ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยแอคติโนมัยสีทหายาก

Efficiency of Rare Actinomycetes on Pathogenic Microorganism Inhibition

เอกฉัตร ปลงจิตต์[1] อานนท์ เรียงหมู่[2] และกัญญา สอนสนิท[1*]

[1]สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
[2]ศูนย์วิจัยเพื่อการพัฒนาพืชเกษตรหลักนครปฐม สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
**jkanya@windowslive.com*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทหายากจากดินที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งเชื้อก่อโรคในคน สัตว์ และพืช ซึ่งจากตัวอย่างดิน 13 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแอคติโนมัยสีทได้จำนวน 242 ไอโซเลต เมื่อนำมาจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทหายากโดยการศึกษาลักษณะสปอร์ พบว่ามีแอคติโนมัยสีทหายากจำนวน 58 ไอโซเลต 6 สกุล เมื่อนำแอคติโนมัยสีทหายากมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี agar overlay พบว่ามีแอคติมัยสีทหายากจำนวน 6 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทดสอบได้ โดยไอโซเลต CHI11 สามารถยับยั้งเชื้อ S. aureus ได้ดีที่สุด ไอโซเลต WI11 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลากหลายชนิด ได้แก่ S. aureus , B. cereus, B. subtilis, Salmonella sp. *และ C. lipolytica และมีเพียงไอโซเลต WI8 และ WI11 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช Phytophthora* sp. *และ Pythium* sp.

คำสำคัญ: แอคติโนมัยสีทหายาก สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ บริเวณยับยั้ง จุลินทรีย์ก่อโรค

Abstract

This research aims to isolate and screen of bioactive compounds producing Rare Actinomycetes from different soil samples to inhibit human, animal and plant pathogens. A total of 242 actinomycetes were isolated from 13 soil samples. The 58 isolates from 6 genus which were classified to Rare Actinomycetes by characteristics of spores. Biological activity screening by agar overlay method showed that 6 isolates could inhibited of Pathogens growth. The results revealed that the highest inhibition activity against S. aureus was found in Isolate CHI11. Isolate WI11 was able to inhibit the growth of many pathogenic microorganisms including S. aureus, B. cereus and B. subtilis, Salmonella sp. *and C. lipolytica. While the isolate WI8 and WI11 showed the inhibition zone of the plant pathogens; Phytophthora* sp. *and Pythium* sp.

Keywords: rare actinomycetes, bioactive compounds, inhibition zone, pathogenic microorganisms

