

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ดินจัดเป็นแหล่งใหญ่ที่สุดที่พบแอคติโนมัยซีท โดยมีจำนวนประมาณ 10% ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในดิน (Janssen, 2006) ตัวอย่างดินบริเวณต่างๆ ภายในมหาวิทยาลัยทักษิณวิทยาเขตพัทลุง ถูกเก็บเพื่อใช้ในการวิจัยนี้ ทำการเก็บตัวอย่างดินแบบสุ่ม โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณต่างๆ ภายในมหาวิทยาลัยทักษิณวิทยาเขตพัทลุง จำนวน 6 จุด คือ ดินบริเวณตึกโดม ดินมีลักษณะเป็นดินร่วนสีดำ เนื้อดินละเอียด (ภาพที่ 1ก) ดินแปลงนาข้าวบริเวณตึกโดม ดินมีลักษณะเป็นดินเหนียวละเอียดสีเทา (ภาพที่ 1ข) ดินบริเวณป่าข้างตึกวิทยบริการ ดินมีลักษณะเป็นดินร่วนสีแดงเนื้อดินละเอียด (ภาพที่ 1ค) ดินบริเวณนาข้าวข้างหอพักอินทนิลดินมีลักษณะเป็นดินเหนียว สีเทา เปียก ซึ่งเป็นดินในนาข้าว (ภาพที่ 1ง) ดินบริเวณแปลงทดลองข้างตึกโดม ดินมีลักษณะเป็นดินเหนียว มีสีดำ มีเศษพืชปะปนอยู่ (ภาพที่ 1จ) ดินบริเวณฟาร์มโคนม ลักษณะของดินที่เก็บมีลักษณะเป็นดินร่วน สีดำ (ภาพที่ 1ฉ) โดยดินทั้ง 6 จุด มีสภาพเป็นกรดเล็กน้อยโดยมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.87–6.72 ดังแสดงในตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 การเก็บตัวอย่างดินภายในมหาวิทยาลัยทักษิณวิทยาเขตพัทลุง

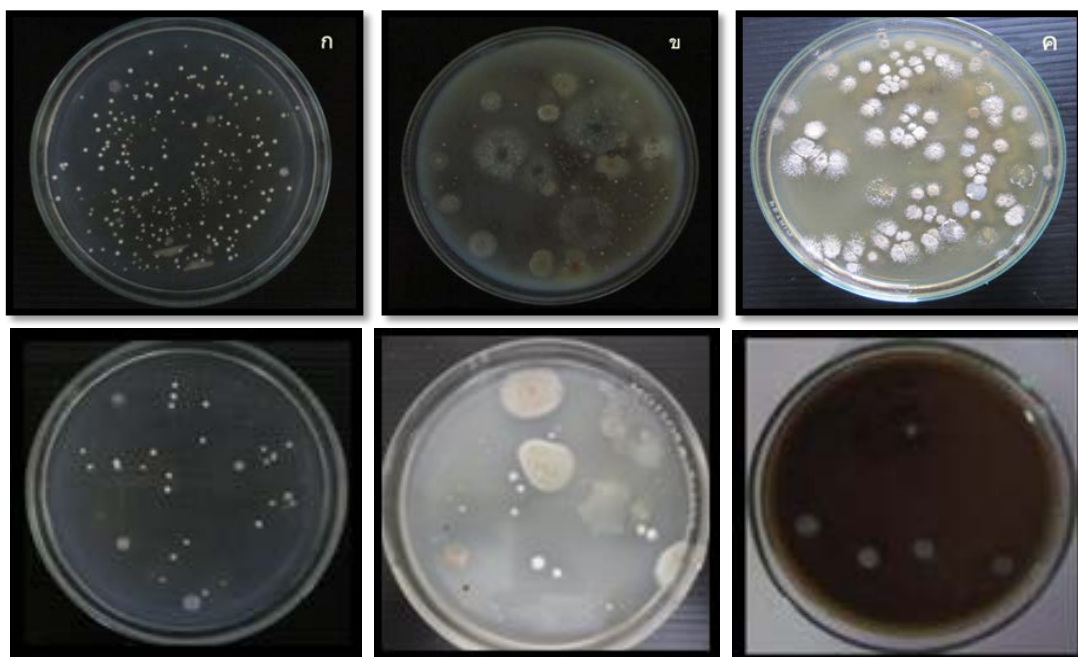
ตารางที่ 4.1 ลักษณะดินตัวอย่างภายในมหาวิทยาลัยทักษิณวิทยาเขตพัทลุง

จุดที่	บริเวณเก็บตัวอย่าง	ลักษณะดินตัวอย่าง	pH
1	ดินบริเวณตึกโดม (D)	ดินร่วน สีดำเนื้อดินละเอียด	6.24
2	ดินแปลงนาข้าวบริเวณตึกโดม (R)	ดินเหนียวเนื้อดินละเอียด	5.87
3	ดินบริเวณป่าข้างตึกวิทยบริการ (W)	ดินร่วนสีแดงเนื้อดินละเอียด	6.35
4	ดินบริเวณนาข้าวข้างหอพักอินทนิล(I)	ดินเหนียว สีเทา เปียก	6.18
5	ดินบริเวณแปลงทดลองข้างตึกโดม (P)	ดินเหนียว สีดำ ชื้น	6.35
6	ดินบริเวณฟาร์มโคนม(F)	ดินร่วน สีดำ ชื้น	6.72

4.2 การแยกและการตรวจนับเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดิน

ในการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง จำนวน 6 จุด โดยนำตัวอย่างดินมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เพื่อลดจำนวนแบคทีเรียและเชื้อราที่ไม่ต้องการบางส่วนออกไป จากนั้นทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินที่เตรียมด้วยวิธีการต่างๆ 3 วิธี คือ การเจือจางตัวอย่างด้วย yeast extract เข้มข้น 6% และ SDS เข้มข้น 0.05%, การเจือจางตัวอย่างด้วย phenol ความเข้มข้น 1.5% และการอบตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 120 °C นาน 1 ชั่วโมง นำมาแยกเชื้อโดยวิธี serial dilution spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ SCA, OMA และ HVA ที่มี nystatin ความเข้มข้น 50 µg/ml และ nalidixic acid 20 µg/ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-14 วัน (ภาพที่ 4.2) จากการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณฟาร์มโคนมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิธีการแยกเชื้อที่แตกต่างกัน ผลการทดลองพบแอคติโนมัยสีทปริมาณแตกต่างกันตามชนิดของอาหารและวิธีการแยก โดยพบว่าการเจือจางตัวอย่างด้วย yeast extract เข้มข้น 6% และ SDS เข้มข้น 0.05% บนอาหาร SCA OMA และ HVA สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ 2.2×10^5 , 3.2×10^4 และ 2.0×10^4 CFU/กรัม ตามลำดับ การเจือจางตัวอย่างด้วย phenol ความเข้มข้น 1.5% บนอาหาร SCA OMA และ HVA สามารถแยกได้ 6.3×10^2 2.9×10^2 และ 2.6×10^2 CFU/กรัม ตามลำดับ และการอบตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 120 °C นาน 1 ชั่วโมง บนอาหาร SCA OMA และ HVA สามารถแยกได้ 1.3×10^2 8.0×10^2 และ 2.0×10^2 CFU/กรัม ตามลำดับ ส่วนการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณป่าข้างตึกวิทยบริการพบว่า การเจือจางตัวอย่างด้วย yeast extract เข้มข้น 6% และ SDS เข้มข้น 0.05% บนอาหาร SCA OMA และ HVA สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ 8.0×10^4 1.0×10^4 และ 2.6×10^4 CFU/กรัม การเจือจางตัวอย่างด้วย phenol ความเข้มข้น 1.5% บนอาหาร SCA OMA และ HVA สามารถแยกได้ 9.2×10^2 6.2×10^2 และ 3.0×10^2 CFU/กรัม ตามลำดับ และการอบตัวอย่างดินที่

อุณหภูมิ 120 °C นาน 1 ชั่วโมง บนอาหาร SCA OMA และ HVA สามารถแยกได้ 2.1×10^2 3.0×10^1 และ 4.0×10^1 CFU/กรัม ตามลำดับ



ภาพที่ 4.2 แอคติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SCA (ก) OMA (ข) และ HVA (ค) บ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.2 จำนวนแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินในแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง

อาหาร เลี้ยงเชื้อ	ดินบริเวณฟาร์มโคนม			ดินป่าข้างอาคารวิทยบริการ		
	SDS/YE	Phenol	120 °C	SDS/YE	Phenol	120 °C
SCA	2.2×10^5	6.3×10^2	1.3×10^2	8.0×10^4	9.2×10^2	2.1×10^2
OMA	3.2×10^4	2.9×10^2	8.0×10^2	1.0×10^4	6.2×10^2	3.0×10^1
HVA	2.0×10^4	2.6×10^2	2.0×10^2	2.6×10^4	3.0×10^2	4.0×10^1

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร 3 ชนิด พบว่าแอคติโนมัยสีทในตัวอย่างดินมีปริมาณที่แตกต่างกันตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการแยก โดยการเจือจางตัวอย่างดินทั้ง 6 จุด (ดินบริเวณนาข้าวข้างหอพักอินทนิล แปลงทดลองข้างตึกโดม ฟาร์มโคนม ดินบริเวณตึกโดม ดินแปลงนาข้าวบริเวณตึกโดม และดินบริเวณป่าข้างตึกวิทยบริการ) ด้วย yeast extract เข้มข้น 6% และ SDS เข้มข้น 0.05% เป็นวิธีที่สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ซึ่ง SDS จะช่วยในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในตัวอย่างดินและช่วยในการกระตุ้นการออกของสปอร์ของแอคติโนมัยสีท ส่วนการ pre-treat ดินด้วยฟีนอลและการอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อต้องการแยกเชื้อในกลุ่ม rare actinomycetes และพบว่าเชื้อในกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่มีการเจริญช้ามาก บางสายพันธุ์ตายระหว่างที่มีการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) เชื้อส่วนใหญ่จึงไม่ได้คัดเลือกไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ จากการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างดินพบว่าเชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ โคโลนิมีลักษณะเป็นปุย ฟู มีสีขาว (ภาพที่ 4.2) และพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินคืออาหาร SCA และ HVA หลังจากนั้นคัดเลือกแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณนาข้าวข้างหอพักอินทนิล 25 ไอโซเลท แปลงทดลองข้างตึกโดม 18 ไอโซเลท ฟาร์มโคนม 7 ไอโซเลท ดินบริเวณตึกโดม 31 ไอโซเลท ดินแปลงนาข้าวบริเวณตึกโดม 4 ไอโซเลท และดินบริเวณป่าข้างตึกวิทยบริการ 5 ไอโซเลท รวมทั้งสิ้น 90 ไอโซเลท เพื่อการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี cross streak ต่อไป (ภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินในแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง

บริเวณเก็บตัวอย่าง		รหัส ตัวอย่างดิน	จำนวนไอโซเลท ที่เลือก	รหัสเชื้อ	รวม (ไอโซเลท)
อินทนิล (IN)					
HV	SDS+YE	IN 1	10	IN1-1 ถึง IN1-10	
	1.5% Phenol	IN 2	14	IN2-1 ถึง IN2-14	
	120 °C 1 hr.	IN 3	1	IN3-1	
SCA	SDS+YE	IN 4	-	-	
	1.5% Phenol	IN 5	-	-	
	120 °C 1 hr.	IN 6	-	-	

ตารางที่ 4.3 แอคติโนไมด์ที่แยกได้จากดินในแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง (ต่อ)

