บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

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

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททุนอุดหนุนการวิจัยเงินรายได้ ประจำปี 2554 จำนวนเงิน 50,000 บาท

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

หน่วยงาน สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาทักษิณ

รายนามคณะผู้วิจัย

1) ผศ.ดร.นุกูล อินทระสังขา ที่ปรึกษาโครงงาน
2) ดร.ชัยสิทธิ์ นิยะสม หัวหน้าโครงการ

สถานที่ทำงาน สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง 93110

โทรศัพท์/ โทรสาร 074-693992

ในการศึกษานี้เป็นการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณต่างๆ 6 จุด ในมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง โดยที่มีการบำบัดตัวอย่างดินก่อนด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ การใช้สารละลายโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์ สารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 1.5 และการอบตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ Starch Casien Agar, Oat Meal Aagr และ Humic Vitamin Agar ที่มีนิสตาตินและกรดนาลิดิซิกความเข้มข้น 50 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าจำนวนแอคติโนมัยสีทที่นับได้จากตัวอย่างดินมีค่าอยู่ระหว่าง 1×10^{4}-2.2×10^{5} CFU/กรัม และได้คัดเลือกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินทั้ง 6 จุด จำนวน 90 ไอโซเลท เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็น clinical strains 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Acinetobacter baumannii, Escherichia coli*, Coagulase Negative Staphylococci และ *Klebsiella pneumoniae* และเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เป็น laboratoy strains 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. aeruginosa, S. aureus, Salmonella* sp., *Bacillus cereus, Klebsiella* sp. และยีสต์ 1 สายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยเทคนิค cross streak พบว่าแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด มีจำนวน 61 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 67.8 จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของแอคติโนมัยสีท ด้วยวิธี dual culture พบว่า 66 ไอโซเลท จากทั้งหมด 75 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 88 ของแอคติโนมัยสีทที่เลือกมาทดสอบ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด จากเชื้อราทดสอบ 4 ชนิด คือ *Alternaria* sp., *Cervularia* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium* sp. ซึ่งแอคติโนมัยสีทที่แยกได้สามารถจัดกลุ่มตามสีของสปอร์ 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 ^{o}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 ^{o}C for further study.

แบบรายงานการวิจัยฉบับย่อ

มหาวิทยาลัยทักษิณ

การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

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

อ.ดร.ชัยสิทธิ์ นิยะสม

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย

จากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2554

มหาวิทยาลัยทักษิณ

การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

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

อ.ดร.ชัยสิทธิ์ นิยะสม

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย

จากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2554

มหาวิทยาลัยทักษิณ

สิงหาคม 2556

คำนำ

แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่และพบจำนวนมากที่สุดในดิน เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จุลินทรีย์ในดินกลุ่มที่มีความสำคัญกลุ่มหนึ่ง คือ แอคติโนมัยสีท (actinomycetes) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในอันดับ (Oder) Actinomycetales โดยส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ เชื้อนี้มีลักษณะทางสัณฐานทางวิทยาที่หลากหลาย มีตั้งแต่เป็นทรงกลม ท่อน และเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อราที่มีการแตกแขนง และมีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศ แอคติโนมัยสีทบางชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราได้ เช่น เชื้อ *Streptomyces* sp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ที่เป็นประโยชน์แก่มนุษย์เป็นจำนวนมาก ในปัจจุบันยังมีการวิจัยและค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่หลายชนิดจากเชื้อแอคติโนมัยสีทเหล่านี้ (Madigan *et al*., 2009)

ปัจจุบันโรคติดเชื้อหลายชนิดเป็นปัญหาที่สำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุขของประเทศ ชนิดของยาปฏิชีวนะที่มีอยู่ในท้องตลาดมีจำนวนไม่เพียงพอ ดังนั้นการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ โดยเฉพาะสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคจึงมีความจำเป็นอย่างมาก นอกจากประโยชน์ทางด้านการแพทย์และสาธารณสุขแล้วยังมีรายงานการใช้ประโยชน์จากแอคติโนมัยสีทในด้านการเกษตร โดยใช้เป็นเชื้อปฏิปักษ์ควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดและมีการผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์ออกวางจำหน่ายในหลายประเทศรวมทั้งในประเทศไทย ซึ่งการคัดเลือกสายพันธุ์แอคติโนมัยสีท ที่สามารถสร้างสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืช หรือใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคพืชจึงมีความจำเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะที่เป็นสายพันธุ์ของท้องถิ่นเอง (indigenous microorganisms)

ประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และมหาวิทยาลัยทักษิณวิทยาเขตพัทลุง มีอาณาเขตกว้างขวาง มีพื้นที่ประมาณสามพันกว่าไร่ มีความหลากหลายทางลักษณะภูมิประเทศจึงน่าสนใจและจำเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาความหลากหลาย ตลอดจนความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ เพื่อที่จะนำความรู้ที่ได้มาประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์และการเกษตรต่อไปในอนาคต และเพื่อเป็นแนวทางการใช้ทรัพยากรทางชีวภาพที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

รายงานวิจัยฉบับนี้ เป็นรายงานฉบับย่อ ถ้าผู้สนใจต้องการศึกษารายละเอียดเพิ่มเติม จะศึกษาได้จากรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชัยสิทธิ์ นิยะสม

การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

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

ความสำคัญของปัญหาการวิจัย

การแยกและคัดเลือกสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ โดยเฉพาะสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค จึงมีความจำเป็นอย่างมาก นอกจากประโยชน์ทางด้านการแพทย์และสาธารณสุขแล้วยังมีรายงานการใช้ประโยชน์จากแอคติโนมัยสีทในด้านการเกษตร โดยใช้เป็นเชื้อปฏิปักษ์ควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดและมีการผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์ออกวางจำหน่ายในหลายประเทศรวมทั้งในประเทศไทย ซึ่งการคัดเลือกสายพันธุ์แอคติโนมัยสีท ที่สามารถสร้างสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืช หรือใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคพืชจึงมีความจำเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะที่เป็นสายพันธุ์ของท้องถิ่นเอง (indigenous microorganisms) ความรู้ที่ได้จากการศึกษาจะเป็นฐานข้อมูล และคลังของสายพันธุ์จุลินทรีย์ เพื่อเป็นแนวทางการใช้ทรัพยากรทางชีวภาพที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกและรวบรวมสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ที่สามารถยังยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์บางชนิด
2. เพื่อคัดเลือกและรวบรวมสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชบางชนิด
3. จำแนกชนิด จัดกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้เบื้องต้น ตามลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการ

สมมติฐานการวิจัย

มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง มีพื้นที่กว้างขวางถึงสามพันกว่าไร่ น่าจะเป็นแหล่งของของจุลินทรีย์ในดินกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่หลากหลาย มีความเป็นไปได้ที่จะพบสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทที่มีศักยภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ หรือเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) โดยเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคในพืช ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์และสาธารณะสุข รวมทั้งประโยชน์ทางด้านการเกษตร

การสังเคราะห์วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ประชากรของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบในดินเป็นเชื้อในกลุ่มของ *Streptomyces* ประมาณ 96 % รองลงมาเป็น *Nocardia* 2 % และอันดับสาม คือ *Micromonospora* 1 % ส่วนสกุลอื่นๆ จะพบน้อยกว่า 1% (Kim, 1992) มี

รายงานการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากป่าชายเลน จากตัวอย่างดินในประเทศไทย ซึ่งสามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 14 สกุล เป็นจำนวน 151 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้ 95 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ และ 27 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* ได้ (รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2541) ส่วนการจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินป่าชายเลนเขตชายฝั่งตะวันออกของประเทศไทย พบว่า *Actinomadura* เป็นแอคติโนมัยสีทที่พบมากที่สุด รองลงมาเป็น *Streptocycetes* และยังพบสกุลที่หายากอีกหลายสกุล และยังมีรายงานการศึกษาการคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากแหล่งดินชายทะเลในประเทศไทยจำนวน 200 ตัวอย่าง พบว่าแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็น *Streptomyces, Micromonospora* และ *Rhodococcus* (วชิร ใจภักดี, 2544) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* หลายชนิด ได้แก่ ampicillin และ penicillin-N ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเพปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนั้น *S. clavuligerus* สามารถผลิต clavams มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบตาแลคตาเมสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย staphylococci และแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน streptomycin ที่ผลิตโดย *S. griseus* และ neomycin ที่ผลิตโดย *S. fradiae* ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด (Goodfellow *et al*., 1988; Lazzarini *et al*., 2000) จากฐานข้อมูลของ Antibiotic Literature Database (ABL) รายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างโดยจุลินทรีย์ทั้งหมด 23,000 ชนิด พลว่ามาจากเชื้อรา 42 % *Streptomyces* 32.1 % แบคทีเรียอื่นๆ 10.8 % และแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่หายากอีก 15.1 % ถ้าพิจารณาเฉพาะสารต่อต้านจุลชีพที่มีอยู่ประมาณ 8,000 ชนิด จะพบว่าผลิตจาก *Streptomyces* 45.6% เชื้อรา 21.5% แบคทีเรีย 16.9% และสร้างจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่หายากอีก 16 % (Lazzarini *et al*., 2000)