1. บทนำ

แอคติโนมัยสีท (actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย โดยส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นเส้นสายแตกแขนงและมีการสร้างเส้นใย สปอร์ได้จะคล้ายกับเชื้อรา แต่ขนาดของโคโลนีจะมีขนาดเล็กไม่แผ่ลาม มีลักษณะคล้ายยางพาราฝังตัวแน่นผิวหน้าอาหาร เชื้อในกลุ่มนี้มีความสำคัญในระบบนิเวศและมีบทบาทต่อความอุดมสมบูรณ์ของดินนิเวศวิทยาของแอคติโนมัยสีท (พงศ์ระวี นิ่มน้อย, 2558) สภาพดินที่พบเชื้อแอคติโนมัยสีทเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน นอกจากจะพบในดินที่เป็นสภาพธรรมชาติแล้วยังจะพบในกองปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิสูงมาก ในโคลน แม่น้ำ และใต้ทะเลสาบ เชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบกระจายในธรรมชาติโดยส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* ซึ่งมีมากถึง 70 – 90% (ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล, 2546) ในดินทั่วไปแอคติโนมัยสีทจะมีจำนวนใกล้เคียงกับแบคทีเรีย แต่ถ้าในดินที่มีสภาพที่เป็นด่างจะพบแอคติโนมัยสีจำนวนมากกว่า เช่น ดินที่มี pH 6.5-8 จะมีจำนวนสูงถึง 95% แต่ในดินมี pH เป็นด่างนั้นทั่วไปจะพบประมาณ 10 - 70% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอคติมัยสีท เช่น บริเวณทุ่งหญ้าธรรมชาติและทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ เป็นต้น แต่ในดินที่ทำการเกษตรจะพบน้อยและจะไม่ค่อยพบในดินที่ค่อนข้างเป็นกรด (กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน, 2555: 13) นอกจากเชื้อกลุ่ม *Streptomyces* แล้วยังมีแอคติโนมัยสีท ชนิดอื่น ๆ ซึ่งจัดเป็น แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่หายาก (rare actinomycetes) คือ แอคติโนมัยสีทนอกเหนือจากสกุล *Streptomyces* เช่น *Actinomadura, Actinoplanes, Microbispora* และ *Micromonospora* เป็นต้น (Nagwa A. Abd-Allah et al., 2012) สาเหตุที่จำแนกเป็นแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่หายากเนื่องจากมีปริมาณน้อยและเจริญช้า แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่หายากเป็นแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและเอนไซม์ชนิดใหม่ได้ (ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล, 2546) สารเมแทบอไลท์จากจุลินทรีย์เป็นแหล่งของยาชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งมีมากกว่า 5,000 ชนิด จากแบคทีเรีย และเชื้อรา แต่มีเพียงประมาณ 100 ชนิดที่ถูกนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์เพื่อรักษาโรคมนุษย์ สัตว์ และพืช (P. Saravana Kumar et al., 2014) แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่หายาก 15.1% ถ้าพิจารณาเฉพาะสารต่อต้านจุลชีพที่มีอยู่ประมาณ 8,000 ชนิด จะพบการสร้างจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่หายากได้ 16% (นุกูล อินทระสังขา และชัยสิทธิ์ นิยะสม, 2555) แล้วยังสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่หลายชนิดที่ทับถมในดินซึ่งย่อยสลายยาก เช่น ไคติน เซลลูโลส และลิกนิน เป็นต้น ซึ่งในแต่ละปีจะมีการพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากแอคติโนมัยสีทหายากสายพันธุ์ใหม่เสมอ (Olga Genilloud, 2018)

ในการวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการคัดแยกแอคติโนมัยสีทที่หายากจากดินแหล่งต่าง ๆ ในธรรมชาติซึ่งในประเทศไทยยังมีการศึกษากันน้อย รวมทั้งตรวจสอบความสามารถในสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคคน สัตว์ และพืช เพื่อนำไปศึกษาและประยุกต์ใช้ในอนาคตต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อคัดแยกแอคติโนมัยสีทหายากจากแหล่งธรรมชาติและศึกษาคุณสมบัติการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่าง ๆ

3. วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งธรรมชาติ ได้แก่ สวนมะพร้าว สวนยางพารา ชายหาดชุมพร กอไผ่ ตะกอนใต้น้ำ จอมปลวก เขื่อนอำเภอทองผาภูมิ ป่าชายเลน รอบต้นตะไคร้ โคลนบัว และแปลงเกษตร GAP โดยเก็บตัวอย่างดิน 3 – 5 จุด แยกเอาหน้าดินชั้นบนซึ่งอินทรียวัตถุยังไม่สลายตัวออกก่อน ใช้เครื่องมือในการเก็บตัวอย่างที่สะอาดเก็บลึกไม่เกิน 15

เซนติเมตร นำดินที่เก็บจากจุดต่าง ๆ ในแปลงย่อยมารวมและคลุกเคล้าให้เข้ากัน แผ่บนกระดาษหรือแผ่นผ้าพลาสติก ผึ่งให้ดินแห้งในที่ร่ม จนกระทั่งดินแห้ง บดดินให้ละเอียด และร่อนผ่านตะแกรง เก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก ระบุแหล่งที่เก็บดินไว้