บริเวณเก็บตัวอย่าง		รหัส ตัวอย่างดิน	จำนวนไอโซเลท ที่เลือก		รหัสเชื้อ	รวม (ไอโซเลท)
อินทนิล (IN)						
OMA	SDS+YE	IN 7	-	-		
	1.5% Phenol	IN 8	-	-		
	120 °C 1 hr.	IN 9	-	-		25
แปลงทดลอง (P)						
HV	SDS+YE	P1	15		P1-1 ถึง P1-15	
	1.5% Phenol	P2	2		P2-1 ถึง P2-2	
	120 °C 1 hr.	P3	1		P3-1	
SCA	SDS+YE	P4	-	-		
	1.5% Phenol	P5	-	-		
	120 °C 1 hr.	P6	-	-		
OMA	SDS+YE	P 7	-	-		
	1.5% Phenol	P 8	-	-		
	120 °C 1 hr.	P 9	-	-		18
ฟาร์มโคนม (F)						
HV	SDS+YE	F 1	4		F 1-1 ถึง F 1-4	
	1.5% Phenol	F 2	1		F 2-1	
	120 °C 1 hr.	F 3	-	-		
SCA	SDS+YE	F 4	-	-		
	1.5% Phenol	F 5	1		F 5-1	
	120 °C 1 hr.	F 6	-	-		
OMA	SDS+YE	F 7	-	-		
	1.5% Phenol	F 8	-	-		
	120 °C 1 hr.	F 9	1		F 9-1	7
ดินบริเวณตึกโดม (D)						
HV	SDS+YE	D 1	18		D 1-1 ถึง D 1-18	

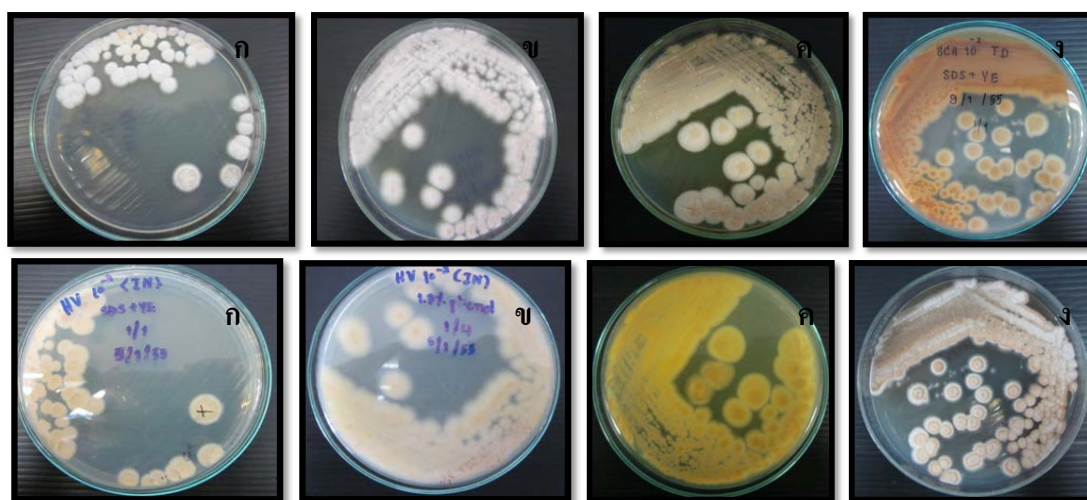
ตารางที่ 4.3 แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินในแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง (ต่อ)

บริเวณเก็บตัวอย่าง		รหัส ตัวอย่างดิน	จำนวนไอโซเลท ที่เลือก	รหัสเชื้อ	รวม (ไอโซเลท)
HV	1.5% Phenol	D 2	1	D 2-1	
	120 °C 1 hr.	D 3	4	D 3-1 ถึง D 3-4	
SCA	SDS+YE	D 4	5	D 4-1 ถึง D 4-5	
	1.5% Phenol	D 5	-	-	
	120 °C 1 hr.	D 6	-	-	
	Not treat	D 7	1	D 7-1	
OMA	SDS+YE	D 8	1	D 8-1	
	1.5% Phenol	D 9	1	D 9-1	
	120 °C 1 hr.	D 10	-	-	31
ดินบริเวณป่าข้างตึก					
วิทยบริการ (W)					
HV	SDS+YE	W 1	1	W 1-1	
	1.5% Phenol	W 2	2	W 2-1 ถึง W 2-2	
	120 °C 1 hr.	W 3	-	-	
SCA	SDS+YE	W 4	-	-	
	1.5% Phenol	W 5	-	-	
	120 °C 1 hr.	W 6	-	-	
OMA	SDS+YE	W 7	1	W 7-1	
	1.5% Phenol	W 8	1	W 8-1	
	120 °C 1 hr.	W 9	-	-	5
ดินแปลงนาข้าวบริเวณตึก					
โดม (R)					
HV	SDS+YE	R 1	-	-	
	1.5% Phenol	R 2	-	-	
	120 °C 1 hr.	R 3	-	-	
SCA	SDS+YE	R 4	1	R 4-1	

ตารางที่ 4.3 แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินในแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง (ต่อ)

บริเวณเก็บตัวอย่าง	รหัส ตัวอย่างดิน	จำนวนไอโซเลท ที่เลือก	รหัสเชื้อ	รวม (ไอโซเลท)
ดินแปลงนาข้าวบริเวณตึก				
โดม (R)				
SCA	1.5% Phenol	R 5	-	-
	120 °C 1 hr.	R 6	-	-
	Not treat	R 7	2	R 7-1 ถึง R 7-2
OMA	SDS+YE	R 8	1	R 8-1
	1.5% Phenol	R 9	-	-
	120 °C 1 hr.	R 10	-	-
				4

หมายเหตุ: (-) หมายถึง ไม่เลือกมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

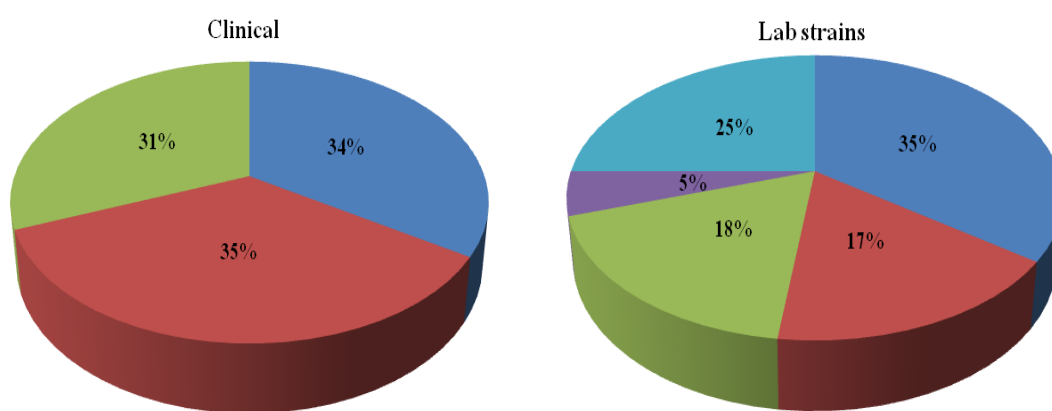


ภาพที่ 4.3 ลักษณะการเจริญของแอคติโนมัยสีท บนอาหารISP2 (ก) ไอโซเลท IN 1-1 สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมน้ำตาล เส้นใยอาหารสีกريمة และไม่สร้างสารสี (ข) ไอโซเลท IN 2-4 สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมชมพู เส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน และไม่สร้างสารสี (ค) ไอโซเลท F 9-1 สร้างเส้นใยอากาศสีเทาอมน้ำตาล เส้นใยอาหารสีเหลือง และสร้างสารสีเหลือง (ง) ไอโซเลท D 1-4 สร้างเส้นใยอากาศสีส้ม เส้นใยอาหารสีขาวอมส้ม และสร้างสารสีน้ำตาลอ่อน

4.3 การคัดกรองความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเบื้องต้น

4.3.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Cross streak

นำเชื้อแอคติโนมัยซีตที่แยกได้ 90 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะด้วยวิธี Cross streak method โดยการทำซ้ำกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เป็น clinical strain 6 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa* *S. aureus* *A. baumannii* *E. coli* CoNS และ *K. pneumoniae* และเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เป็น lab strain 5 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa* *S. aureus* *Salmonella* sp. *B. cereus* *Klebsiella* sp. และ ยีสต์ 1 ชนิด ได้แก่ *S. cerevisiae*



ภาพที่ 4.4 แสดงความสามารถในการการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ Clinical strains และ Lab strains

■ แกรมบวก ■ แกรมลบ ■ ไม่ยับยั้ง ■ ยีสต์ ■ ไม่ได้ทดสอบ



ภาพที่ 4.5 แสดงการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ Clinical strains (ก) และ Lab strains (ข) ของแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ F 9-1

จากการทดสอบพบว่าแอคติโนมัยสีทจำนวน 61 ไอโซเลทสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ คิดเป็น 67.8% ของปริมาณเชื้อที่เลือกมาทดสอบ โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เป็น clinical strains โดยแยกเป็นแกรมบวก 24 ไอโซเลท (34%) ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 25 ไอโซเลท (35%) และไม่ยับยั้ง 22 ไอโซเลท (31%) และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เป็น lab strains ที่เป็นเชื้อแกรมบวก 12 ไอโซเลท (35%) ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 10 ไอโซเลท (17%) ยับยั้งยีสต์ 3 ไอโซเลท (5%) ไม่ยับยั้ง 11 ไอโซเลท (18%) ดังภาพที่ 4.4-4.5 และตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอคติโนมัยสีทด้วยวิธี Cross streak method

สายพันธุ์ แอคติโนมัยสีท	ระดับการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ											
	Clinical strains						Lab strains					
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. coli</i>	CoNS	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Klebsiella</i> sp.
IN 1-2	-	+++	-	-	+++	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IN 1-5	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
IN 1-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
IN 1-7	-	+++	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IN 1-9	+++	+++	+++	+++	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IN 1-10	-	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IN 2-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
IN 2-17	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++	-
IN 2- 21	-	-	-	-	-	+++	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IN 2-22	-	-	-	+++	+++	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IN 2-23	-	+++	+	+	++	-	-	-	-	+++	-	+++
IN 2-24	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
IN 3-25	-	+	++	+++	+++	-	-	+++	-	-	+++	-

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอคติโนมัยสีทด้วยวิธี Cross streak method (ต่อ)

สายพันธุ์ แอคติโนมัยสีท	ระดับการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ											
	Clinical strains						Lab strains					
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. coli</i>	CoNS	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Klebsiella</i> sp.
D 4-5	-	-	-	-	+++	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D 1-9	+++	+++	+++	+++	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D 1-10	-	+++	++	+	+++	-	-	+++	++	+++	+++	++
D 1-11	-	+++	+++	+++	+++	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D 1-12	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-
D 1-13	-	+++	++	+	++	-	-	++	++	-	+++	-
D 1-14	-	+++	++	+	++	-	-	++	-	-	+++	-
D 1-15	-	+++	-	++	++	-	-	+++	-	-	+++	-
D 1-16	-	+++	+	+	++	-	-	+++	++	-	+++	-
D 1-17	-	+++	+	-	+	-	-	+++	+	-	+++	-
D 1-18	-	+++	-	-	-	-	-	+++	+	-	+++	-
D 1-19	-	+++	+	+	++	-	-	+++	++	-	+++	-
D 1-20	-	+++	+	++	+++	-	-	+++	±	-	+++	-
D 1-21	-	+++	++	+	+++	+	-	+++	-	-	+++	++
D 1-22	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D 1-24	-	+++	+++	+++	+++	+++	±	++	+++	++	+++	+++
D 1-26	-	+++	+++	+++	+++	+++	±	+++	+++	++	+++	+++
D 2-27	+	+++	++	++	+++	-	++	+++	+++	-	+++	-
D 3-28	-	+++	-	+	++	-	-	+++	-	-	+++	-
D 3-29	-	+++	+++	++	+++	-	-	+++	±	-	+++	-
D 3-30	-	+++	++	±	+++	-	±	++	±	±	+++	-

