Thai J. For. 34 (2) : 51-61 (2015) **วารสารวนศาสตร์ 34 (2) : 51-61 (2558)**

นิพนธ์ต้นฉบับ

ศักยภาพด้านชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินป่าชายเลนจังหวัดสตูล

Biological Potentials of Actinomycetes Isolated from Mangrove Soils in Satun Province

ทายาท ศรียาภัย[1*] **Thayat Sriyapai[1*]**
พิชาภัค ศรียาภัย[2] **Peechapack Sriyapai[2]**
กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์[1] **Kun Silprasit[1]**
อรินทม์ งามนิยม[1] **Arin Ngamniyom[1]**
วิรงรอง ดวงใจ[1] **Wirongrong Duangjai[1]**

[1]คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
Faculty of Environmental Culture and Ecotourism, Srinakharinwirot University
[2]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
Faculty of Science, Srinakharinwirot University
[*]Corresponding Author, E-mail: Thayat@g.swu.ac.th

รับต้นฉบับ 14 สิงหาคม 2557 รับลงพิมพ์ 30 กันยายน 2557

ABSTRACT

The objectives of this study were to examine the biological potentials of actinomycetes isolated from soil samples of mangrove forest, and to isolate potential actinomycetes for producing of enzyme and anti-bacterial or anti-fungal compounds that occurred in agricultural sector. Out of ninety actinomycete strains, proportion of isolated actinomicetes as 14 (15.5%), 14 (15.5%), 18 (20.0%) and 2 (2.2%) strains produced high amounts of proteinase, xylanase, CMCase and avicelase, respectively. Furthermore, 10 (11.1%) strains also inhibited of plant pathogens. These strains were identified by using 16S rDNA sequencing analysis. Nine strains were identified as the genus *Streptomyces*, only one strain was identified as the genus *Micromonospora*. The results indicated that the actinomycetes strains found in the mangrove soils are potential sources of enzyme and anti-bacterial or anti-fungal compounds. However, further studies in characteristics of enzymes and their biological potentials would be useful for applying in other sectors.

Keywords: Actinomycetes, Enzyme, Bioactive compounds, Mangrove forest

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพด้านชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินป่าชายเลน เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์และการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชทั้งเชื้อราและ

เชื้อแบคทีเรียในภาคเกษตรกรรม จากผลการทดลองสามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้จำนวน 90 สายพันธุ์ โดยเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 14 (15.5 %), 14 (15.5 %), 18 (20.0 %) และ 2 (2.2%) สายพันธุ์ แสดงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเนส ไซแลนเนส ซีเอ็มซีเอส และอาวิเซลเลส ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 10 ไอโซเลท (11.1%) สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้ ผลการระบุชนิดโดยใช้ลำดับเบสของยีนในช่วง 16S rDNA พบเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 9 สายพันธุ์ เป็นสกุล *Streptomyces* และอีกจำนวน 1 สายพันธุ์เป็นสกุล *Micromonospora* สรุปได้ว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากป่าชายเลนนี้เป็นเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์และการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการศึกษาต่อยอดในเรื่องคุณสมบัติของเอนไซม์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ต่อไป

คำสำคัญ: แอคติโนมัยสีท เอนไซม์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ป่าชายเลน

