

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทในดินบริเวณเขื่อนสิรินธรและ  
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อผลิต

**A study of actinomycetes from the soil at Sirindhorn dam's conservation  
area and their biological active substances**

โดย

ผศ. ดร. เสาวนิต ทองพิมพ์

รศ. งามนิจ นนทโส

ดร. พลศักดิ์ มหาจันทร์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๔

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไปจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้โครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ชุดโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช (อพ.สธ.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๔ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์สารเคมีบางชนิด และขอขอบคุณการไฟฟ้าฝ่ายผลิตเขื่อนสิรินธรที่ได้อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง และขอบคุณ วินัย แจ่มจันทร์ ที่ได้ช่วยงานด้านห้องปฏิบัติการในงานวิจัยนี้

เสาวนิต ทองพิมพ์  
งามนิจ นนทโส  
พลศักดิ์ มหาจันทร์

๑๖ กรกฎาคม ๒๕๕๕

## บทคัดย่อ

ในการศึกษาค้างนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างดิน 81 ตัวอย่าง จากบริเวณพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนสุดา สยามบรมราชกุมารี (อพ. สธ.) เขื่อนสิรินธร จากการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของดิน พบปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินสูงสุด 20.88% ในเดือนกันยายน และต่ำสุด 4.06% ในเดือนมกราคม ค่าพีเอชของตัวอย่างดินในการเก็บตัวอย่างดินทั้ง 4 ครั้งมีสถานะเป็นกรดอ่อน (pH 5.75-5.92) และอุณหภูมิเฉลี่ยของตัวอย่างดินของการเก็บทั้ง 4 ครั้ง มีค่าไม่ต่างกัน ซึ่งอยู่ระหว่าง 22.80-28.63 องศาเซลเซียส ทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสียได้ทั้งหมด 129 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนมัยสียในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยใช้วิธี perpendicular streak และ dual culture พบ 93 ไอโซเลท (72%) จากทั้งหมด 129 ไอโซเลทสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ใช้ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด โดยพบว่าการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่า 18 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สายพันธุ์ AacCU, 16 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สายพันธุ์ AacWS, 18 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สายพันธุ์ AacSK, 25 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), 33 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ RsT, 34 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ Rs P, 40 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Sclerotium rolfsii*, 71 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum capsici*, 63 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides*, 41 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Fusarium oxysporum* และในการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราสาเหตุโรค คน สัตว์ พบว่า 21 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans*, 16 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 26 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus*, 20 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae*, 2 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, 11 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, 4 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, 6 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ *Salmonella enteritica* serovar Typhimurium จากนั้นได้คัดเลือกไอโซเลทของแอกติโนมัยสียที่มีประสิทธิภาพสูงจำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ S13, S15, S19, S23, S24, S34, S36, S53, S80, S80, S83, S84, S111 และ S113 มาจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับองค์ประกอบเคมีของเซลล์ พบ 9 ไอโซเลท ได้แก่ S15, S24, S27, S36, S53, S85, S111 และ S113 มีชนิดของ DAP เป็น LL-DAP และมีลักษณะของสายโซ่สปอร์ 3 กลุ่ม ได้แก่ rectiflexibles, retinaculiaperti และ spirales ซึ่งคุณลักษณะดังกล่าวตรงกับเชื้อแอกติโนมัยสียสกุล *Streptomyces* และ 5 ไอโซเลท ได้แก่ S13, S19, S23, S34 และ S80 เป็นแบบ Meso-DAP จึงจัดอยู่ในกลุ่ม non-*Streptomyces*