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอคติโนมัยสีทด้วยวิธี Cross streak method (ต่อ)

สายพันธุ์ แอคติโนมัยสีท	ระดับการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ											
	Clinical strains						Lab strains					
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>E. coli</i>	CoNS	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Klebsiella</i> sp.
D 3-31	-	+++	-	+	-	-	-	+++	-	-	+++	-
R 7-33	-	-	-	-	+++	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
W 8-37	-	+++	-	-	+	-	-	+++	-	-	+++	-
W 1-38	-	+++	++	±	+++	-	-	+++	±	-	+++	-
W 2-39	+	±	-	-	++	-	-	-	±	-	±	-
W 2-40	±	+++	-	-	-	-	-	+++	-	±	++	-

หมายเหตุ	+++	หมายถึง บริเวณยับยั้งมากกว่า 15 มม.
	++	หมายถึง บริเวณยับยั้ง 7-15 มม.
	+	หมายถึง บริเวณยับยั้ง 1-7 มม.
	-	หมายถึง ไม่ยับยั้ง
	ND	หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ
	±	หมายถึง ผลไม่ชัดเจนอาจจะมีฤทธิ์หรือไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

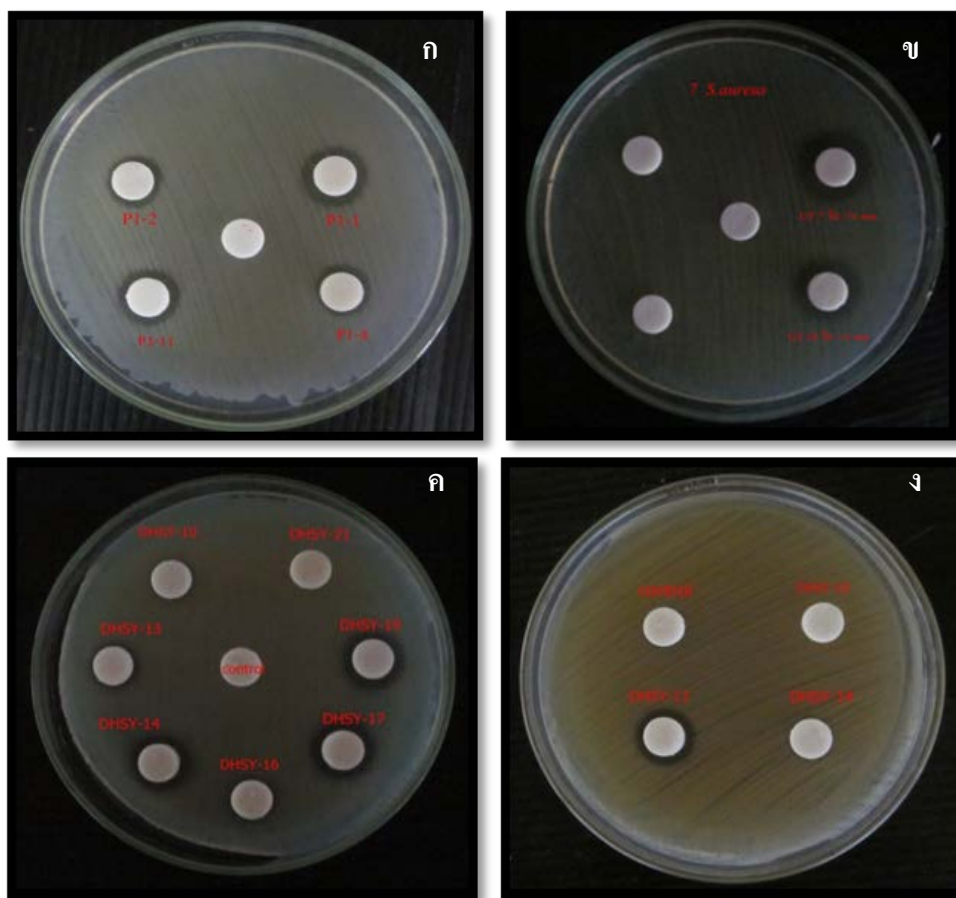
เมื่อนำแอคติโนมัยสีทที่ได้คัดเลือกทั้งหมด 90 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบมาแบ่งกลุ่มตามระดับการยับยั้ง ออกเป็น 3 ระดับ คือระดับสูง (+++) ให้ค่าการยับยั้งมากกว่า 15 มม. ระดับ กลาง (++) ให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 7-15 มม. และระดับต่ำ (+) ให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 1-7 มม. พบว่า แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่มีค่าการยับยั้ง *S. aureus* และ *B. cereus* ในระดับสูง และมีค่ายับยั้ง CoNS ในระดับปานกลาง และ *E. coli* ส่วนใหญ่อยู่ในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.4) โดยแอคติโนมัยสีทที่แยกได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. cereus*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kumar และคณะ (2010) ซึ่งทำ

การคัดแยกแอกติโนมัยสีท 117 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากดินในสวนและพื้นที่ชุ่มน้ำของประเทศอินเดีย พบว่า 6 ไอโซเลทสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Boudjella และคณะ (2006) รายงานว่า แอกติโนมัยสีทที่แยกจากตัวอย่างดินในประเทศแอลจีเรียมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดได้ดี คือ *B. subtilis* และ *Micrococcus luteus*

แอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากความแตกต่างทางองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม และกลไกการออกฤทธิ์ของสารเมแทบอลิท์ที่แอกติโนมัยสีทสร้าง พบว่าสารที่สร้างโดยแอกติโนมัยสีทและมีกลไกการออกฤทธิ์ไปยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์นั้น ส่วนใหญ่มักไปมีผลต่อการสร้างเปปติโดไกลแคน เช่น ไม่ให้มีการสังเคราะห์สารตั้งต้นของเปปติโดไกลแคน ยับยั้งขั้นตอน trans peptidation เป็นต้น โดยชั้นของเปปติโดไกลแคนดังกล่าวเป็นโครงสร้างส่วนใหญ่ที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นของเปปติโดไกลแคนที่บางกว่าและมีผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ที่เป็น lipopolysaccharide (รัชนี มิ่งมา, 2552)

4.3.1.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด ด้วยวิธี paper disc diffusion

ทำการคัดเลือก 10 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี cross streak มาทำการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ โดยมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2 ชนิด คือ Bennett's broth และ YM broth ที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี paper disc diffusion บนอาหาร MHA (ภาพที่ 4.6) โดยทดสอบกับเชื้อที่มีฤทธิ์จากวิธี cross streak พบว่าแอกติโนมัยสีทที่สามารถให้ผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *S. aureus* เพียงชนิดเดียว โดยยับยั้ง *S. aureus* ที่เป็น clinical strains จำนวน 12 ไอโซเลท คือ P 1-1 P 1-2 P 1-4 P 1-10 และ P 1-11 ทำให้เกิดวงใสขนาด 15 มม. 12 มม. 12 มม. 11 มม. และ 14 มม. ตามลำดับ และให้ผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *S. aureus* ที่เป็น lab strains จำนวน 5 ไอโซเลท คือ P 1-1 P 1-2 และ P 1-11 เกิดวงใสขนาด 15 มม. 13 มม. และ 12 มม. ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5 และ ภาพที่ 4.6)



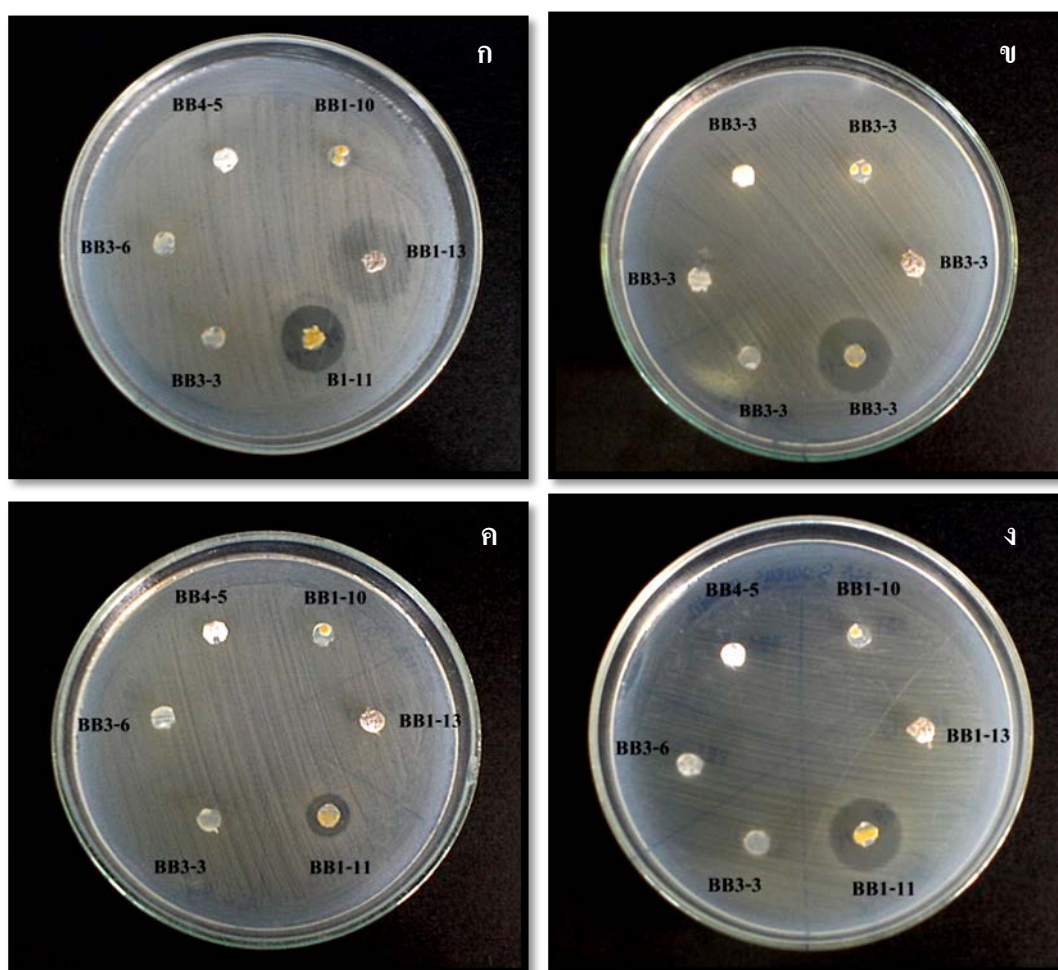
ภาพที่ 4.6 ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ *S. aureus* ของ (ก) ไอโซเลต P 1-1 P 1-2 P 1-4 และ P 1-11 (ข) ไอโซเลต P 1-10 (ค) ไอโซเลต D 1-10 D 1-13 D 1-14 D 1-16 D 1-17 D 1-19 และ D 1-21 (clinical strains) (ง) ไอโซเลต D 1-10 D 1-13 D 1-14 (lab strains)

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของแอคติโนมัยซีที่แยกได้จากดิน