คำนำ

ประเทศไทยมีทรัพยากรธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ และทรัพยากรดินถือได้ว่าเป็นแหล่งกำเนิดสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติ ดินเกิดจากการสลายพุพังของหินนานาชนิดใช้เวลานานนับร้อยปี ในการถูกย่อยสลาย และผู้ย่อยสลายตามธรรมชาติก็คือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กจำนวนมากมายที่อาศัยอยู่ในดิน โดยเฉพาะจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กชนิดหนึ่งที่มีหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายทั้งซากพืชซากสัตว์ที่มีความหลากหลายทั้งทางชนิดพันธุ์และระบบนิเวศ ดังนั้นจุลินทรีย์ในดินจึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงความอุดมสมบูรณ์ของดินและระบบนิเวศโดยรอบได้ นอกจากนี้ยังพบว่าดินป่าชายเลนมีความอุดมสมบูรณ์สูงและมีความหลากหลายทางชีวภาพทั้งชนิดของสัตว์และจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก เนื่องจากผลผลิตซากพืชทับถมเป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังเป็นระบบนิเวศที่เชื่อมต่อระบบนิเวศทางบกและทางทะเลซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการดำรงชีวิตมนุษย์ (Montonphetch *et al*., 2013) อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายและศักยภาพการในสร้างสารชีวภาพของเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยสีทจากดินป่าชายเลนในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาความหลากหลายและการนำมาใช้ประโยชน์ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีท ซึ่งถือว่าเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่กระจายตัวอย่างมากมายในสิ่งแวดล้อม จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทในดินส่วนใหญ่เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นมากที่สุด โดยพบประชากรของเชื้อ *Streptomyces* ในดินประมาณ 96 เปอร์เซ็นต์ (Kim *et al*., 1995; Hayakawa, 2008) นอกจากนี้ยังมีอีกกลุ่มที่จัดเป็นพวก non-streptomycetes ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสีทที่หายาก และมีอยู่ประมาณ 100 สกุลที่มีความหลากหลายทางด้านรูปร่าง นิเวศวิทยา และสายวิวัฒนาการ (Miyadoh, 1997) เช่น *Micromonospora*, *Microtetraspora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Dectylosporangium* และ *Actinoplanes* (Hayakawa, 2008)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมามีการศึกษาแอคติโนมัยสีทเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อาทิเช่น ด้านการแพทย์และเภสัชกรรมได้มีการค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ (Lazzarini *et al*., 2001) เพื่อใช้ต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ตลอดจนใช้เพื่อผลิตสารต้านมะเร็งและสารกดระบบภูมิคุ้มกัน (Watve *et al*., 2001) ในด้านอุตสาหกรรมได้ศึกษากลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ในการช่วยย่อยสลายอินทรียวัตถุในธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการย่อยสลายส่วนประกอบของพืชและสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลาย เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และไคติน ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากแอคติโนมัยสีทสำหรับผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม เช่น การใช้แอคติโนมัยสีท สกุล *Streptomyces* ผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลส และเอนไซม์ไซแลน

เนสสำหรับการย่อยสลายไซแลน ซึ่งเอนไซม์สามารถทำงานที่อุณหภูมิสูงเพื่อประโยชน์ในการผลิตน้ำตาลกลูโคส และไซโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีราคาถูก (Sunna and Antranikian, 1997; Sukumaran *et al*., 2005) ในทางการเกษตรมีการใช้แอคติโนมัยสีทในการผลิตสารฆ่าแมลง และสารฆ่าวัชพืช เช่นการใช้แอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* ในการควบคุมศัตรูพืชและควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชที่เกิดกับรากและเมล็ด (Jeffrey *et al*., 2007) ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยและค้นพบว่าแอคติโนมัยสีทสามารถต่อต้านเชื้อราที่ก่อโรคที่อยู่ในดิน ซึ่งการค้นพบนี้จึงอาจนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชได้ในอนาคต จากการค้นพบข้างต้นทำให้แอคติโนมัยสีทจึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณประโยชน์ต่อวงการแพทย์และยา เกษตรกรรมและอุตสาหกรรม รวมถึงต่อวัฏจักรของระบบนิเวศ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและระบุชนิดของแอคติโนมัยสีทจากดินป่าชายเลนในจังหวัดสตูลที่เป็นป่าชายเลนอนุรักษ์และป่าชายเลนชุมชนเพื่อรวบรวมเป็นข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพป่าชายเลน นอกจากนั้นยังทดสอบความสามารถของเชื้อที่แยกได้ในการผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายสารชีวโมเลกุลที่พบในธรรมชาติและความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งเป็นเครื่องบ่งชี้ให้เห็นบทบาทของเชื้อกลุ่มนี้ในระบบนิเวศและพัฒนาเป็นแหล่งของเอนไซม์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับการประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การตรวจนับและแยกเชื้อแบคทีเรียแอคติโนมัยสีทจากดินป่าชายเลน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลนในจังหวัดสตูล 3 แหล่ง แหล่งละ 10 ตัวอย่าง ได้แก่ บริเวณป่าชายเลนชุมชนบ้านโคกพะยอมพิกัด โซน 47 (N590009.85, E753076.34) ป่าชายเลนชุมชนบ้านท่าน้ำเค็มใต้พิกัดโซน 47 (N608189.69,E749638.04) และป่าชายเลนชุมชนบ้านหัวทาง พิกัด โซน 47 (N620325.34, E73068.40) โดยใช้พลั่วตักดินขุดลึกจากผิวดินลงไป 1-10 เซนติเมตร ใส่ในถุงพลาสติกรัดยางปากถุงให้แน่น เก็บไว้ในภาชนะที่มิดชิดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำกลับมาวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ

ขั้นตอนการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินโดยใช้วิธีการเจือจางดิน 1:10 ด้วยสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 1.5 % ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเจือจางระดับต่างๆ หลังจากนั้นเกลี่ยสารละลายที่ความเจือจางระดับต่างๆ ลงบนอาหาร Starch-Casein agar (SCA) และ Nutrient Agar (NA) บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เจริญจากตัวอย่างดิน ทำการคัดแยกและนำเชื้อแอคติโนมัยสีทบริสุทธิ์ที่แยกได้มาใช้ในการศึกษาต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียแอคติโนมัยสีท

ในการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียแอคติโนมัยสีทเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อใน NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3-4 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอตามเทคนิคที่ดัดแปลงมาจาก Marmur (1961) และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อทำการศึกษาขั้นต่อไป

การระบุชนิดแอคติโนมัยสีทในระดับสกุลโดยใช้ยีน 16S rDNA

ระบุชนิดแอคติโนมัยสีทตามหลักการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9th edition โดยอาศัยหลักสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทร่วมกับการระบุสายพันธุ์โดยอาศัยยีนบริเวณ 16S rDNA วิธีการเพิ่มจำนวนยีนบริเวณ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR เริ่มจากนำสารละลาย DNA ที่สกัดได้มาใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์เพิ่มขยายส่วนของยีน 16S rDNA โดยใช้

universal primers ที่จำเพาะต่อ small subunit ribosomal DNA ของจุลินทรีย์ (Lane, 1991) จากนั้นทำการเพิ่มขยายส่วนของยีนที่ต้องการด้วยเครื่อง PCR โดยใช้สภาวะ ดังนี้ Pre-denaturationที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียสนาน 3 นาที จำนวน 30 รอบ และ Post-extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตของยีนขนาด 1,500 เบส ด้วยเครื่อง Electrophoresis จากนั้นนำชิ้นยีน 16S rDNA ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาหาลำดับนิวคลิโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท macrogen ประเทศเกาหลี หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบดีเอ็นเอตัวอย่างขนาด 500 เบส กับลำดับยีน 16S rDNA ของจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank database และนำมาสร้างแผนภูมิพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA version 5.1

ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์

การผลิตเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทจะทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ actinomyces medium (Techapun *et al*., 2003) ที่มีการเติมซับสเตรทลงไปในอาหารได้แก่ไซแลน (xylan), คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethylcellulose, CMC), อะวิเซล (avicel) และ หางนม (skim milk) เชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์จะเห็นวงใส (clear zone) รอบๆ โคโลนี จากนั้นวัดขนาดของใสที่เกิดขึ้น โดยทำการทดลองสามซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ยของขนาดวงใส่ในหน่วยมิลลิเมตร

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โรคพืช

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Fusariumo xysporum* โดยวิธี dual plate technique เริ่มด้วยการขีดเชื้อแอคติโนมัยสีทที่จะทดสอบบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 1 เซนติเมตร บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4-7 วัน จากนั้นใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อราที่เจริญสร้างเส้นใยแล้วบนอาหาร PDAวางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อให้มีระยะห่างจากเชื้อทดสอบประมาณ 2 เซนติเมตร บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4-7 วัน ตรวจผลโดยวัดขนาดความกว้างของ Inhibition zone และวัดค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยแบคทีเรียจากขนาดการเจริญของเชื้อราด้านที่เจริญไปหาแบคทีเรีย (B) และ ขนาดของเชื้อราที่เจริญในทิศทางตรงข้าม (A) โดยใช้สูตรเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยแบคทีเรีย คือ (A-B)/A×100 โดยทำการทดลองสามซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืช *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคใบแห้ง โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลทที่ใช้ทดสอบบนอาหาร Antibiotic production medium (APM) จนกระทั่งโคโลนีเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ ใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีท วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อที่กระจายเชื้อ *X. oryzae* เรียบร้อยแล้วบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน จากนั้นตรวจผลโดยวัดขนาดความกว้างของ Inhibition zone โดยทำการทดลองสามซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ยของขนาดความกว้างของ Inhibition zone