3.2 การแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจากดิน

นำดินตัวอย่างที่เตรียมไว้มาเตรียมตัวอย่างดินที่ด้วยวิธีการ pre-treatment โดยอบดินที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Hayakawa et al., 1991 and Tamura et al.,1997) จากนั้นเจือจางตัวอย่างดินจนได้ระดับความเจือจาง 10^{-1} – 10^{-3} เท่า ด้วยสารละลาย 0.86%(w/v) NaCl (NSS) คัดแยกแอคติโนมัยสีทโดยนำมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ spread plate technique บนอาหาร Starch casein agar (Kingchan Malisorn and Kanokwan Nikhome, 2014) และ Zhang'Starch Soil Extract Agar (Jinhua Zhang, 2011) ที่มี cycloheximide 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล, 2546) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ คัดแยกโคโลนีแอคติโนมัยสีทมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ cross streak บนอาหาร ISP2 agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7- 14 วัน

3.3 การจัดจำแนกชนิดกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่หายาก

นำแอคติโนมัยสีทหายากที่คัดแยกได้มาศึกษาลักษณะของสปอร์บนอาหาร ISP2 agar ด้วยวิธี slide culture technique (กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน, 2555) โดยตัดขนาดชิ้นวุ้นขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร ใช้ loop ฆ่าเชื้อ เตะเชื้อลงมุมชิ้นวุ้นทั้ง 4 ด้าน แล้วปิดด้วย Cover Glass ที่ฆ่าเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-14 วัน ศึกษาและบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยารูปร่างของสปอร์ที่สร้างโดย aerial mycelium โดยการ wet mount ด้วยน้ำยา lactophenol cotton blue เปรียบเทียบกับหนังสือ Bergey's manual (Michael Goodfellow et al., 2012) และ Atlas of actinomycetes (The society for actinomycetes Japan, 1997)

3.4 คัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่หายากที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรค

3.4.1 คัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่หายากที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรค

การทดสอบความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรคคนและสัตว์ ด้วยวิธีการราดทับ (agar overlay) (ปวีณา สุขสะอาด และคณะ, 2555) เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากเลี้ยงบนอาหาร ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 วัน จากนั้นใช้ Cock borer ขนาด 0.6 เซนติเมตร เจาะและย้ายชิ้นวุ้นเชื้อแอคติโนมัยสีวางบนอาหาร ISP2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน เตรียมซัสเพนชั่นจุลินทรีย์ทดสอบโดยการปรับความขุ่นด้วย NSS เท่ากับ McFarland 0.5 แล้วดูดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมลงในอาหาร NA agar กึ่งแข็ง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทราดทับโคโลนีแอคติมัยสีทหายาก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

3.4.2 การทดสอบความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืชโดยวิธี Dual culture technique (M. A. Rahman et al., 2009) โดยเลี้ยงแอคติโนมัยสีทหายากบนอาหาร ISP2 agar นำไปบ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cock borer ขนาด 0.6 เซนติเมตร เจาะและใช้เข็มเขี่ยเชื้อย้ายชิ้นวุ้นแอคติโนมัยสีท ลงบนอาหาร PDA agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน และเพาะเลี้ยงเชื้อราก่อโรคพืช บนอาหาร PDA agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้วใช้ Cock borer ขนาด 0.6 เซนติเมตร เจาะและใช้เข็มเขี่ยเชื้อย้ายชิ้นวุ้นที่เจาะของเชื้อราก่อโรคพืช ลงเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA agar ที่มีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่บ่มไว้ก่อน โดยว่างห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 2 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการยับยั้งและจากนั้นนำมาหาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเชื้อราก่อโรคพืช ดังสมการที่ (1)

$$\%Inhibition = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100 \quad (1)$$

โดย R1 หมายถึง รัศมีโคโลนีของเชื้อราก่อโรคพืช control , R2 หมายถึง รัศมีโคโลนีเชื้อราก่อโรคพืชถูกการยับยั้ง

4. ผลการวิจัย

4.1 ผลการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากจากดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งธรรมชาติ ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง ได้แก่ สวนมะพร้าว สวนยางพารา ดินชายหาดชุมพร ดินบริเวณรอบกอไผ่ ตะกอนใต้น้ำ จอมปลวก ดินแดงเชื่อนอำเภอทองผาภูมิ ปุ๋ยหมัก โคลนป่าชายเลน ดินบริเวณรอบต้นตะไคร้ ดินโคลนใต้บัว และแปลงเกษตร GAP คัดแยกได้เชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด 242 ไอโซเลต รายละเอียดดังตารางที่ 1

4.2 การจัดจำแนกชนิดกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่หายาก

จากการจัดจำแนกสกุลเพื่อหาแอคติโนมัยสีทหายากโดยศึกษาลักษณะรูปแบบการสร้างสปอร์ ซึ่งสามารถจำแนกแอคติโนมัยสีทที่หายากได้ 6 สกุล จำนวน 60 ไอโซเลต คิดเป็นอัตราส่วนร้อยละ 25 จากจำนวนแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่คัดแยกได้ ดังภาพที่ 1 โดยสกุลที่พบได้แก่ สกุล *Actinomadura* 19 ไอโซเลต สกุล *Micromonospora* 16 ไอโซเลต สกุล *Nocardia* 11 ไอโซเลต สกุล *Microbispora* 9 ไอโซเลต สกุล *Dactlosporangium* 3 ไอโซเลต และสกุล *Pilimelia* 1 ไอโซเลต มีลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ดังภาพที่ 2

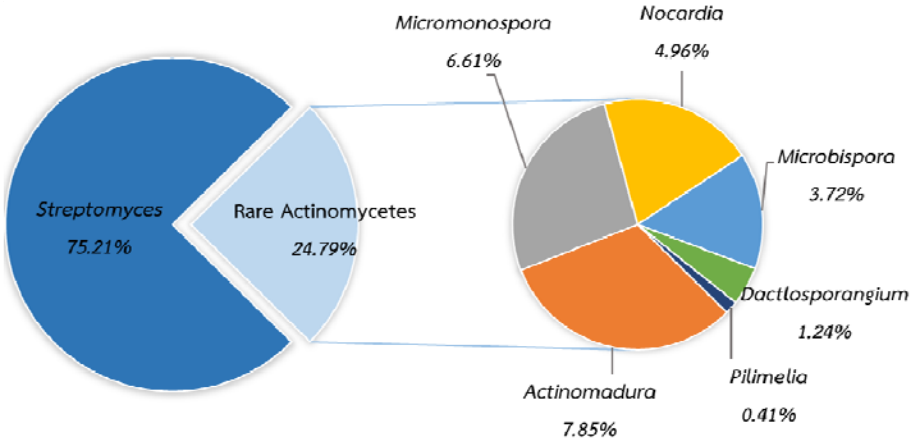
ตารางที่ 1 รายละเอียดของตัวอย่างดิน จำนวนไอโซเลตแอคติโนมัยสีทและจำนวนไอโซเลตแอคติโนมัยสีทหายากที่คัดแยกได้

ตัวอย่างดิน	สถานที่	จำนวนไอโซเลตทั้งหมด	จำนวนไอโซเลตแอคติโนมัยสีทหายาก
ดินสวนมะพร้าว (CI)	ประจวบคีรีขันธ์	29	0
ดินสวนยางพารา (RI)	ประจวบคีรีขันธ์	43	2
ดินจอมปลวก (TI)	ประจวบคีรีขันธ์	5	1
ดินโคลนป่าชายเลน (HLI)	ประจวบคีรีขันธ์	4	4
ดินชายหาดชุมพร (CHI)	ชุมพร	24	10
ดินแดงใต้ต้นไม้ (WI)	กาญจนบุรี	11	10
ดินบริเวณรอบกอไผ่ (BI)	นครปฐม	39	5
ดินตะกอนใต้น้ำ (SI)	นครปฐม	10	6
ดินกองปุ๋ยหมัก (FI)	นครปฐม	55	18
ดินต้นตะไคร้ (KI)	นครปฐม	2	1
ดินโคลนบัว (LI)	นครปฐม	3	1
ดินแปลงเกษตร GAP (GAP)	นครปฐม	16	2
รวม		**242**	**60**