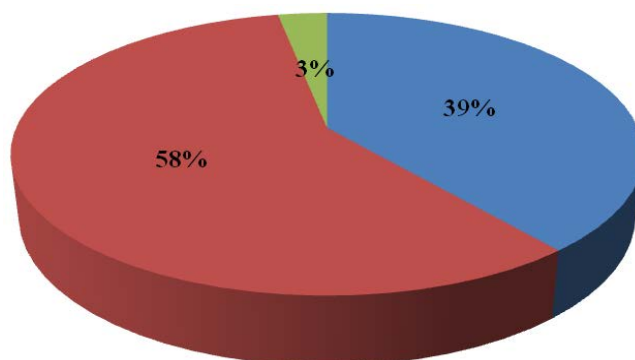
ไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มม.)			
	<i>S. aureus</i>			
	Bennet's broth		GY broth	
	Clinical strains	Lab strains	Clinical strains	Lab strains
IN 1-2	0	0	0	0
IN 1-7	0	0	0	0
IN 2-11	0	0	0	0
IN 2-12	0	0	0	0
P 1-1	0	0	15	15
P 1-2	0	0	12	13
P 1-4	0	0	12	0
P 1-10	0	0	11	0
P 1-11	0	0	14	12
P 1-15	0	0	0	0
D 4-2	0	0	0	0
D 1-10	0	0	10.5	13
D 1-13	0	0	11	10.5
D 1-14	0	0	12	0
D 1-16	0	0	10.5	0
D 1-17	0	0	14	0
D 1-19	0	0	13.5	0
D 1-21	0	0	0	0
D 2-27	0	0	17	0

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar plug

การทดสอบเชื้อแอคติโนมัยสีทต่อแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* จากการทดลองพบว่า จากแอคติโนมัยสีทที่เลือกมาทั้งหมดจำนวน 67 ไอโซเลท มีเพียง 2 ไอโซเลท (3%) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิด 39 ไอโซเลท (58%) มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *B. cereus* เพียงชนิดเดียว และจำนวน 26 ไอโซเลท (39%) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 4 ชนิด ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.7-4.8



ภาพที่ 4.7 เชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญของ (ก) *B. cereus* (ข) *E. coli*
(ค) *P. aeruginosa* (ง) *S. aureus*



ภาพที่ 4.8 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของเชื้อแอคติโนไมซีต ด้วยวิธี Agar plug

■ ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ■ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* เพียงอย่างเดียว ■ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli*

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบของเชื้อแอคติโนไมซีต

ไอโซเลต	การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
IN1-2	++	-	-	-
IN1-3	++	-	-	-
IN1-4	++	-	-	-
IN1-5	++	-	-	-
IN1-7	++	-	-	-
IN2-2	++	-	-	-
IN2-4	++	-	-	-
IN2-5	++	-	-	-
IN2-8	++	-	-	-
IN2-10	++	-	-	-
IN2-11	++	-	-	-

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยสีท (ต่อ)

ไอโซเลต	การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
IN2-12	-	-	-	-
IN2-14	++	-	-	-
P1-1	++	-	-	-
P1-2	++	-	-	-
P1-3	++	-	-	-
P1-6	-	-	-	-
P1-9	++	-	-	-
P1-10	++	-	-	-
P1-11	++	-	-	-
P1-12	-	-	-	-
P2-2	-	-	-	-
P3-1	-	-	-	-
F1-3	-	-	-	-
F2-2	+	-	-	-
A-8	++	-	-	-
A-10	-	-	-	-
BB1-7	++	-	-	-
BB1-9	-	-	-	-
BB1-10	-	-	-	-
BB1-11	++	+++	++	+++
BB1-13	+++	-	-	-
BB1-14	++	-	-	-

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยสีท (ต่อ)

ไอโซเลต	การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
BB2-1	-	-	-	-
BB2-2	-	-	-	-
BB2-3	-	-	-	-
BB2-4	-	-	-	-
BB2-5	-	-	-	-
BB2-6	-	-	-	-
BB2-7	-	-	-	-
BB2-8	-	-	-	-
BB2-9	-	-	-	-
BB3-3	-	-	-	-
BB3-6	-	-	-	-
BB4-5	-	-	-	-
VS1-1	++	-	-	-
VS1-2	-	-	-	-
VS1-3	-	-	-	-
VS1-4	++	-	-	-
VS1-5	+	-	-	-
VS1-6	-	-	-	-
VS1-7	++	-	-	-
VS1-8	++	-	-	-
VS1-9	-	-	-	-
VS1-10	++	-	-	-

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยสิท (ต่อ)

ไอโซเลต	การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
VS1-12	-	-	-	-
VS1-14	++	-	-	-
VS1-15	++	-	-	-
VS1-16	++	-	-	-
VS2-1	++	-	-	-
VS2-9	++	-	-	-
VS2-10	++	-	-	-
VS2-11	++	-	-	-
VS2-14	+	-	-	-
VS2-18	++	-	-	-
8/5	+++	++	++	++

หมายเหตุ: +++ หมายถึง บริเวณยับยั้งมากกว่า 15 มิลลิเมตร
 ++ หมายถึง บริเวณยับยั้ง 7-15 มิลลิเมตร
 + หมายถึง บริเวณยับยั้ง 1-7 มิลลิเมตร
 - หมายถึง ไม่ยับยั้ง

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยของไอโซเลต IN2-11 P1-1 P1-2 P1-10 และ 8/5 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบและเชื้อราทดสอบ ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต แล้วทำการระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) จนตัวทำละลายแห้ง นำขวดที่มีสารสกัดบรรจุอยู่ไปชั่งน้ำหนัก จะทำให้ทราบน้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากแต่ละไอโซเลต ซึ่งมีค่าดังตารางที่ 4.7 เพื่อจะนำไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขยายต่อไป

ตารางที่ 4.7 น้ำหนักของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต

ไอโซเลขที่ทำการสกัดสาร	น้ำหนักของสารสกัดหยาบ (มิลลิกรัม)
IN2-11	3.3
P1-1	5.4
P1-2	43.3
P1-10	0.2
8/5	5.4

4.3.2.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี Disc diffusion method

จากการนำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ของเชื้อแอคติโนมัยสีทมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ด้วยวิธี Disc diffusion method และทำการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส เพื่อทดสอบสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* เพียงชนิดเดียว โดยขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเป็นไปตามตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.9



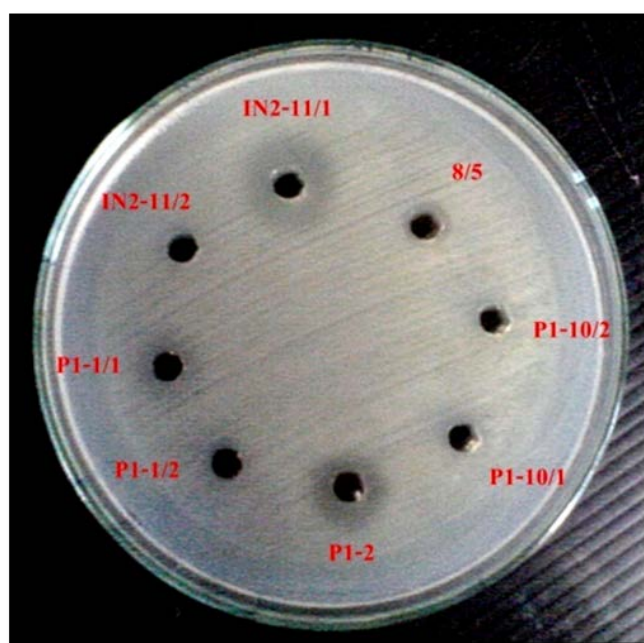
ภาพที่ 4.9 ความสามารถในการต้านเชื้อ *B. cereus* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลต IN2-11 P1-1 และ P1-10

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion method

ไอโซเลท	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มม.)			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
IN2-11	12.3	0	0	0
P1-1	15.5	0	0	0
P1-2	17.5	0	0	0
P1-10	10.6	0	0	0
8/5	0	0	0	0

4.3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี Agar well

จากการนำสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากไอโซเลทเชื้อแอคติโนมัยสีทมาทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ด้วยวิธี Agar well พบว่าสารสกัดหยาบของไอโซเลท IN2-11 P1-1 P1-2 8/5 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้เพียงชนิดเดียว โดยขนาดของวงใสที่สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ดังตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Agar well

ตารางที่ 4.9 ผลของการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยวิธี Agar well

ไอโซเลท	ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มม.)			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
IN2-11/1	14.8	0	0	0
IN2-11/2	0	0	0	0
P1-1/1	8.4	0	0	0
P1-1/2	0	0	0	0
P1-2	11.7	0	0	0
P1-10/1	0	0	0	0
P1-10/2	0	0	0	0
8/5	7.1	0	0	0

4.3.3 การหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี Broth micro dilution

จากการนำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตของเชื้อแอคติโนมัยซีท มาหาค่า MIC ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Broth micro dilution พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากไอโซเลท P1-1/1 P1-2/ และ 8/5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* เป็น 1:4 ของสารสกัด ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4.11

ระดับความเจือจาง 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1:512 1:1024 1:2048 C



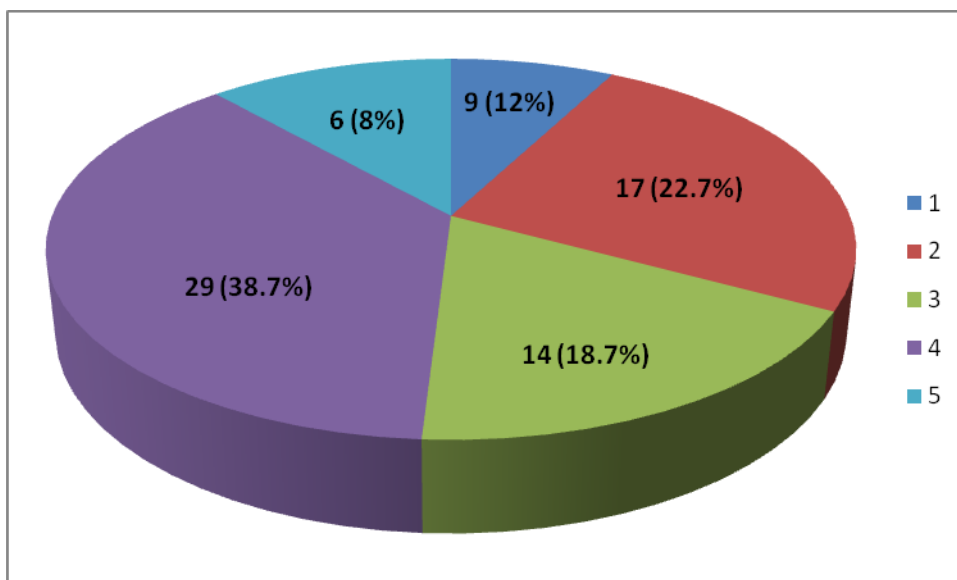
ภาพที่ 4.11 MIC ของสารสกัดหยาดต่อเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Broth micro dilution โดยเจือจางสารสกัดในอาหาร MHB ใน microtiter plate (96 well plates) C = Control A = สารสกัดของไอโซเลท IN2-11/1 B = สารสกัดของไอโซเลท IN2-11/2 C = สารสกัดของไอโซเลท P1-1/1 D = สารสกัดของไอโซเลท P1-1/2 E = สารสกัดของ ไอโซเลท P1-2 F = สารสกัดของไอโซเลท P1-10/1 G = สารสกัดของไอโซเลท P1-10/2 H = สารสกัดของไอโซเลท 8/5