ผลและวิจารณ์

การตรวจนับและแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท

ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินป่าชายเลนในบริเวณต่างๆ ได้แก่บริเวณป่าชายเลนชุมชนบ้านโคกพะยอม ป่าชายเลนชุมชนบ้านท่าน้ำเค็มใต้ และป่าชายเลนชุมชนบ้านหัวทางโดยทำการตรวจนับเชื้อบนอาหาร Starch-Casein agar (SCA) และ Nutrient Agar (NA) ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าดินป่าชายเลนแต่ละแหล่งมีค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบในดินป่าชายเลนบ้านโคกพะยอม

ดินป่าชายเลนบ้านน้ำเค็ม และดินป่าชายเลนบ้านหัวทาง เท่ากับ 1.1×10^8 CFU/g, 1.1×10^7 CFU/g และ 2.1×10^7 CFU/g ตามลำดับ และสามารถเชื้อแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทบริสุทธิ์ได้จำนวนทั้งสิ้น 90 สายพันธุ์ เชื้อแอคติโนมัยสีทบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในจากดินป่าชายเลนในแต่ละชุมชนจะนำมาใช้เพื่อทดสอบศักยภาพในการผลิตเอนไซม์และการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โรคพืชต่อไป

ทดสอบความสามารถในผลิตเอนไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยสีท

เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ทำการคัดแยกได้ทั้ง 90 สายพันธุ์มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารชีวโมเลกุลชนิดต่างๆ บนอาหารแข็ง ผลการทดสอบพบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสีท 14 (15.5 %), 14 (15.5 %), 18 (20.0 %) และ 2 (2.2 %) สายพันธุ์ที่แสดงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเนส ไซแลนเนส ซีเอ็มซีเอส และอาวิเซลเลส ตามลำดับโดยวัดขนาด clear zone ที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งที่มีสับสเตรทต่างๆ (Table 1) ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเชื้อแอคติโนมัยสีท รหัส MGK50 และ MGK57 ที่แยกได้จากดินป่าชายเลนบ้านโคกพะยอมแสดงศักยภาพสูงที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส จากผลของการย่อยสลายโปรตีนได้ clear zone ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 20 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรหัส MGK40 MGK53 และ MGK59 แสดงศักยภาพสูงที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส จากผลของการย่อยสลายไซแลนได้ clear zone ขนาด 20 มิลลิเมตร ในขณะที่เชื้อแอคติโนมัยสีท รหัส MGB3 MGB4 และ MGB6 ที่แยกได้จากดินป่าชายเลนชุมชนบ้านท่าน้ำเค็มใต้ และรหัส MGH13 ที่แยกได้จากดินป่าชายเลนชุมชนบ้านหัวทางสามารถแสดงศักยภาพสูงที่สุดในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากผลของการย่อยสลายเซลลูโลสชนิดที่ละลายน้ำได้ (CMC) ผลการศึกษาพบว่าเชื้อรหัส MGB3 MGB4 และ MGH13 แสดงศักยภาพสูงสุดในการย่อยสลาย CMC โดยได้ clear zone ที่มีขนาดเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามในการทดสอบศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสชนิดไม่ละลายน้ำ (avicel) พบว่ามีเพียงเชื้อรหัส MGK59 และ MGB6 ที่สามารถย่อยได้สูงสุดโดยได้ clear zone ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยมากกว่า 5 มิลลิเมตร (Table 1) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้รายงานว่ามีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง และมีองค์ประกอบของเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกันอย่างหลากหลายในปริมาณที่พอเหมาะ การศึกษากลุ่มแบคทีเรียแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากป่าชายเลนกำลังได้รับความสนใจในการเป็นแหล่งของผลิตเอนไซม์ที่มีศักยภาพสูง (Meena *et al.*, 2013) โดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* ที่ได้มีรายงานอย่างกว้างขวางมากถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในระดับสูง จนสามารถย่อยสลายองค์ประกอบภายในผนังเซลล์ของพืช เช่น วัสดุทางการเกษตรเพื่อให้ได้เป็นสารตั้งต้นเป็นน้ำตาลหลายชนิดสำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมและการเกษตรได้ (Sunna and Antranikian, 1997; Chellapandi and Jani, 2008)