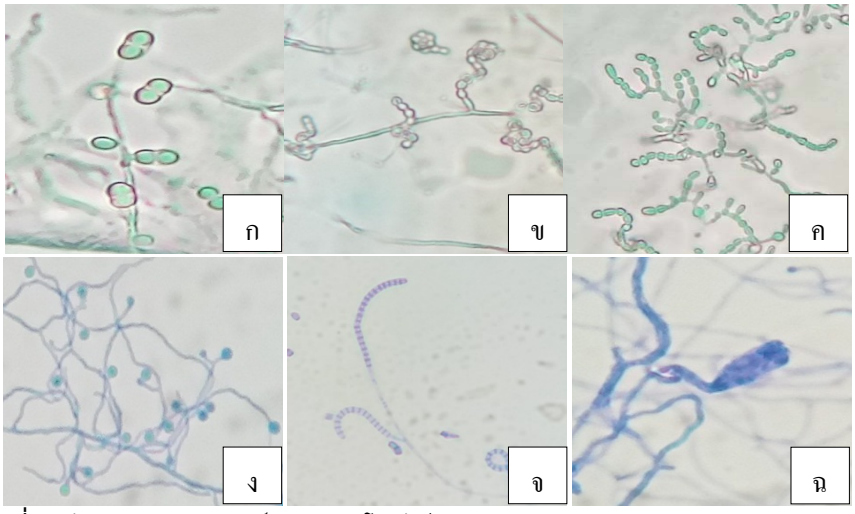
4.3 ทดสอบเชื้อแอคติโนมัยสีทที่หายากที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรค

จากการศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยสีทหายากที่จำแนกได้ทั้ง 60 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อก่อโรคในคนและสัตว์ ได้แก่ *S. aureus*, *Salmonella* sp., *B. subtilis* และ *C. lipolytica* เชื้อก่อโรคพืช ได้แก่ *Phytophthora* sp. และ *Pythium* sp. พบว่าแอคติโนมัยสีทหายากที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ทั้งหมด 21

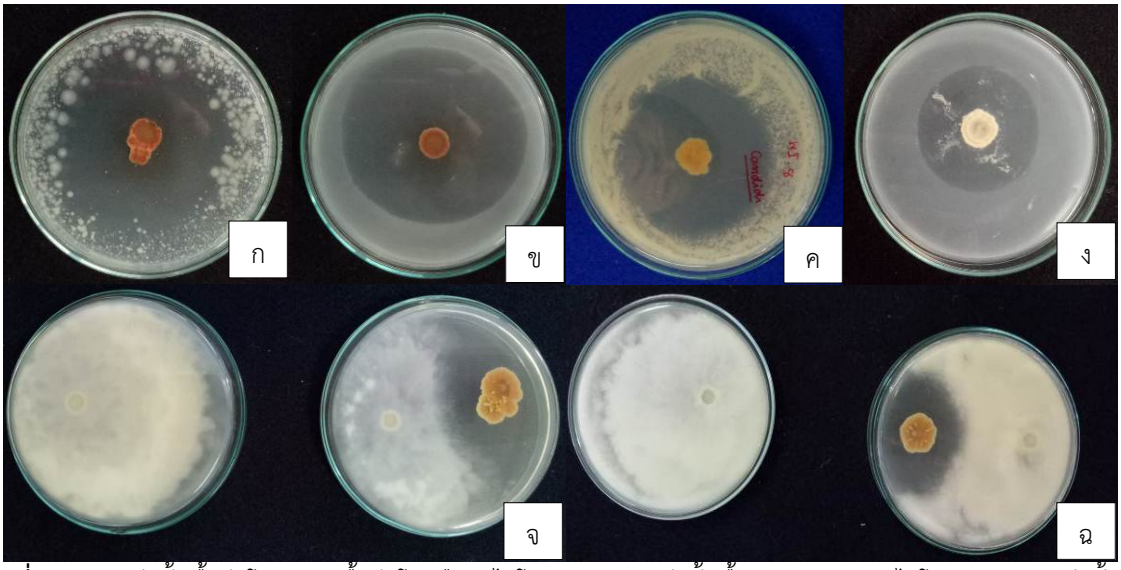
ไอโซเลต แต่ละไอโซเลตมีความสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน (ตารางที่ 2) โดยไอโซเลต WI11 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้หลายกลุ่ม ได้แก่ แกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ ไอโซเลต WI8 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบแกรมบวกบางตัว ยีสต์ และราได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแกรมลบได้ ไอโซเลต FI15 และ HLI5 สามารถยังยั้ง *S. aureus* ได้เพียง 1 ชนิด และไอโซเลต CHI2, BI8 และ SI10 สามารถยังยั้ง *B. cereus* ได้เพียง 1 ชนิด