4.4 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช

4.4.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารต่อต้านเชื้อรา โดยวิธี Dual culture

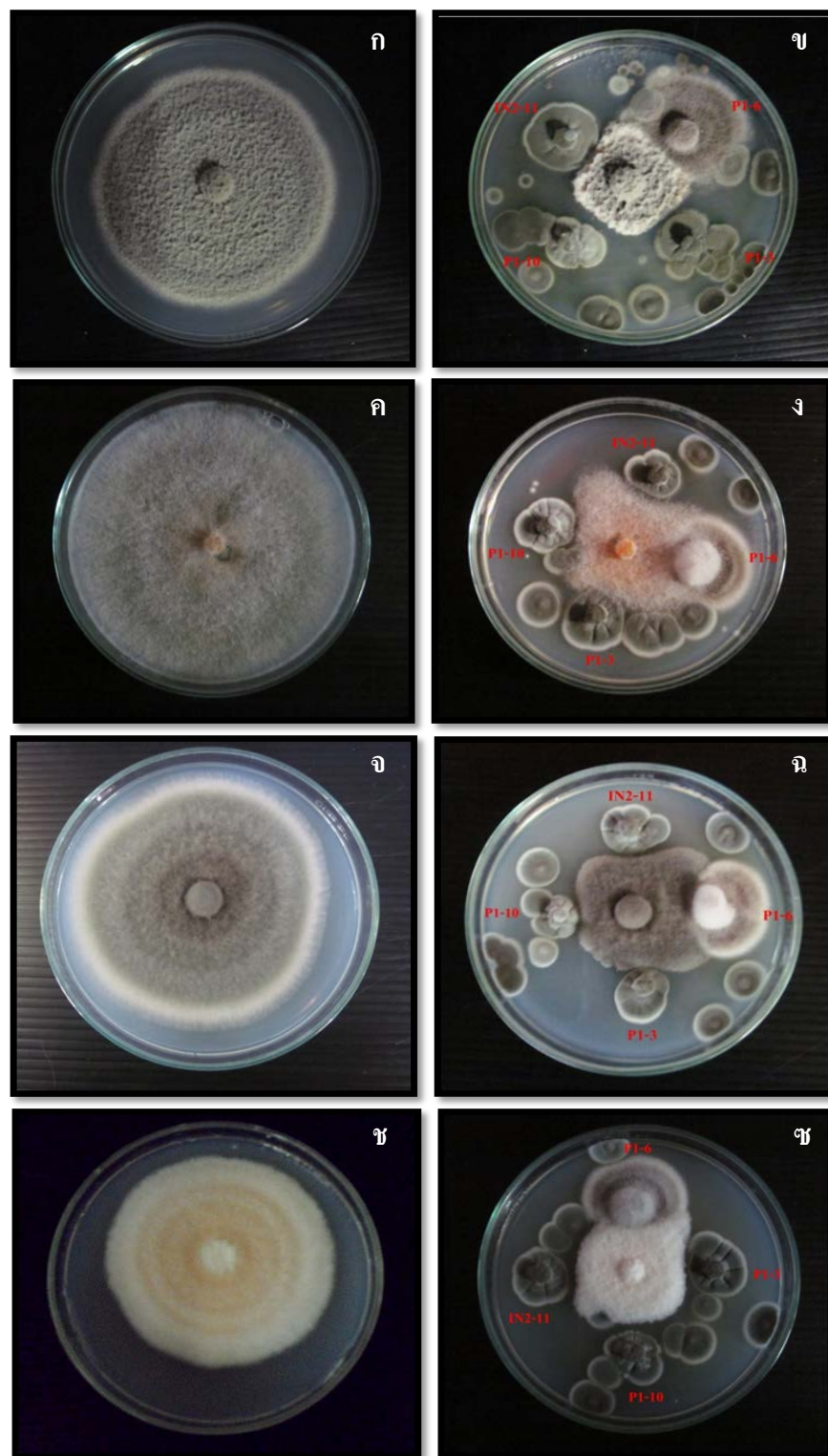
จากการนำแอคติโนมัยสีทจำนวน 75 ไอโซเลทมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ทำการเจาะขึ้นรู้น และใช้ปากกิบ คีบมาวางบนอาหาร PDA โดยวางเชื้อราทดสอบไว้ตรงกลาง และวางเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยวางเชื้อแอคติโนมัยสีทห่างจากเชื้อราทดสอบเป็นระยะ 2.5 เซนติเมตร พบว่าการยับยั้งเชื้อราทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยเปรียบเทียบค่าการยับยั้งกับชุดควบคุม (ตารางที่ 4.10) โดยใช้เกณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้มากกว่าร้อยละ 50 พบว่า มีจำนวน 6 ไอโซเลท (8%) ของแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบทั้ง 4 ชนิด 17 ไอโซเลท (22.7%) สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ 3 ชนิด 14 ไอโซเลท (18.7%) สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ 2 ชนิด 29 ไอโซเลท (38.7%) สามารถยับยั้งเชื้อรา

ทดสอบได้ 1 ชนิด และ 9 ไอโซเลท (12%) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ ดังภาพที่ 4.12 และ 4.13 และ ตารางที่ 4.10)



ภาพที่ 4.12 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราทดสอบ โดยใช้เกณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบมากกว่าร้อยละ 50

- 1 - สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบทั้ง 4 ชนิด
- 2 - สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ 3 ชนิด
- 3 - สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ 2 ชนิด
- 4 - สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ 1 ชนิด
- 5 - ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ



ภาพที่ 4.13 บริเวณการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 5 วัน
 ต่อเชื้อ *Alternaria* sp. (ก ข) *Cervularia* sp. (ค ง) *C. gloeosporioides* (จ ฉ) *Fusarium* sp.
 (ซ ซ) (ซ้าย : ชุดควบคุม และขวา : การทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยซีท)

ตารางที่ 4.10 ความสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช

ไอโซเลท	เชื้อรา							
	<i>Fusarium</i>		<i>Alternaria</i>		<i>Cervularia</i>		<i>Colletotrichum</i>	
	Control/ ค่ายับยั้ง	ยับยั้ง (%)	Control/ ค่ายับยั้ง	ยับยั้ง (%)	Control/ ค่ายับยั้ง	ยับยั้ง (%)	Control/ ค่ายับยั้ง	ยับยั้ง (%)
IN2-11	36.4:20.4	43.95	25.1:12.6	25.10	40.8:17.2	57.84	45.1:22.7	49.67
IN3-1	-	-	-	-	39.1:9.2	79.28	-	-
P1-1	36.4:11.2	69.23	25.1:10.6	57.77	-	-	45.1:13.4	70.29
P1-2	36.4:12.5	65.65	-	-	-	-	45.1:14.7	67.41
P1-3	36.4:15.3	57.97	25.1:13.5	46.22	-	-	-	-
P1-6	-	-	-	-	-	-	-	-
P1-7	39.2:12.2	68.88	35.6:8.4	76.40	39.1:8.1	79.28	38.1:9.7	74.54
P1-9	36.4:11.3	68.96	-	-	-	-	-	-
P1-10	36.4:15.7	56.87	25.1:12.2	51.40	40.8:15.9	61.02	45.1:19.2	57.43
P1-11	-	-	25.1:12.2	51.40	-	-	45.1:13.4	70.28
P1-14	-	-	35.6:9.7	72.75	-	-	-	-
P1-15	-	-	35.6:9.2	74.16	39.1:10.5	73.15	-	-
F1-1	39.2:12.7	67.60	35.6: 10.3	71.07	39.1: 9.2	76.47	-	-
F1-2	39.2:12.4	68.72	35.6:9.5	76.40	39.1:12.1	69.05	-	-
F2-7	-	-	-	-	39.1:12.6	67.77	38.1:8.6	77.43
F9-1	-	-	-	-	39.1:9.1	76.73	-	-
IN 1-3	31.1:16.1	48.23	23.3: 11.1	52.36	39.1: 14.4	63.17	-	-
IN 1-4	31.1: 16.1	48.23	23.3: 11.1	52.36	39.1: 14.9	61.89	42.6: 12.2	71.36
IN 1-5	31.1: 14.1	54.66	23.3: 11.1	52.36	39.1: 14.1	63.93	42.6: 12.2	71.36
IN 1-7	31.1: 15.1	51.44	23.3: 11.4	51.07	39.1: 12.3	68.54	42.6: 12.2	71.36

ตารางที่ 4.10 ความสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช (ต่อ)

ไอโซเลท	เชื้อรา							
	<i>Fusarium</i>		<i>Alternaria</i>		<i>Cervularia</i>		<i>Colletotrichum</i>	
	Control/ ค่ายับยั้ง	ยับยั้ง (%)	Control/ ค่ายับยั้ง	ยับยั้ง (%)	Control/ ค่ายับยั้ง	ยับยั้ง (%)	Control/ ค่ายับยั้ง	ยับยั้ง (%)
3	24.4:16.1	34.01	20.1:12.2	39.30	24.4:14.4	40.98	36.1:11.1	69.25
4	-	-	20.1:11.1	44.77	24.4:14.4	40.98	36.1:13.7	62.04
5	-	-	-	-	24.4:16.1	34.01	36.1:16.1	55.40
6	24.4:16.1	34.01	20.1:12.7	36.81	24.4:16.6	31.96	36.1:16.1	55.40
10	24.4:14.3	41.39	20.1:13.3	33.83	24.4:15.1	38.11	36.1:14.5	59.83
11	-	-	-	-	-	-	36.1:23.3	35.45
12	24.4:15.5	36.47	20.1:12.2	39.30	24.4:13.8	43.44	36.1:15.5	57.06
13	24.4:15.9	34.83	-	-	24.4:15.5	36.47	36.1:15.5	57.06
14	24.4:15.9	34.83	20.1:13.7	31.84	24.4:14.4	40.98	36.1:18.3	49.30
16	-	-	20.1:12.7	36.81	24.4:13.3	45.49	36.1:18.3	49.30
17	-	-	20.1:11.3	43.78	-	-	36.1:11.1	69.25
18	24.4:15.9	34.83	20.1:12.7	36.81	24.4:16.6	31.96	36.1:16.1	55.40
20	24.4:16.6	31.96	20.1:13.3	33.83	24.4:15.4	36.88	36.1:16.1	55.40
21	24.4:16.1	34.01	20.1:12.7	36.81	24.4:13.8	43.44	36.1:14.3	60.38
22	24.4:16.11	34.01	20.1:12.2	39.30	24.4:13.7	43.85	36.1:11.5	68.41
26	-	-	-	-	-	-	36.1:18.3	49.30
27	24.4:17.2	29.50	20.1:12.2	39.30	24.4:13.3	45.49	36.1:11.6	67.86
28	24.4:16.1	34.01	20.1:10.5	47.76	24.4:11.1	54.50	36.1:11.6	67.86
29	24.4:15.5	36.47	20.1:10.5	47.76	24.4:12.2	50.00	36.1:10.4	71.19
31	24.4:15.9	43.83	20.1:13.7	31.84	24.4:14.8	39.34	36.1:14.4	60.11