Table1 Screening for CMCase, avicelase, xylanase and proteinase degrading thermophilic strains on various substrates selective agar plate.

Diameter of clear zone on		strain code isolated from mangrove forest			Total strain
		Kok Pa Yom	ThaNumKem Tai	HoaThang	
Skim milk	10-15 mm	MGK48, MGK53, MGK58	MGB1, MGB3, MGB4, MGB6	MGH2, MGH4, MGH11	12
	>15-20mm	MGK50, MGK57	-	-	2
Xylan	10-15 mm	MGK47, MGK48	MGB1, MGB2, MGB3, MGB4, MGB8	MGH11, MGH12, MGH13, MGH14	11
	>15-20mm	MGK40, MGK53, MGK59	-	-	3
Cellulose	5-10 mm	MGK1, MGK19, MGK40, MGK59	MGB1, MGB2, MGB5, MGB6, MGB8	MGH2, MGH3, MGH4, MGH11, MGH12, MGH14	15
	>10-15 mm	-	MGB3, MGB4	MGH13	3
Avicel	> 5-10 mm	MGK59	MGB6	-	2

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โรคพืช

เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากป่าชายเลนทั้ง 3 แหล่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อโรคโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) และเชื้อรา *F. oxysporum* ที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) ในกล้วยไม้ และแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าวผลการทดสอบพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีท 6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินป่าชายเลนทั้ง 3 แหล่ง ได้แก่ MGK1, MGK19, MGK59, MGB5, MBG6, MGH1 และ MGH2 แสดงศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* อย่างไรก็ตามยังมีเชื้อ 2 สายพันธุ์ คือ รหัส MGB8 และ MGH14 ที่แสดงศักยภาพสูงในการยับยั้งเฉพาะเชื้อรา *F.oxysporum* นอกจากนี้ยังพบเชื้อ 4 สายพันธุ์ได้แก่ MGK19, MGK40 และ MGK59 จากดินป่าชายเลนชุมชนบ้านโคกพะยอม และ MGH14 จากป่าชายเลนชุมชนบ้านหัวทางสามารถแสดงผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ดังแสดงผล Table 2 จะเห็นได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ MGK59 แสดงศักยภาพสูงสุดทั้งในแง่ของการผลิตเอนไซม์และการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย ผลของศักยภาพของเชื้อที่คัดแยกจากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ซึ่งสามารถแสดงศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชอื่นๆ เช่น*Fusarium* sp., *Sclerotium* sp., *Xanthomonas* sp., *Pythium* sp. และ *Colletotrichum* sp. (Barakate *et al*., 2000; Moncheva *et al*., 2002; Oskay *et al*., 2004) และผลการศึกษาเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากดินชายฝั่งทะเลที่สามารถผลิตสารชีวภาพเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคชนิดต่างๆ (Jianyou *et al*., 2011; Attimarad *et al*., 2012)

Table 2 Inhibition of growth of some plant pathogenic by antagonistic actinomyces bacteria.

strain code	Percentage inhibition against to plant pathogen		
	C. gloeosporioides	***F. oxysporum***	***X. oryzaepv.oryzae***
Site 1: Mangrove forest nearby Kok Pa Yom community			
MGK1	81 %	82 %	-
MGK19	85 %	85%	2 mm
MGK40	-	-	5 mm
MGK59	98 %	99 %	8 mm
Site 2: Mangrove forest nearby ThaNumKem Tai community			
MGB5	80 %	85 %	-
MGB6	87 %	90 %	-
MGB8	-	80 %	-
Site 3: Mangrove forest nearby HoaThang community			
MGH1	80%	85%	-
MGH2	82%	85%	-
MGH14	-	80 %	2 mm