ภาพที่ 1 ร้อยละของสกุลแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้



ภาพที่ 2 ลักษณะรูปแบบสปอร์ของแอคติโนมัยสีทหายาก ก สกุล *Microbispora* ข สกุล *Nocardia* ค สกุล *Actinomadura* ง สกุล *Micromonospora* จ สกุล *Dactylosporangium* ฉ สกุล *Pilimeli*



ภาพที่ 3 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค และเชื้อก่อโรคพืช ก ไอโซเลต CHI11 ยับยั้งเชื้อ *B .cereus* ข ไอโซเลต CHI11 ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ค ไอโซเลต WI8 ยับยั้งเชื้อ *C. lipolytica* ง ไอโซเลต WI11 ยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp. จ ไอโซเลต WI8 ยับยั้งเชื้อ *Phytophthora* sp. ฉ ไอโซเลต WI8 ยับยั้งเชื้อ *Pythium* sp.

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยแอคติโนมัยสีทหายาก

รหัส	ขนาดโซนยับยั้ง (มม.)				เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	
	S. aureus	*B. cereus*	*Salmonella* sp.	*C. lipolytica*	*Phytophthora* sp.	*Pythium* sp.
RI34	3.5±0.7	3±0	NI	NI	NI	NI
TI2	8.5±2.1	10.5±0.7	NI	NI	NI	NI
CHI2	NI*	5.3±0.7	NI	NI	NI	NI
CHI9	22±0	19.5±0	NI	NI	NI	NI
CHI10	5±0	5±0	5.75±0.3	6.5±0.7	NI	NI
CHI11	28±1.4	21±0	NI	6±0	NI	NI
CHI15	17.75±0.3	17±0	NI	NI	NI	NI
WI4	4.7±0.3	9.5±0.7	NI	NI	NI	NI
WI8	12.5±0.7	NI	NI	22.5±0.7	79±1.41	47±4.24
WI11	15.5±0.7	12.5±2.1	18.5±0.7	4.5±0.7	73±4.24	51±1.41
BI6	9±0	13.5±0.7	NI	NI	NI	NI
BI8	NI	1.5±0	NI	NI	NI	NI
SI10	NI	4.5±0.7	NI	NI	NI	NI
FI1	8.5±0.7	18.5±0.7	NI	NI	NI	NI
FI5	12.25±0.3	2.25±0.3	NI	NI	NI	NI
FI15	6.5±0.7	NI	NI	NI	NI	NI
FI16	2.5±0.7	4±0	NI	NI	NI	NI
FI22	14.5±0.7	16.5±0.7	NI	NI	NI	NI
FI32	2±0	3.5±0.7	NI	NI	NI	NI
HLI5	12±0	NI	NI	NI	NI	NI
GAP6	4±0	14.5±2.1	NI	NI	NI	NI