วิธีวิจัย

ตัวอย่างดินและการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท

เก็บตัวอย่างดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง จำนวน 6 จุด คือ ดินบริเวณตึกโดม ดินแปลงนาข้าวบริเวณตึกโดม ดินบริเวณป่าข้างตึกวิทยบริการ ดินบริเวณนาข้าวข้างหอพักอินทนิล ดินบริเวณแปลงทดลองข้างตึกโดม และดินบริเวณฟาร์มโคนม pretreat ดินตัวอย่างก่อนด้วยวิธีต่างๆ กัน 3 แบบ คือ SDS/yeast extract, 1.5% phenol และ อบที่ 120 องศาเซลเซียส และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดคือ OMA, HVA และ SCA

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

- การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Cross streak
- ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion method
- การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Agar plug
- สกัดสารออกฤทธิ์ด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate
- ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion method
- ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี Agar well
- การหาค่า MIC ของสารสกัดด้วยวิธี Broth microdilution

การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช

- การทดสอบความสามารถในการสร้างสารต่อต้านเชื้อรา โดยวิธี Dual culture
- ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion method

การจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้โดย**การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา**

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการแบ่งกลุ่มโดยใช้ลักษณะสีโคโลนี สีสปอร์ ลักษณะเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ และการสร้างสารสี บนอาหาร ISP2 และศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ด้วยการทำ slide culture

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

จากการทดลองการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง พบว่าจำนวนแอคติโนมัยสีทที่นับได้อยู่ระหว่าง 1×10^4 ถึง 2.2×10^5 CFU/กรัม จากนั้นคัดเลือกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินจำนวน 90 ไอโซเลท นำมาทดสอบการความสามารถในการยับยั้งการเจริญของของเชื้อทดสอบด้วยวิธี cross streak พบว่าแอคติโนมัยสีทจำนวน 61 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้อย่างน้อยที่สุด 1 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 67.8 พบว่าเฉพาะแอคติโนมัยสีทที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM broth เท่านั้นที่สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ และยับยั้งได้เฉพาะ *S. aureus* ชนิดเดียวเท่านั้น ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญในแบคทีเรียทดสอบชนิด ซึ่งผลไม่สอดคล้องกับการทดสอบโดยวิธี cross streak ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุมาจากการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทำที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการทดลอง จึงทำให้ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมากกว่าความเป็นจริง ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบอีกแบบ คือ agar plug และทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทดสอบกับแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* จากการทดสอบพบว่าแอคติโนมัยสีทสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ จำนวนไอโซเลทคิดเป็น 61% ของปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีทที่นำมาทดสอบ ซึ่งไอโซเลท BB1-11 และ 8/5 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิดได้ดีที่สุด คิดเป็นร้อยละ 2 ของเชื้อที่นำมาทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของรัชนี (2552) ซึ่งนำแอคติโนมัยสีทมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบซึ่งได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Ralstonia solanacearum* และ *Xanthomonas campestris* pv. *glycine* บนอาหาร ISP2 ด้วยวิธีราดทับ พบว่ามีแอคติโนมัยสีทจำนวน 233 ไอโซเลท หรือคิดเป็น 73.5% สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

จากการนำแอคติโนมัยสีทจำนวน 75 ไอโซเลท ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธี dual culture พบว่าการยับยั้งเชื้อราทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยเปรียบเทียบค่าการยับยั้งกับชุดควบคุม 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%) สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ 1 ชนิด

และ 9 ไอโซเลท (12%) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของศิริภรณ์ (2550) ทำการคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากดินในจังหวัดต่างๆได้ 115 ไอโซเลท และทำการทดสอบความสามรถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้ 66% และไอโซเลทที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้คิดเป็น 33.04%