Note: - cannot inhibited plant pathogens

การระบุชนิดแอคติโนมัยสีทในระดับสกุลโดยใช้ยีน 16S rDNA

ผลการวิเคราะห์โดยใช้ยีน 16S rDNA จากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีศักยภาพสูงทางชีวภาพ 10 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชและสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายได้อย่างน้อย 3 ชนิด ซึ่งแยกได้ในงานวิจัยนี้ พบว่าเกือบทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ยกเว้น 1 สายพันธุ์รหัส MGK40 ที่ถูกระบุชนิดอยู่ในสกุล *Micromonospora* โดยเชื้อมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมใกล้เคียงมากกว่า 99 % กับยีน 16S rDNA (Figure 1) ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (Table 3)

Table 3 Comparison of partial 16S rDNA gene sequences of potential bioactive compound-producing strains to those of the GenBank database.

strain code	Most similar GenBank sequences (Accession no.)	Percentage sequence Similarity
Site 1: Mangrove forest nearby Kok Pa Yom community		
MGK1	*S. seoulensis* strain HBUM174820 (FJ486388)	100
MGK19	*S. scabiei* strain KACC 20194 (AY207609)	100
MGK40	*Micromonospora chokoriensis* strain 9-1 (KJ571062)	100
MGK59	*S. hygroscopicus* strain JY-22 (HM481473)	100
Site 2: Mangrove forest nearby ThaNumKem Tai community		
MGB5	*S. parvulus* strain OUCMDZ-2554(JX457345)	100
MGB6	*Streptomyces albulus* strain PD-1 (JF427575)	100
MGB8	*Streptomyces albulus* strain PD-1 (JF427575)	100
Site 3: Mangrove forest nearby HoaThang community		
MGH1	*S. rameus* strain ERINLG-35 (KF006406)	100
MGH2	*S. intermedius* (HF677170)	100
MGH14	*S. levis* strain NRRL B-16370 (NR_115778)	99