***** NI = not inhibited

5. อภิปรายผลการวิจัย

จากการคัดแยกและจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทหายากพบว่า สามารถคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากดิน 13 ตัวอย่าง ได้เชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด 242 ไอโซเลต และจัดจำแนกเป็นแอคติโนมัยสีทหายากได้ 60 ไอโซเลต คิดเป็น 24.79 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งใกล้เคียงกับ Ramesh Subramani และ William Aalbersberg (2013) ประกอบด้วย 6 สกุล ได้แก่ สกุล *Actinomadura* 18 ไอโซเลต สกุล *Micromonospora* 16 ไอโซเลต สกุล *Nocardia* 11 ไอโซเลต สกุล *Microbispora* 9 ไอโซเลต สกุล *Dactylosporangium* 3 ไอโซเลต และสกุล *Pilimelia* 1 ไอโซเลต โดยพบว่าตัวอย่างดินจากกองปุ๋ยหมักแอคติโนมัยสีทหายากมากที่สุด 18 ไอโซเลต จากแอติโนมัยสีททั้งหมดจากตัวอย่างดินปุ๋ยหมัก 56 ไอโซเลต ซึ่งดินกองปุ๋ยหมักเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อแอคติโนมัยสีทนี้เป็นดินที่มีกิจกรรมการย่อยสลายสูง อุณภูมิสูง และสารอาหารต่ำ ความเป็นกรดสูง จึงเป็นการกำจัดจุลินทรีย์กลุ่มอื่นไปด้วย (A.L.M. Low et al., 2015) แอคติโนมัยสีทที่พบส่วนใหญ่เป็นสกุล *Actinomadura, Nocadia* และ *Microbispora* พบ *Micromonospora* เพียงเล็กน้อย ขณะที่ดินตะกอน และดินป่าชายเลนพบ *Micromonospora* เป็นส่วนมาก สอดคล้องกับ Hatano K. (1997) ซึ่งพบมากในน้ำน้ำทะเล ป่าชายเลน และดินตะกอน

เมื่อนำเชื้อแอคติมัยสีทหายากมาทดสอบความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี agar overlay จากแอคติโนมัยสีทหายากทั้งหมด 60 ไอโซเลต ผลการวิจัยพบว่ามีแอคติโนมัยสีทหายาก จำนวน 21 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ โดยพบว่าทั้ง 21 ไอโซเลต หรือ 35% สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ สอดคล้องกับรายงานของลลิดา วชังเงิน (2554) แต่พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อราได้ ในขณะที่ยีสต์นั้นพบว่ามี 4 ไอโซเลตที่สมารถยับยั้งได้ เชื้อแอคติโนมัยสีทหายากที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคต่างๆ เช่น ไอโซเลต CHI11 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *B. cereus* ซึ่งเป็นเชื้อแกรมบวกได้ดีที่สุด 28±1.4 และ 21±0 มิลลิเมตร ตามลำดับ และมีเพียงไอโซเลต CHI10 และ WI11 ที่สามรถยับยั้ง *Salmonella* sp. ได้ อีกทั้งไอโซเลต WI11 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายกลุ่ม ความสามารถยับยั้งที่แตกต่างกันเนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างขึ้นมีผลต่อองค์ประกอบสำคัญของเซลล์จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน (Lahcen OUCHARI et al., 2018)

จากการทดลองความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทหายาก ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช 2 ชนิด ด้วยวิธี dual culture ได้แก่ *Phytophthora* sp. และ *Pythium* sp. โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้เกณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา จากสูตรคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ผลจากการศึกษาพบว่ามีเพียงไอโซเลต WI8 และ WI11 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Phytophthora* sp. พอใช้ และยับยั้งเชื้อ *Pythium* sp. ได้ดี

6. สรุปผลการวิจัย

จากตัวอย่างดิน 13 ตัวอย่าง สามารคัดแยกเชื้อแอคติมัยสีทได้ทั้งหมด 242 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นแอคติโนมัยสีทหายากได้ 60 ไอโซเลต พบว่ามี 6 สกุล จากนั้นคัดเลือกแอคติโนมัยสีทหายากที่ความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 21 ไอโซเลต โดยไอโซเลต CHI11 มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีที่สุด ไอโซเลต WI11 นั้นมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อแกรมลบได้ดีที่สุดและยังสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคได้ทุกกลุ่มที่ทดสอบ แต่มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *C. lipolytica* และ *Phytophthora* sp. ต่ำกว่าไอโซเลต WI8

7. ข้อเสนอแนะ

นำผลการวิจัยไปต่อยอดโดยนำแอคติโนมันสีทหายากที่มีประสิทธิภาพสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ นำไปจัดจำแนกสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมจากสถาบันที่น่าเชื่อถือและได้มาตรฐาน และควรศึกษาเพื่อวิเคราะห์ จำแนกกลุ่มและชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อผลิตขึ้น เพื่อนำไปสู่การวิจัยขั้นต่อไปและการใช้ประโยชน์ในอนาคต

