

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินบริเวณ
มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

Isolation and Selection of Bioactive Compound Producing Actinomycetes from Soil
at Thaksin University, Phatthalung Campus

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท ทุนอุดหนุนการวิจัยเงินรายได้ ประจำปี 2554 จำนวนเงิน
50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2554 ถึง 31 กรกฎาคม 2555

หน่วยงาน สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

รายนามคณะผู้วิจัย

- | | |
|---------------------------|------------------|
| 1) ผศ.ดร.นุกูล อินทรสังขา | ที่ปรึกษาโครงการ |
| 2) ดร.ชัยสิทธิ์ นิยะสม | หัวหน้าโครงการ |

สถานที่ทำงาน สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง 93110

โทรศัพท์/ โทรสาร 074-693992

ในการศึกษานี้เป็นการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณต่างๆ 6 จุด ใน
มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง โดยที่มีการบำบัดตัวอย่างดินก่อนด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่
การใช้สารละลายโซเดียมไดคิซิลซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์ สารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ
การอบตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
3 ชนิด คือ Starch Casien Agar, Oat Meal Aagr และ Humic Vitamin Agar ที่มีนิสตาตินและกรดนาลิดี
ซิกความเข้มข้น 50 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าจำนวนแอคติโนมัยซีทที่นับได้จาก
ตัวอย่างดินมีค่าอยู่ระหว่าง 1×10^4 - 2.2×10^5 CFU/กรัม และได้คัดเลือกแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินทั้ง
6 จุด จำนวน 90 ไอโซเลท เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็น clinical strains 6 สาย
พันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*,
Escherichia coli, Coagulase Negative Staphylococci และ *Klebsiella pneumoniae* และเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบที่เป็น laboratoy strains 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Klebsiella* sp. และยีสต์ 1 สายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยเทคนิค cross streak พบว่าแอคติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด มีจำนวน 61 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 67.8 จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของแอคติโนมัยซีท ด้วยวิธี dual culture พบว่า 66 ไอโซเลท จากทั้งหมด 75 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 88 ของแอคติโนมัยซีทที่เลือกมาทดสอบ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด จากเชื้อราทดสอบ 4 ชนิด คือ *Alternaria* sp., *Cervularia* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium* sp. ซึ่งแอคติโนมัยซีทที่แยกได้สามารถจัดกลุ่มตามสีของสปอร์ สีของเส้นใยอาหารและการสร้างสารสีบนอาหาร ISP2 ได้ทั้งหมด 12 กลุ่ม ไอโซเลททั้งหมดจะเก็บรักษาไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสเพื่อการศึกษาต่อไป

In this study, actinomycetes were isolated from soil samples collected from 6 different areas of Thaksin University, Phatthalung Campus. The soil samples were pre-treated 3 different methods including of SDS/YE, 1.5% phenol and 120 °C for 1 hr and then cultured on SCA, OMA and HVA containing 50 µg/ml of nystatin and 20 µg/ml of nalidixic acid. The total actinomycete counts were ranged from 1×10^4 to 2.2×10^5 CFU/CFU/g. Ninety actinomycete isolates were screened for antimicrobial activity against 6 clinical strains of bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichai coli*, Coagulase Negative Staphylococci and *Klebsiella pneumonia*), 5 laboratory strains of bacteria (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Klebsiella* sp.) and 1 laboratory strain of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by cross streak method. The results showed that 61 (67.8%) actinomycete isolates exhibited the growth inhibition at least 1 of 12 tested microorganisms. Moreover, 66 (88%) from 75 selected actinomycetes showed antifungal activity against at least 1 of 4 tested fungi including of *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Curvularia* sp. and *Colletotrichum gloeosporioides*. These actinomycete isolates could be classified into 12 groups based on morphological structure such as color of arial spores, color of substrate mycelium and pingment production on ISP2 agar. All isolates were selected and kept at -80 °C for further study.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีทุกคน ทั้งในด้านข้อเสนอแนะทางวิชาการ แรงงาน หรือการอำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือและสถานที่วิจัย ขอขอบขอบคุณนิติบัญญัติสาขาชีววิทยาทุกคนที่มีส่วนช่วยในการทำวิจัยชิ้นนี้ให้ประสบผลสำเร็จสุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับมหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ได้สนับสนุนงบประมาณวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ ประจำปี พ.ศ.2554