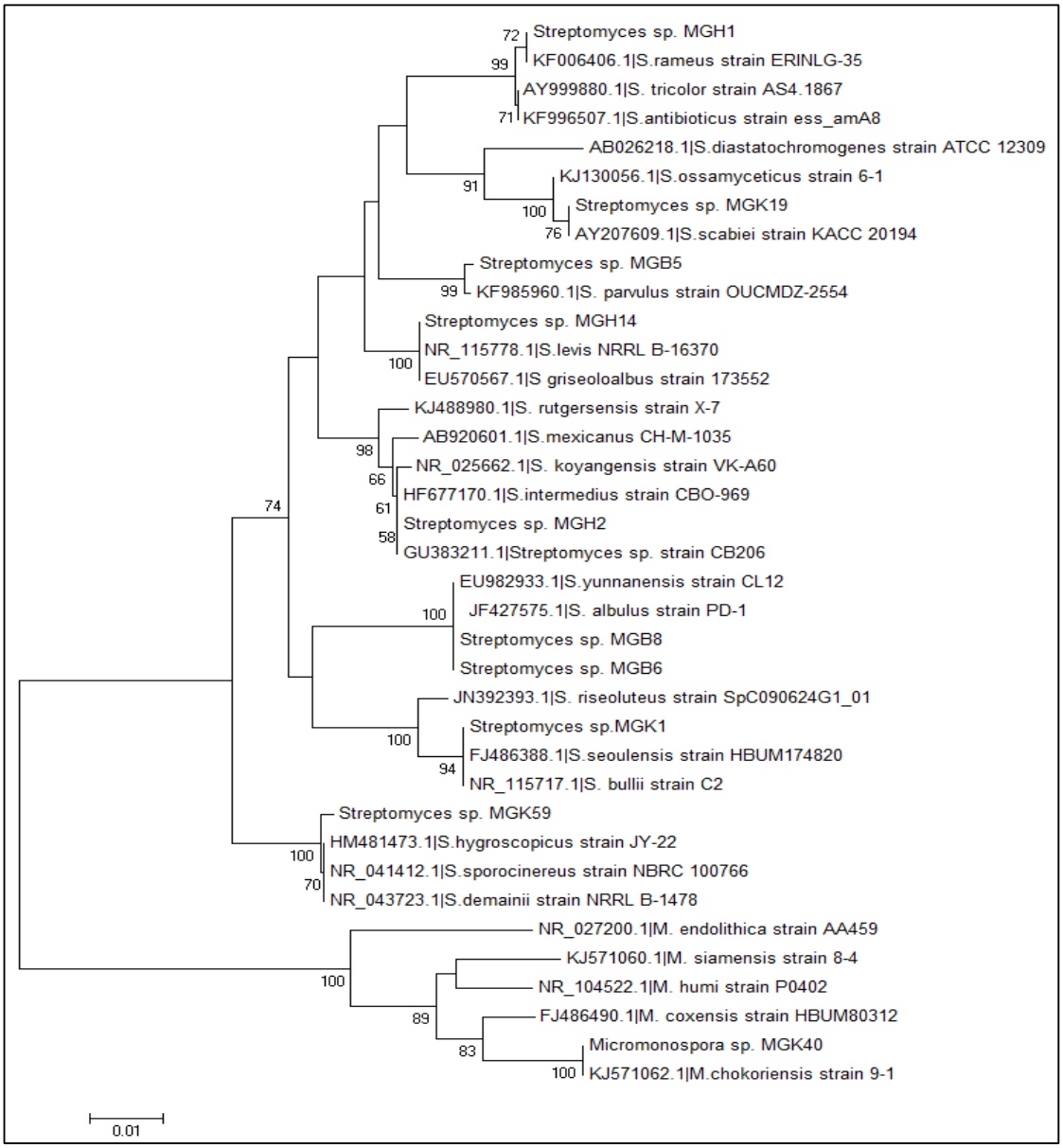

Figure 1 Phylogenetic dendrogram shows the relationship between 16S rDNA sequence of 10 actinomyces strains isolated in this study and 27 actinomycetes reference sequences retrieved from GenBank. The tree was constructed by MEGA 4.1 using a neighbor-joining algorithm with 1000 bootstrappings. The scale bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position. Numbers at the node are the bootstrap values (%).

สรุป

เชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกเพื่อใช้ในการทดสอบในงานวิจัยนี้ได้มาจากดินป่าชายเลน3 แหล่ง ได้แก่ บริเวณป่าชายเลนชุมชนบ้านโคกพะยอม ป่าชายเลนชุมชนบ้านท่าน้ำเค็มใต้ และป่าชายเลนชุมชนบ้านหัวทาง ผลการทดลองพบว่ามีปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีทเฉลี่ยจำนวน 1.1×10^7-2.1×10^8 CFU/g ในดินป่าชายเลนทั้ง 3 แหล่งจากการศึกษาสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทบริสุทธิ์จากดินป่าชายเลนทั้ง 3 แหล่งได้จำนวนทั้งสิ้น 90 สายพันธุ์เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดินทั้งหมดมาทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีเนสเซลลูเลส และไซแลนเนส พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสีทจำนวน 14 (15.5 %), 14 (15.5 %), 18 (20.0 %) และ 2 (2.2 %) สายพันธุ์ที่แสดงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเนส ไซแลนเนส ซีเอ็มซีเอส และอาวิเซลเลส ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อที่มีศักยภาพพบว่าส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ยกเว้น 1 สายพันธุ์อยู่ในสกุล *Micromonospora* โดยเชื้อมีค่าความเหมือนของลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA คิดเป็น 99-100% เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบส 16S rDNA ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากป่าชายเลนทั้ง 3 แหล่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) และเชื้อรา *F. oxysporum* ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (fusarium wilt) ในกล้วยไม้ และแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว โดยพบว่าเชื้อที่แยกได้จากป่าชายเลนอนุรักษ์บ้านโคกพะยอม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Streptomyces* sp. MGK19 และ *Streptomyces* sp. MGK59 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชทั้ง 3 สายพันธุ์คือ *C. gloeosporioides F.oxysporum* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อจากดินป่าชายเลนชุมชนบ้านท่าน้ำเค็มใต้และดินป่าชายเลนชุมชนบ้านหัวทางรวม 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Streptomyces* sp. MGB5, *Streptomyces* sp. MGB6 *Streptomyces* sp. MGH1 และ *Streptomyces* sp. MGH2 สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง *C. gloeosporioides* และ *F. Oxysporum* ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยนี้ได้เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพแตกต่างจากงานวิจัยอื่นๆ คือ *Streptomyces* sp. MGK59 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีศักยภาพสูงสุดในแง่ของการผลิตเอนไซม์และการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรียซึ่งน่าจะเหมาะที่จะนำไปใช้ศึกษาต่อในการผลิตเป็นสารสกัดสำหรับการประยุกต์ใช้ทางการเกษตร โดยเฉพาะการช่วยลดปัญหาของโรคเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในข้าวและไม้ดอกเศรษฐกิจต่อไป