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณที่ปรึกษาโครงการวิจัยและเจ้าหน้าที่สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม และศูนย์วิจัยเพื่อการพัฒนาพืชเกษตรหลักนครปฐม ที่ให้ความรู้คำแนะนำส่งผลให้โครงการวิจัยสำเร็จด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน. (2555). **ความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในดิน**. อุดรธานี: มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล. (2546). **เชื้อแอคติโนมัยสีทที่หายากในดินจากพื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกราช และไร่สุวรรณ จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย**. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปวีณา สุขสะอาด กรรณิกา ดวงมาลย์ ชัยวัฒน์ กิตติกูล กันทิมาณี ประเดิมวงศ์ และวสุ ปฐมอารีย์. (2555). **แอคติโนมัยสีทจากดินนาเกลือและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ**. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50 : สาขาวิทยาศาสตร์, สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ, 164-171.

ลลิดา วชังเงิน. (2554). **การคัดกรองและการพิสูจน์เอกลักษณ์แอคติโนมัยสีทหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

นุกูล อินทระสังขา และชัยสิทธิ์ นิยะสม (2555). **การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง**. พัทลุง: มหาวิทยาทักษิณ.

พงศ์ระวี นิ่มน้อย. (2558). **แอคติโนมัยสีท.** (พิมพ์ครั้งที่1). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

A.L.M. Low, S.A.S. Mohamad and M.F.F. Abdullah. (2015). Taxonomic Diversity and Antimicrobial Activities of Actinomycetes from Manure Composts. **Res. J. Microbiol**, 10 (11), 513-522.

Hatano, K. (1997). Actinomycetes Population in mangrove rhizosphere. **IFO Res. Comm**., 18, 26-31.

Hayakawa M, Kajiura T and Nonomura H. (1991). New methods for the highly selective isolation of Streptosporangium and Dactylosporangium from soil. **J Ferment Bioeng**, 72, 327–333.

Jinhua Zhang. (2011). Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes. **Modern Applied Science**, 5 (2), 124-127.

Kingchan Malisorn and Kanokwan Nikhome. (2014). Isolation and Screening of Actinomycetes from Soil for their Enzymatic and Antifungal activity. **Khon Kaen Agricultural Journal**, 42 (4), 151-156.

Lahcen OUCHARI, Amal BOUKESKASSE, Brahim BOUIZGARNE and Yedir OUHDOUCH. (2018). Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from the unexplored hot Merzouga desert and their taxonomic diversity. **Biology Open**, 18, 1-7.

M. A. Rahman, M. F. Begum and M. F. Alam. (2009). Screening of Trichoderma Isolates as a Biological Control Agent against Ceratocystis paradoxa Causing Pineapple Disease of Sugarcane. **Mycobiology**, 37 (4), 277-285.

Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha E. Trujillo, Ken-ichiro Suzuki, Wolfgang Ludwig and William B. Whitman. 2012. **Bergey's manual of Systematic Bacteriological second edition. Volume five** : The Actinobacteria, Part A.

Nagwa A. Abd-Al lah, Sahar M. Tolba and Dina M. Hatem. (2012). Selective Isolation of Rare Actinomycetes from Different types of Egyptian Soil. **Egypt. J. Exp. Biol**., 8 (2), 175 – 182.

Olga Genilloud. (2018). Mining Actinomycetes for Novel Antibiotics in the Omics Era: Are We Ready to Exploit This New Paradigm. **Antibiotics**, 7 (4), 1-13

P. Saravana Kumar, V. Duraipandiyan, and S. Ignacimuthu. (2014). Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. **KJMS.,** 30, 435-446.

Ramesh Subramani and William Aalbersberg. (2013). Culturable rare Actinomycetes : diversity, isolation and marine natural product discovery. **Appl Microbiol Biotechnol**, 97 (21), 9291–9321

Tamura, T., Hayakawa, M. & Hatano, K. (1997). A new genus of the order Actinomycetales, Spirilliplanes gen. nov., with description of *Spirilliplanes yamanashiensis* sp. nov. **IJSEM.** 47, 97–102.

The society for actinomycetes Japan. (1997). **Atlas of actinomycetes**. Japan: Asakura Publishing Co., Ltd.