244851

The aim of this study was to isolate *Bacillus* spp. and actinomycetes and screen for their antagonistic activity against fungi contaminated on para rubber sheet. Total of 206 *Bacillus* spp. and 151 actinomycetes from soils and para rubber sheets were screened for antagonistic activity by dual culture technique against six fungi (2 *Aspergillus* spp., 1 *Penicillium* sp., 1 *Fusarium* sp., 1 *Rhizopus* sp. and 1 *Cladosporium* sp.) commonly found on contaminated para rubber sheets in southern Thailand. Eighty-five percents of actinomycetes exhibited antifungal activity against at least one fungal isolate, whereas only 16% of *Bacillus* isolates was active. Thus, the top 30 actinomycetes having antifungal activity were selected for fermentation in ISP-2 broth. The culture filtrates were tested for antifungal activity by agar dilution. Actinomycetes isolates AC41 and AC51 showed >80% inhibitory activity against all tested fungi. The culture filtrates were also extracted with ethyl acetate and the crude extracts were tested for their minimal inhibitory concentrations (MICs) by broth microdilution. Extracts from 8 actinomycetes AC37, AC41, AC51, AC70, AC72, AC74, AC78 and AC84 exhibited antifungal activity against all tested fungi with MICs ranging from 8-200 µg/ml. The best MICs were in the range of 16-64 µg/ml by AC41 and AC51 which appeared to be comparable to *p*-nitrophenol, a control antifungal agent (32-128 µg/ml). The effect of agitation, initial pH and temperature on the production of antifungal metabolites by the isolates AC41 and AC51 was investigated. The optimum conditions for AC41 and AC51 were observed at the static condition, pH7 and temperature 30°C. The top 8 antagonistic actinomycetes were identified by morphological characteristics and molecular technique (16S rDNA). All of these actinomycetes are in the genus *Streptomyces*. Para rubber sheet soaked with culture broths of *Streptomyces* sp. AC41 and AC51 and challenged with *Aspergillus* sp. SR9 และ *Penicillium* sp. PR02 could not control fungal growth while crude extracts (1 mg/ml) could control fungal growth for 9 days which was similar to the result obtained from *p*-nitrophenol. In natural infection experiment, para rubber sheet soaked with crude extract of *Streptomyces* sp. AC51 (16 MIC, 512 µg/ml) could control fungal growth for 32 days. Para rubber sheet supplemented with crude extract of *Streptomyces* sp. AC 51 (32MIC) and challenged with fungi could not control the growth of *Aspergillus* sp. SR9 but could

244851

control *Penicillium* sp. PR02 comparable to the use of *p*-nitrophenol (8MIC). However, in natural infection, AC51 (32MIC) was as effective as *p*-nitrophenol (32MIC). Electron microscopic study revealed that AC51 destroyed fungal cells resulting in the leaking of cell components. Tetrangulol methyl ester was the main component isolated from the crude ethyl acetate extract of *Streptomyces* sp. AC51 along with other two compounds, 8-*O*-methyltetrangomycin and tetrangulol.