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไอโซเลทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคได้แก่ ไอโซเลท IN2-11, P1-1, P1-2, P1-10 และ8/5 ด้วยตัวทำละลายเอทิลอาซิเตต แล้วทำการระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) จนตัวทำละลายแห้งทำการชั่งน้ำหนัก และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ด้วยวิธี disc diffusion method พบว่าสารสกัดหยาบของไอโซเลท P1-2 สามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้ ซึ่งมีขนาดของวงใสในการยับยั้งเท่ากับ 17.5 มิลลิเมตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปหาค่า MIC ต่อเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Broth microdilution พบว่าสารสกัดหยาบของไอโซเลท P1-1, P1-2 และ 8/5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ที่ระดับความเจือจาง 1:4 และการทดสอบการยับยั้งของสารสกัดหยาบต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี Agar well พบว่าสารสกัดหยาบของไอโซเลท IN2-11/1, P1-2, P1-1/1 และ8/5 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ซึ่งมีขนาดของวงใสที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* เป็น 14.8, 11.7, 8.4 และ7.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วย 3 วิธีข้างต้น สารสกัดที่สกัดได้สามารถยับยั้งเฉพาะเชื้อ *B. cereus* เพียงชนิดเดียวซึ่งไม่สอดคล้องกับณัฐชัย (2550) สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 77 สายพันธุ์จากดิน และทรายตัวอย่างจากบริเวณชายหาด และป่าชายเลน 4 จังหวัดในประเทศ เมื่อนำมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนที่แยกได้ พบว่าส่วนของสารที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus, S. aureus* และ *P. aeruginosa* เนื่องจากตัวทำละลายเอทิอาซิเตตที่ใช้ในการสารสกัดสำหรับการทดลองนี้ไม่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้ จึงทำให้สารสกัดที่สกัดได้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa, S. aureus* และ *E. Coli* ได้ จึงควรจะใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น ที่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบชนิดอื่นนอกจากเชื้อ *B. cereus* และการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากไอโซเลท IN2-11/1, P1-2,P1-1/1 และ 8/5 ด้วยวิธี disc diffusion method เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทดสอบของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอาซิเตต พบว่าสารสกัดที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท P1-10 สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้เพียงชนิดเดียว ซึ่งจากรายงานการวิจัยของสุทธิ์นัน (2551) เมื่อนำสารสกัดหยาบจากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMU-PA101 ในอาหารเหลวมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิดได้แก่ hexeane, diethyl ether, ethyl acetate, chloroform และ butanol พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายดังกล่าวสามรถยับยั้งเชื้อราก่อโรคทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพดี โดยเฉพาะสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และ butanol สามารถยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

จากการจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินตัวอย่าง โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่น ลักษณะสีโคโลนี สีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ และการสาร้างสารสีบนอาหาร ISP2 สามารถจัดกลุ่มได้ออกเป็น 12 กลุ่ม ซึ่งค่อนข้างน้อยกว่ารายงานการวิจัยของ รัชนี (2552) ที่คัดแยกแอคติโนมัยสีทจากรากและดิน

รอบรากพืชตระกูลถั่วพบว่าเมื่อจัดกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ตามสีสปอร์ สีเส้นใยอาหารและความสามารถในการสร้างสารสีบนอาหาร ISP 3 พบว่าสามารถจัดจำแนกได้ 71 กลุ่ม ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ที่ความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทในดินตัวอย่างของมหาวิทยาลัยทักษิณ มีความหลากหลายน้อยกว่าดินที่เก็บจากบริเวณรากของพืช จากนั้นนำแอคติโนมัยสีทบางสายพันธุ์ ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชในระดับที่สูงกว่าร้อยละ 50 เพื่อจัดจำแนกชนิดของแอคติโนมัยสีทดังกล่าวโดยศึกษาลักษณะของสปอร์ด้วยวิธีการใช้เทคนิคการปักกระจกปิดสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า สปอร์มีลักษณะกลม ผิวเรียบ เรียงตัวเป็นกลุ่ม และเป็นเส้นสายคล้ายลูกโซ่กระจัดกระจายอยู่ตามเส้นใย จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคการปักกระจกปิดสไลด์ลักษณะดังกล่าวน่าจะเป็นแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้ยังไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนก

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมในการสร้างสารต้านจุลชีพ
2. ควรมีการวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ว่าเป็นแบบ *LL*-DAP หรือ *meso*-DAP ด้วยวิธี thin layer chromatography
3. ควรใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นๆ นอกจากสารละลาย Ethyl acetate

บรรณานุกรม (ระบุเฉพาะที่เกี่ยวข้องเท่านั้น)

รัชนี มิ่งมา (2552). แอคติโนมัยสีทจากรากและดินรอบรากพืชตระกูลถั่วและการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์. (2541). “การเก็บรวบรวมและการตรวจหา Actinomycetes จากดินป่าชายเลนที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพ”, วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 6(1), 23-33.

วชิร ใจภักดี. (2544). การคัดแยกแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารต้านทานเชื้อราจากดินในประเทศไทยและตรวจลำดับเบสของยีน16S rDNA. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Kumar, N., Singh, R.K., Mishra, S.K., Singh, A.K. and Pachouri, U.C. (2010). “Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria”, International Journal of Microbiology Research. 2(2), 12-16.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. (2009) Brock biology of microorganism. San Francisco: Pearson Education.

Nonomura, H. and Hayakawa, M. (1988). Biology of Actinomycetes. Tokyo : Japan Scientific Societies.

Williams, S.T., Goodfellow, M. and Alderson, G. (1989). Bergey' s manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins Company.