คำนิยม

โครงการวิจัยนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี พ.ศ.2555 และ พ.ศ. 2558 ตลอดจนขอขอบคุณคุณดวงกมล บุญช่วย นักวิชาการเกษตรชำนาญการ ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท ที่สนับสนุนสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) สาเหตุโรคขอบใบแห้ง

REFERENCES

Attimarad, L. S., N. G. Ediga, A. A. Karigar, R. Karadi, N. Chandrashekhar and C. Shivanna. 2012. Screening, isolation and purification of antibacterial agents from marine actinomycetes. **Int. curr. pharm. j.** 1 (12): 394-402.

Barakate, M., Y. Ouhdouch, K. Oufdou and C. Beaulieu. 2000. Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 18: 49–54.

Chellapandi, P and H. M. Jani. 2008. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Braz. J. Microbiol.** 39: 122-127.

Hayakawa, M. 2008. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes

in soil. **Actinomycetologica.** 22: 12-19.

Jeffrey, L. S. H, A. M. Sahilah, R. Son and S. Tosiah. 2007. Isolation and screening of actinomycetes from Malaysian soil for their enzymatic and antimicrobial activities. **J. Trop. Agric. and Fd. Sc.** 35: 159-164.

Jianyou, L., X. Jianrong and C. Yongheng. 2011. Isolation and identification of two marine-derived *Streptomyces* from marine mud of coast and offshore Zhuhai, and bioactive potential for plant pathogenic fungi. **Afri.J. Biotec**. 10 (56): 11855-11860.

Kim, C. J., K. H. Lee, A. Shimazu, O. S. Kwon and D. J. Park. 1995. Isolation of rare actinomycetes on various types of soil. J. Appl. **Microbiol. Biotechnol** 23: 36-42.

Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *In* **nucleic acid technique in bacterial systematics**. (M.G. Stackebrandt, eds.) Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc.

Lazzarini, A., L. Cavaletti, G. Toppo and F. Marinelli. 2001. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie van Leeuwenhoek.** 78: 399-405.

Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **J. Mol. Biol.** 3: 208-218.

Meena, B., L. A. Rajan, N. V. Vinithkumar and R. Kirubagaran. 2013. Novel marine actinobacteria from emerald Andaman & Nicobar Islands: a prospective source for industrial and pharmaceutical byproducts. **BMC Microbiol.** 13:145.

Miyadoh, S. 1997. **Atlas of Actinomycetes**. The Society for Actinomycetes Japan. Asakurapublishing, Japan.

Moncheva, P., S. Tishkov, N. Dimitrova, V. Chipeva, S. Antonova-Nikolova and N. Bogatzevska. 2002. Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. **J. Cult. Collect.** 3: 3–14.

Montonphetch, S., P. Sunthornhao and W. Hoamuangkaew. 2013. Valuation of Deforestation in Mangrove Forest Area, Samut Sakhon Province. Valuation of Deforestation in Mangrove Forest Area, Samut Sakhon Province. **Thai J. For.** 32 (3): 22-32. (in Thai)

Oskay, M., A. Usame and C. Azeri. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. **Afri. J. Biotech.** 3: 441- 446.

Sukumaran, R. K., R. R. Singhania and A. Pandey. 2005. Microbial cellulases-production, applications and challenges. **J. Sci. Ind. Res.** 64 (11): 832–844.

Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol**. 17: 39-67.

Techapun, C., N. Poosaran, M. Watanabe and K. Sasaki. 2003. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and their required properties for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. **Process Biochem.** 38:1327-1340.

Watve, M. G., R. Tickoo, M. M. Jog and B. D. Bhole. 2001. How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces? **Arch. Microbiol.** 176 (5): 386-90.