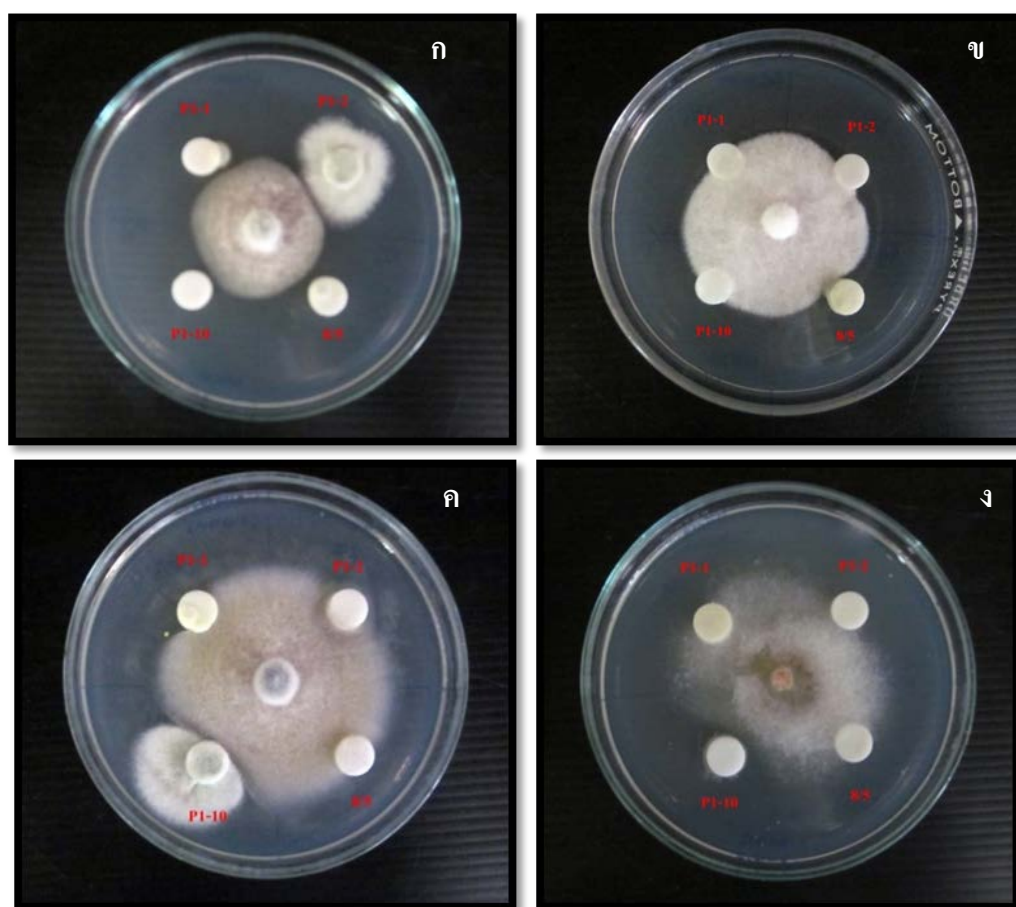
ตารางที่ 4.10 ความสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช (ต่อ)

ไอโซเลท	เชื้อรา							
	<i>Fusarium</i>		<i>Alternaria</i>		<i>Cervularia</i>		<i>Colletotrichum</i>	
	Control/ ค่ายับยั้ง	ยับยั้ง (%)	Control/ ค่ายับยั้ง	ยับยั้ง (%)	Control/ ค่ายับยั้ง	ยับยั้ง (%)	Control/ ค่ายับยั้ง	ยับยั้ง (%)
32	24.4:16.1	34.01	-	-	24.4:12.2	50.00	36.1:15.5	57.06
33	24.4:16.1	34.01	20.1:13.7	31.84	24.4:12.2	50.00	36.1:12.2	66.20
40	24.4:15.9	34.83	20.1:13.3	33.83	24.4:11.1	54.50	36.1:12.2	66.20
IN 1-1	-	-	-	-	-	-	36.1:22.6	37.39
IN 1-2	24.4:15.5	36.47	-	-	24.4:16.1	34.01	36.1:23.3	35.45
IN 1-6	24.4:14.4	40.98	20.1:12.7	36.81	24.4:13.3	45.49	36.1:14.4	60.11
IN 2-6	24.4:13.7	43.85	20.1:12.2	39.30	-	-	36.1:23.3	35.45
IN 2-8	24.4:14.4	40.98	20.1:13.7	31.84	24.4:13.3	45.49	36.1:15.9	55.95
IN 2-9	24.4:14.4	40.98	20.1:12.2	39.30	24.4:13.3	45.49	36.1:13.3	63.15
IN 2-12	24.4:13.3	45.49	20.1:12.2	39.30	24.4:13.8	43.44	36.1:13.3	63.15
PI 3	24.4:13.7	45.49	20.1:12.2	39.30	24.4:13.3	45.59	36.1:13.3	63.15
P1-4	24.4:13.7	43.85	20.1:12.2	39.30	24.4:14.8	39.34	36.1:13.2	63.43
P1-13	24.4:15.1	38.11	20.1:13.3	33.83	24.4:15.1	38.11	36.1:13.3	63.15
P1-14	24.4:16.1	34.01	20.1:13.7	31.84	24.4:16.1	34.01	36.1:15.1	58.17
F9-1	24.4:14.4	40.98	20.1:12.6	37.31	24.4:15.5	36.47	36.1:13.3	63.15

หมายเหตุ - ไม่มีการยับยั้งเชื้อราทดสอบ

4.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Disc diffusion method

จากการนำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ของเชื้อแอคติโนมัยซีท มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา ด้วยวิธี Disc diffusion method เพื่อทดสอบสามารถต้านเชื้อราทดสอบของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต พบว่าสารสกัดที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต P1-10 สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้เพียงชนิดเดียว (ภาพที่ 4.14)



ภาพที่ 4.14 ความสามารถของสารสกัดหยาบต่อการต้านเชื้อรา (ก) *Alternaria* sp. (ข) *Fusarium* sp. (ค) *Cuvularia* sp. และ (ง) *C. gloeosporioides*

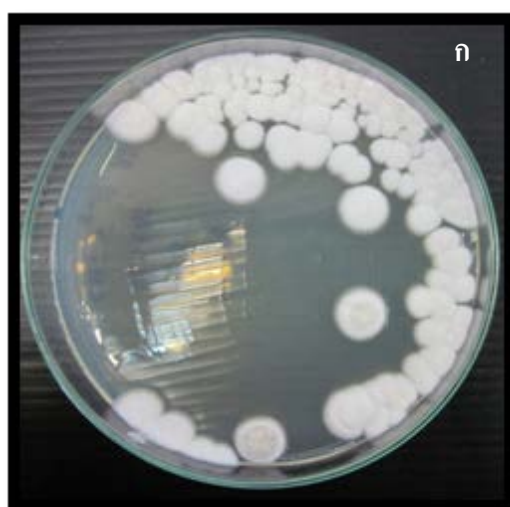
4.5 การจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้

4.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

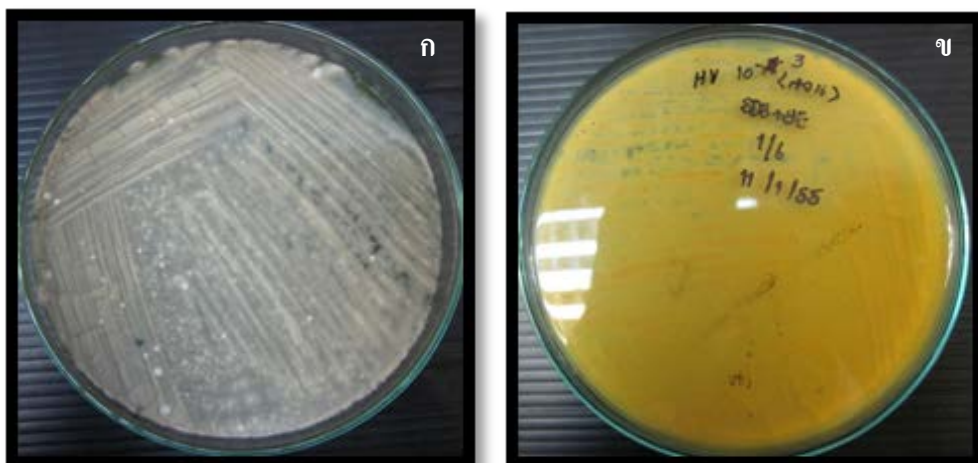
ทำการเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้ง 90 ไอโซเลท บนอาหาร ISP 2 เป็นเวลา 7 วัน เพื่อคัดลักษณะสีโคโลนีของเชื้อแต่ละไอโซเลท พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ตามสีของโคโลนีเป็น 12 กลุ่ม (ตารางที่ 4.11 และภาพที่ 4.15) คือ กลุ่มที่มีสปอร์สีขาว มี substrate mycelium สีครีมและไม่สร้าง pigment 16 ไอโซเลท กลุ่มที่มีสปอร์สีเทา มี substrate mycelium สีเหลือง และสร้าง pigment สีเหลือง 10 ไอโซเลท กลุ่มที่มีสปอร์สีเทาอมน้ำตาล มี substrate mycelium สีน้ำตาลอ่อน และไม่สร้าง pigment 4 ไอโซเลท กลุ่มที่มีสปอร์สีเทาอมน้ำตาล มี substrate mycelium สีเหลือง และสร้าง pigment สีเหลือง 1 ไอโซเลท กลุ่มที่มีสปอร์สีเขียวแก่ มี substrate mycelium สีดำ และไม่สร้าง pigment 4 ไอโซเลท กลุ่มที่มีสปอร์สีขาวอมชมพู มี substrate mycelium สีน้ำตาล และไม่สร้าง pigment 3 ไอโซเลท กลุ่มที่มีสปอร์สีเหลืองอมชมพู มี substrate mycelium สีส้ม และไม่สร้าง pigment 3 ไอโซเลท กลุ่มที่มีสปอร์สีขาวอมเหลือง มี substrate mycelium สีครีม และไม่สร้าง pigment 2 ไอโซเลท กลุ่มที่มีสปอร์สีขาวอมเทา มี substrate mycelium สีน้ำตาลอ่อน และไม่สร้าง pigment 3 ไอโซเลท กลุ่มที่มีสปอร์สีขาวอมม่วง มี substrate mycelium สีครีม และไม่สร้าง pigment 1 ไอโซเลท และกลุ่มที่มีสปอร์สีขาวอมน้ำตาล มี substrate mycelium สีครีม และไม่สร้าง pigment 1 ไอโซเลท

ตารางที่ 4.11 การจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากคุณสมบัติการสร้างสีบนอาหาร ISP 2

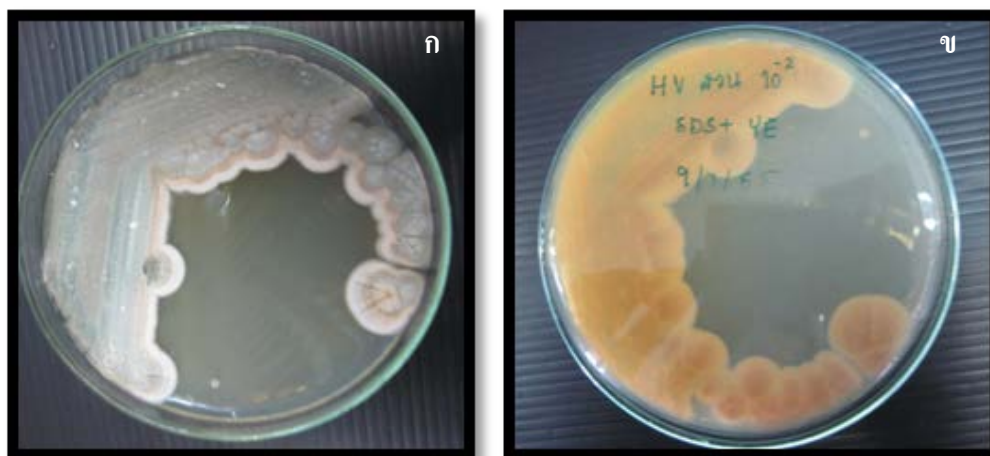
กลุ่ม	สีสปอร์	สี substrate mycelium	pigment บนอาหาร ISP 2	จำนวน ไอโซเลต
1	สีขาว	สีครีม	-	25
2	สีเทา	สีเหลือง	สีเหลือง	33
3	สีเทาอมน้ำตาล	สีน้ำตาล	-	5
4	สีเทาอมน้ำตาล	สีเหลือง	สีเหลือง	1
5	สีเขียวแก่	ดำ	-	4
6	สีขาวอมชมพู	สีเหลือง	-	3
7	สีเหลืองอมชมพู	สีส้ม	-	5
8	สีเหลือง	สีน้ำตาลอ่อน	-	3
9	สีขาวอมเหลือง	สีครีม	-	2
10	สีขาวอมเทา	สีน้ำตาลอ่อน	-	3
11	สีขาวอมม่วง	สีครีม	-	1
12	สีขาวอมน้ำตาล	สีครีม	-	5
รวม				90