## Abstract

In this study, 81 soil samples were collected from conservation area of Chulabhorn dam. Some physical properties of the soil samples i.e. pH and moisture contents were determined. The highest and lowest soil humidity were found in September (20.88%) and January (4.06%), respectively. The pHs of 1<sup>st</sup>-4<sup>th</sup> soil sampling were slightly acidic, ranging from 5.75-5.92. The temperatures of 1<sup>st</sup>-4<sup>th</sup> soil sampling were ranging from 22.80-28.63 °C. Total 129 actinomycete isolates were obtained from soil samples which were then examined for their antimicrobial activities against test pathogens. By using perpendicular streak and dual culture techniques, it was found that 93 actinomycete isolates (72%) inhibited at least one of test pathogens. For determination of the antimicrobial activity against bacterial and fungal phytopathogens, it was found that 18 actinomycete isolates inhibited *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* strain AacCU, 16 isolates inhibited *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* strain AacWS, 18 isolates inhibited *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* strain AacSK, 25 isolates inhibited *Xanthomona campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), 33 isolates inhibited *Ralstonia solanacearum* strain RsT, 34 isolates inhibited *R. solanacearum* strain Rs P, 40 isolates inhibited *Sclerotium rolfsii*, 71 isolates inhibited *Colletotrichum capsici*, 63 isolates inhibited *Colletotrichum gloeosporioides*, 41 isolates inhibited *Fusarium oxysporum*. For determination of the antimicrobial activity against bacterial and fungal human/animal pathogens, it was found that 21 actinomycete isolates inhibited *Candida albicans*, 16 isolates inhibited methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 26 isolates inhibited *Bacillus cereus*, 20 isolates inhibited *Streptococcus agalactiae*, 2 isolates inhibited *Pseudomonas aeruginosa*, 11 isolates inhibited *Aeromonas hydrophila*, 4 isolates inhibited *Escherichia coli*, 6 isolates inhibited *Salmonella enteritica* serovar Typhimurium. Then 15 most effective actinomycete isolates were chosen for further identification based on their morphological and chemotaxonomical characteristics. It was found that isolates S13, S15, S19, S23, S24, S34, S36, S53, S80, S80, S83, S84, S111 and S113 contained LL-diaminopimelic acid in their cell wall and the patterns of spore-chain were either rectiflexibles, retinaculiaperti or spirales which specified them in the genus *Streptomyces*. The other isolates i.e. S13, S19, S23, S34 and S80 contained meso- diaminopimelic acid in their cell wall which indicated that they belonged to a non-*Streptomyces* group.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายคำย่อ	ฉ
บทที่ 1: บทนำ	1
บทที่ 2: ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3: วิธีดำเนินการวิจัย	10
บทที่ 4: ผลการวิจัยและอภิปรายผล	16
บทที่ 5: สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	34
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก ก: ลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติของตัวอย่างดิน	41
ภาคผนวก ข: ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช คน และสัตว์	48

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	6
ตารางที่ 2	9
ตารางที่ 3	23
ตารางที่ 4	25-32
<b>ตารางภาคผนวก</b>	
ก1	43-48
ข1	50-59

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินบริเวณเขื่อนสิริกิติ์จากการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง	17
รูปที่ 2 ค่าพีเอชในตัวอย่างดินบริเวณเขื่อนสิริกิติ์จากการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง	17
รูปที่ 3 ค่าอุณหภูมิในตัวอย่างดินบริเวณเขื่อนสิริกิติ์จากการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง	17
รูปที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสิตที่แยกจากดินบนอาหาร SCA	18
รูปที่ 5 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรค คน สัตว์ พืช ของเชื้อแอคติโนมัยสิต ด้วยวิธี perpendicular streak technique	19
รูปที่ 6 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชด้วยวิธี Dual culture techniques	20
รูปที่ 7 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อปฏิปักษ์แอคติโนมัยสิตที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา	21
รูปที่ 8 จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสิตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียและ เชื้อราสาเหตุโรคพืช	21
รูปที่ 9 จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสิตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียและ เชื้อราสาเหตุโรคคน-สัตว์	22
รูปที่ 10 การทำ incline slide culture technique	24
รูปที่ 11 ชนิดของ 2,6-diaminopimelic acid (DAP) ของเชื้อแอคติโนมัยสิตโดย วิธี thin layer chromatography	33

## คำอธิบายคำย่อ

SCA	หมายถึง Starch casein agar
ISP2	หมายถึง International <i>Streptomyces</i> Project medium 2
Aac	หมายถึง <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
DAP	หมายถึง diaminopimelic acid