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบัญ	(4)
สารบัญตาราง	(6)
สารบัญภาพ	(7)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอกติโนมัยสีท และการกระจายตัวในธรรมชาติ	5
2. ความสามารถและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัยสีท	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	11
1. การเตรียมตัวอย่างดินเพื่อแยกเชื้อแอกติโนมัยสีท	11
2. วิธีการแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทจากดิน	11
3. การคัดกรองความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเบื้องต้น	12
4. การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช	15
5. การจำแนกชนิดของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้	16
บทที่ 4 ผลการศึกษา	18
1. การเก็บตัวอย่างดิน	18
2. การแยกและการตรวจนับเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากดิน	19
3. การคัดกรองความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเบื้องต้น	25
4. การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช	41
5. การจำแนกชนิดของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้	49

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ	57
1. สรุปผลการศึกษา	57
2. ข้อเสนอแนะ	61
บรรณานุกรม	62
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม	65
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการแยกแอกติโนมัยสัท	70

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ลักษณะดินตัวอย่างภายในมหาวิทยาลัยทักษิณวิทยาเขตพัทลุง	19
4.2 จำนวนแอกติโนมัยสีที่แยกได้จากดินในแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง	20
4.3 แอกติโนมัยสีที่แยกได้จากดินในแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง	21
4.4 ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยสีด้วยวิธี Cross streak method	26
4.5 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของแอกติโนมัยสีที่แยกได้จากดิน	32
4.6 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบของเชื้อแอกติโนมัยสี	34
4.7 น้ำหนักของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต	38
4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion method	39
4.9 ผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Agar well	40
4.10 ความสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช	44
4.11 การจัดกลุ่มเชื้อแอกติโนมัยสีที่แยกได้จากคุณสมบัติการสร้างสปีบนอาหาร ISP 2	50

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
2.1 ตัวอย่าง โคลนีนีของแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากดิน	6
3.1 ลักษณะการขีดเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในกาสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค	12
3.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี Dual culture	15
4.1 การเก็บตัวอย่างดินภายในมหาวิทยาลัยทักษิณวิทยาเขตพัทลุง	18
4.2 แอกติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SCA (ก) OMA (ข) และ HVA (ค)	20
4.3 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยสีท บนอาหารISP 2	24
4.4 ความสามารถในการการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ Clinical strains และ Lab strains	25
4.5 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ Clinical strains (ก) และ Lab strains (ข) ของ แอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ F 9-1	25
4.6 ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ <i>S. aureus</i>	31
4.7 เชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญของ (ก) <i>B. cereus</i> (ข) <i>E. coli</i> (ค) <i>P. aeruginosa</i> (ง) <i>S. aureus</i>	33
4.8 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของเชื้อแอกติโนมัยสีท ด้วยวิธี Agar plug	34
4.9 ความสามารถในการต้านเชื้อ <i>B. cereus</i> ของสารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลต IN2-11 P1-1 และ P1-10	38
4.10 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อ <i>B. cereus</i> ด้วยวิธี Agar well	39
4.11 MIC ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อ <i>B. cereus</i> ด้วยวิธี Broth micro dilution	41
4.12 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทดสอบ โดยใช้เกณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ ใช้ในการทดสอบมากกว่าร้อยละ 50	42
4.13 บริเวณการยับยั้งของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 5 วัน	43
4.14 ความสามารถของสารสกัดหยาบต่อการต้านเชื้อรา	48
4.15 การจัดกลุ่มเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากคุณสมบัติการสร้างสปีบนอาหาร ISP 2	50
4.16 ลักษณะเส้นใยและการจัดเรียงตัวของสปอร์แอกติโนมัยสีท	55
4.17 แถบ 16S rDNA ของตัวอย่างเชื้อ ไอโซเลตต่างๆ บน 1% agarose gel	56