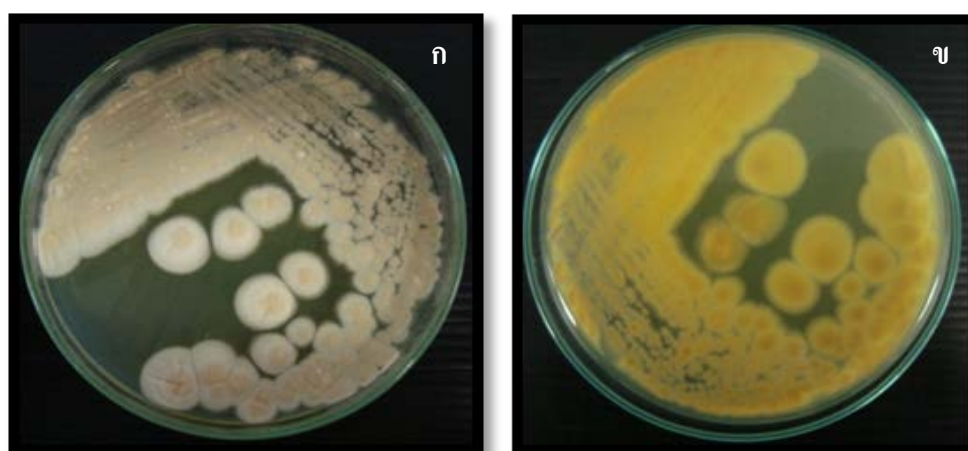
กลุ่มที่ 1 (ก) เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มสปอร์สีขาว (ข) สีได้ผิวหนังอาหารสีครีม



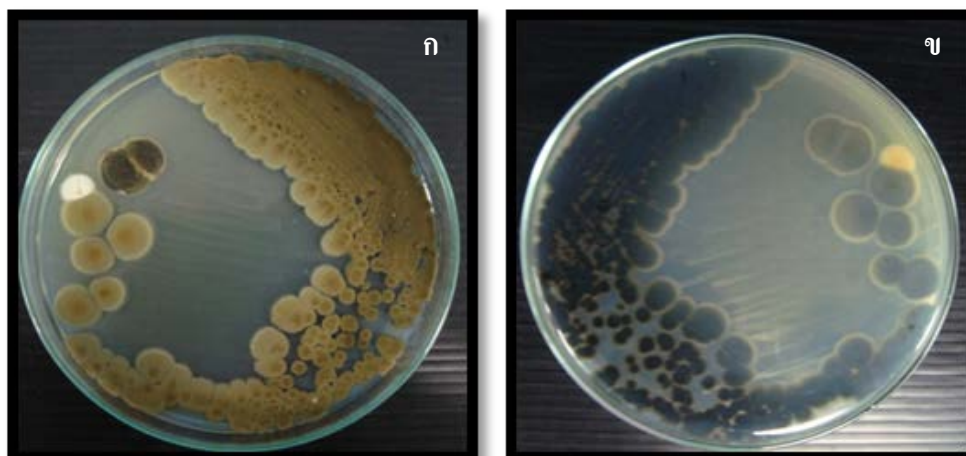
กลุ่มที่ 2 (ก) เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มสปอร์สีเทา (ข) สีได้ฟิวอาหารสีเหลือง



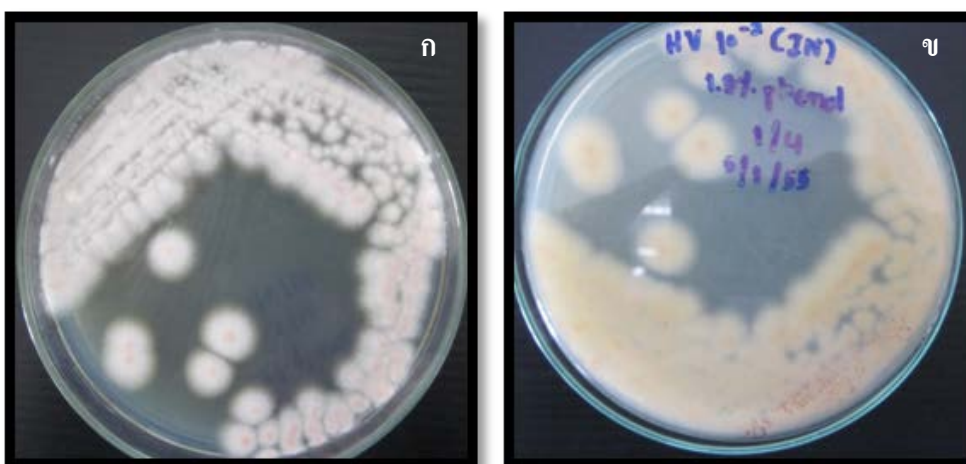
กลุ่มที่ 3 (ก) เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มสปอร์สีเทาอมน้ำตาล (ข) สีได้ฟิวอาหารสีน้ำตาล



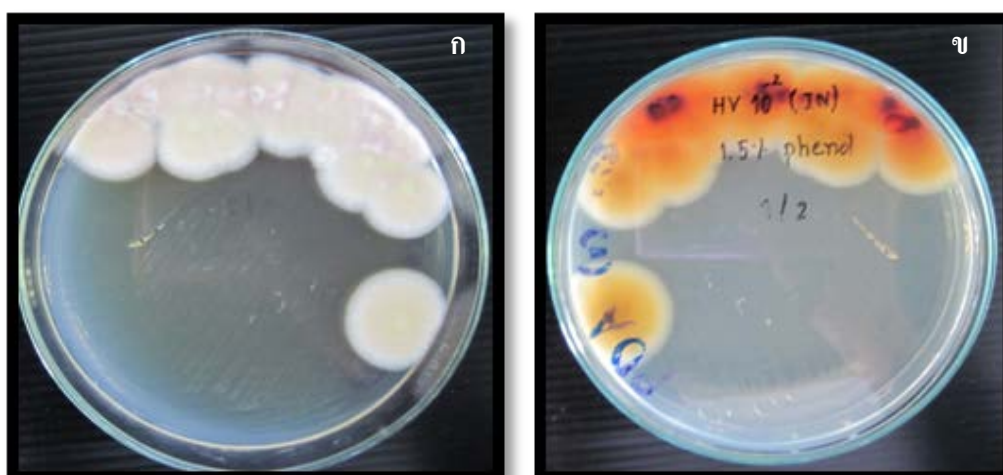
กลุ่มที่ 4 (ก) เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มสปอร์สีเทาอมน้ำตาล (ข) สีได้ฟิวอาหารสีน้ำตาล และสร้าง pigment สีเหลือง



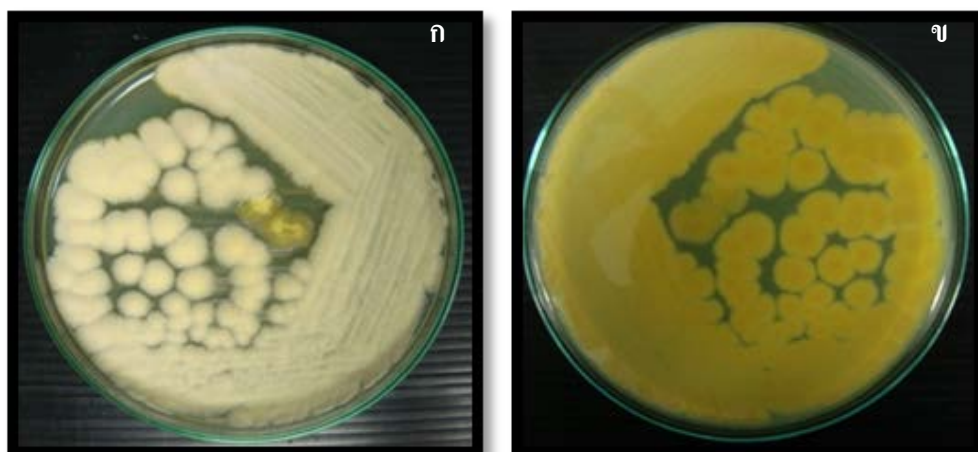
กลุ่มที่ 5 (ก) เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มสปอร์สีเขียวแก่ (ข) สกัดผิวอาหารสีดำ



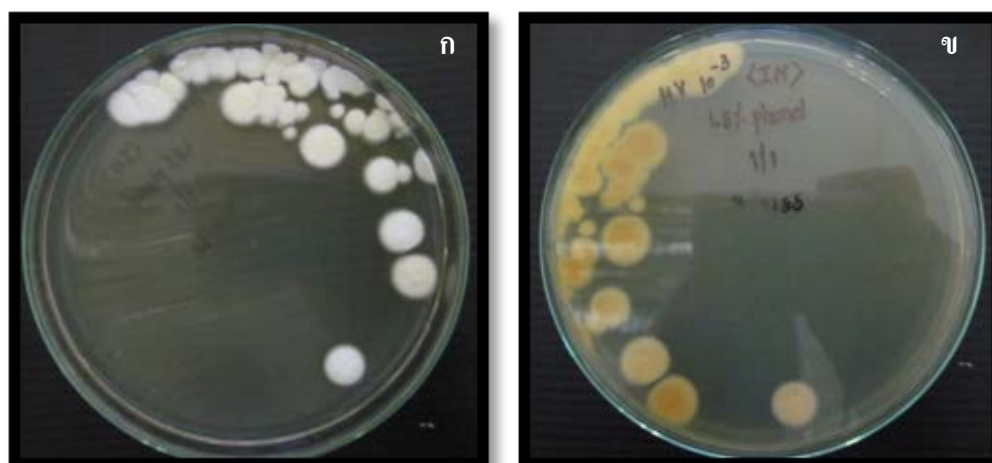
กลุ่มที่ 6 (ก) เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มสปอร์สีขาวอมชมพู (ข) สกัดผิวอาหารสีเหลืองอ่อน



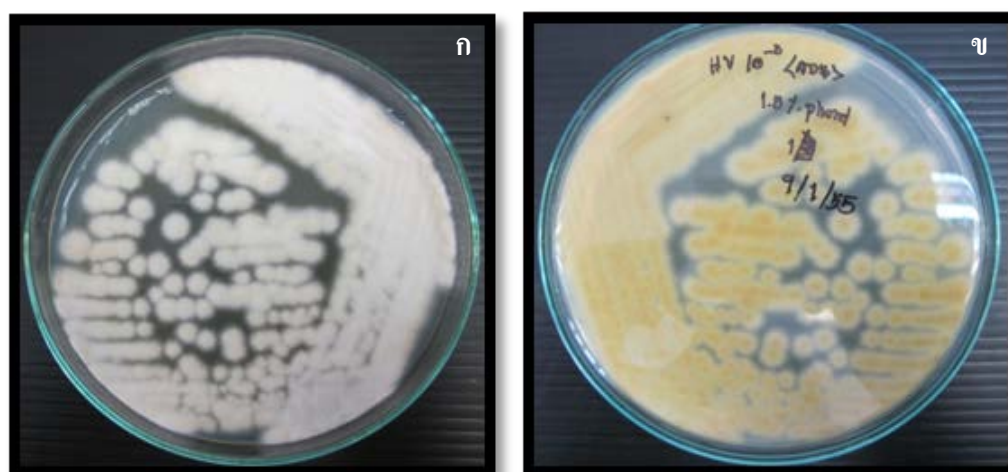
กลุ่มที่ 7 (ก) เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มสปอร์สีชมพูอมเหลือง (ข) สกัดผิวอาหารสีส้ม



กลุ่มที่ 8 (ก) เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มสปอร์สีเหลือง (ข) สกัดผิวอาหารสีเหลือง



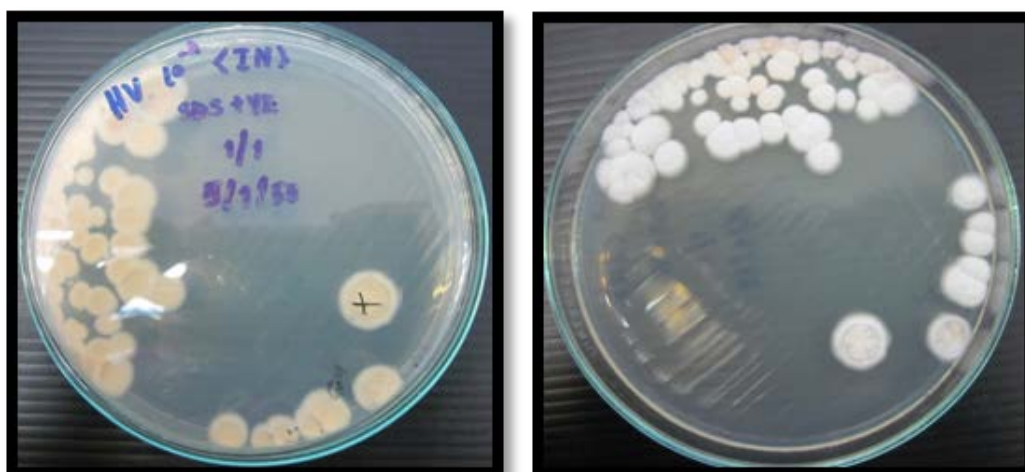
กลุ่มที่ 9 (ก) เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มสปอร์ขาวอมสีเหลือง (ข) สกัดผิวอาหารสีเหลือง



กลุ่มที่ 10 (ก) เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มสปอร์สีขาวอมเทา (ข) สกัดผิวอาหารสีน้ำตาลอ่อน



กลุ่มที่ 11 (ก) เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มสปอร์สีขาวอมม่วง (ข) สีได้ผิวอาหารสีครีม

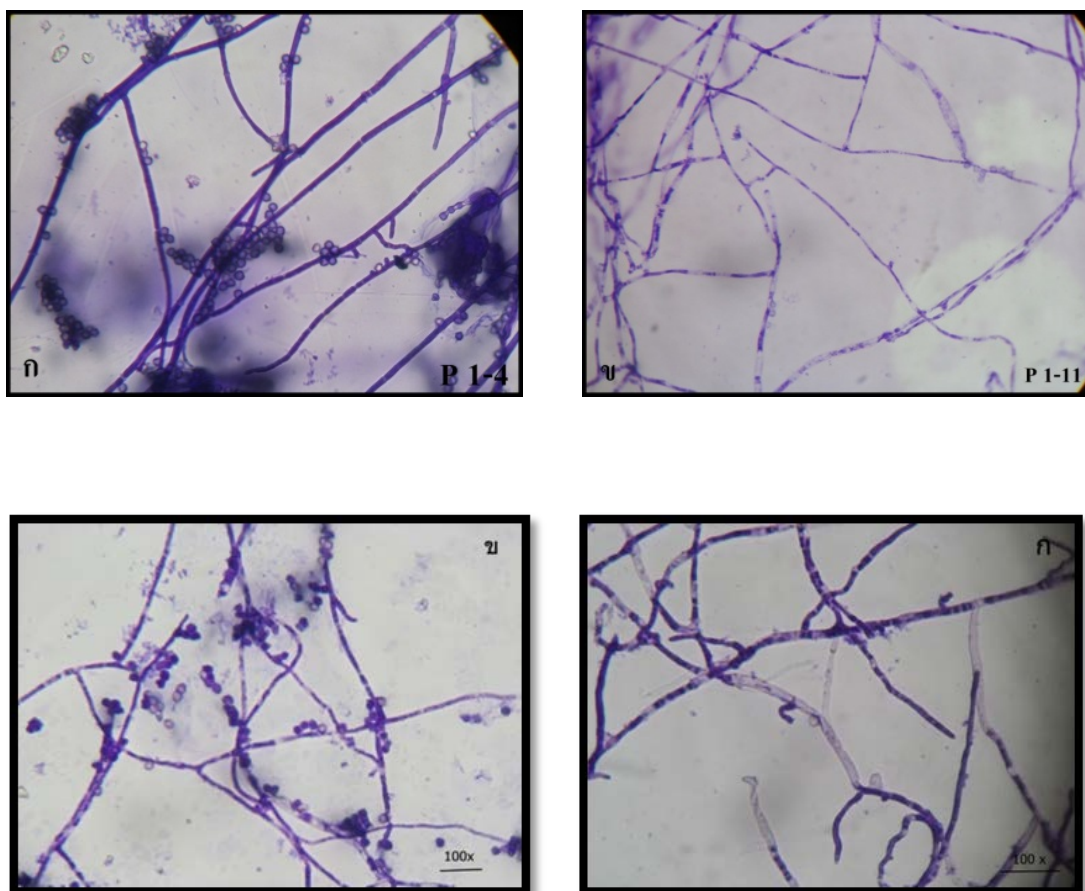


กลุ่มที่ 12 (ก) เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มสปอร์สีขาวอมน้ำตาล (ข) สีได้ผิวอาหารสีครีม

ภาพที่ 4.15 การจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากคุณสมบัติการสร้างสีบนอาหาร ISP 2

4.5.2 การศึกษาลักษณะเส้นใย และสปอร์โดยใช้เทคนิคการปักกระจกปิดสไลด์

จากการใช้เทคนิคการปักกระจกปิดสไลด์ศึกษาลักษณะสปอร์โดยเฉพาะเชื้อบนอาหาร OMA และ ISP 2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าโคโลนีของเชื้อมีลักษณะเป็นปุย มีส่วนของเส้นใยที่ฝังแน่นลงไปใต้ผิวของอาหาร แล้วนำกระจกปิดสไลด์ออกมาขัดด้วย crystal violet เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเส้นใยของสปอร์ และสปอร์มีลักษณะกลมผิวเรียบ เรียงตัวกันอย่างเป็นกลุ่ม และกระจัดกระจายตามเส้นใย ซึ่งยังไม่สามารถจำแนกได้ เนื่องจากขาดความชำนาญ และไม่มีคู่มือสำหรับจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีท จึงจำเป็นต้องส่งให้ผู้ชำนาญช่วยจำแนก (ภาพที่ 4.16)

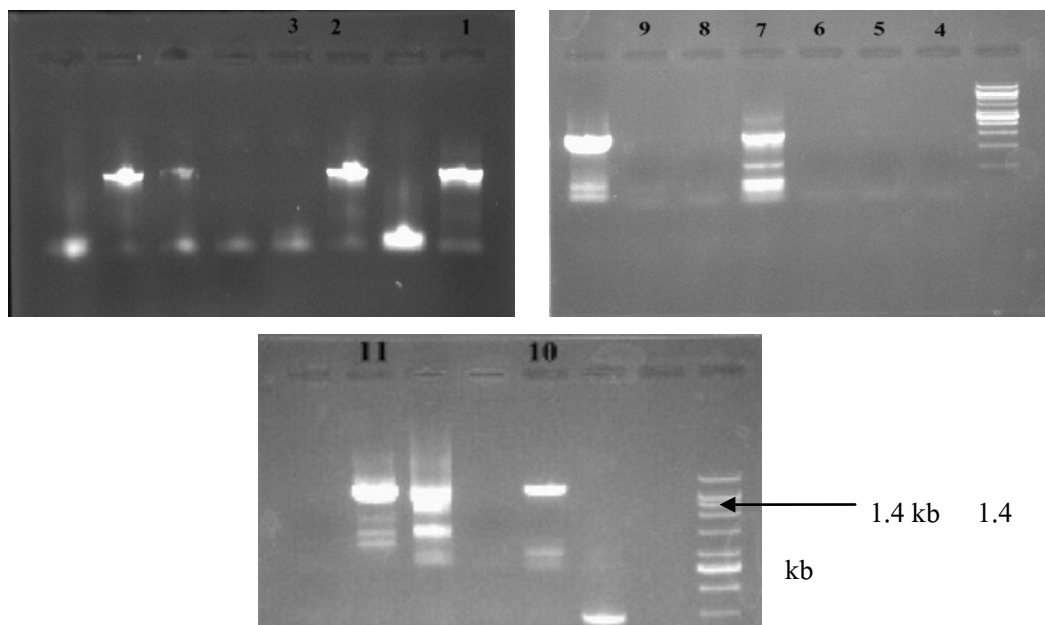


ภาพที่ 4.16 ลักษณะเส้นใยและการจัดเรียงตัวของสปอร์แอคติโนมัยสีท ไอโซเลท P1-4, P1-11 DHSY-10 และ DHSY-13 ตามลำดับ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

4.5.3 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR

การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยวิเคราะห์ลำดับเบสบนยีน 16S rDNA โดยสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จำนวน 20 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท IN1-7, IN2-12, IN2-11, IN2-8, P1-1, P1-2, P1-4, P1-11, P1-15, IN1-2, P1-10, DSSY-2, DHSY-10, DHSY-13, DHSY-14, DHSY-16, DHSY-17, DHSY-19, DHSY-21 และ DHPH-27 เพื่อนำไปเป็น template DNA ในการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1525R (5'-AAGGAGGTGTCCARCC-3') สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้น DNA บริเวณ 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.4 kb จำนวน 8 ไอโซเลท คือ IN1-7, IN2-12, P1-4, P1-10, IN1-2,

DSSY-2, DHSY-13 และ DHPH-27 หลังจากนั้นจะนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์เพื่อส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อด้วยวิธีดังกล่าวต่อไป (ภาพที่ 4.17)



ภาพที่ 4.17 แแถบ 16S rDNA ของตัวอย่างเชื้อไอโซเลตต่างๆ บน 1% agarose gel ซึ่งมีขนาด 1.4 kb เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

จากภาพ	หมายเลข 1 = IN1-7	หมายเลข 5 = P1-1	หมายเลข 9 = P1-15
	หมายเลข 2 = IN2-12	หมายเลข 6 = P1-2	หมายเลข 10 = IN1-2
	หมายเลข 3 = IN2-11	หมายเลข 7 = P1-4	หมายเลข 11 = P1-10
	หมายเลข 4 = IN2-8	หมายเลข 8 = P1-11	