

บทความวิจัย (Research Article)

การคัดแยกและระบุหาแอคติโนมัยซีทอาศัยในดิน อุทยานแห่งชาติภูลังกา นครพนม
กิงจันท์ มะลิซ้อน*

Isolation and identification of soil Actinomycetes inhabiting Phulangka
national park, Nakhonphanom

Kingchan Malisorn*

Department of Biology, Faculty of Science, Udonthani Rajabhat University, Udonthani Province 41000

* Corresponding author, E-mail: kingchanchoomponla@yahoo.com

Naresuan Phayao J. 2015;8(1):21-24.

บทคัดย่อ

ศึกษาคัดแยกและระบุหาแอคติโนมัยซีทจากดิน อุทยานแห่งชาติภูลังกา จังหวัดนครพนม สุ่มเก็บตัวอย่างจากดินบริเวณรอบรากของกล้วยไม้ ดินใต้ต้นไม้ ดินบริเวณเห็ดเจริญ และดินจอมปลวก สภาพดินเป็นดินร่วนสีน้ำตาลเตรียมตัวอย่างดินด้วยร้อยละ 10 แคลเซียมคาร์บอเนต ตากแห้งอุณหภูมิห้องนาน 2 วัน คัดแยกสายพันธุ์แอคติโนมัยซีทด้วยวิธีเจือจางลดทอนต่อเนื่องและเทคนิคเกลี่ยลงจานอาหารเพาะเลี้ยงประกอบด้วยแป้งและโปรตีนเคซีน ระบุหาได้กลุ่มแยก 129 กลุ่ม ลักษณะของการยึดติดกลุ่มอัดแน่นบนอาหารเพาะเลี้ยง กลุ่มมีสีต่างๆได้แก่ ขาว เทา และเหลือง ลักษณะคล้ายหนังพอกนุ่มเหมือนกำมะหยี่หรือเหมือนบางสิ่งบดเป็นผง สายใยใต้อาหารส่วนใหญ่เป็นสีขาว ไม่แตก และมีรังควาญสีดำ น้ำตาล และเหลือง ก่อรูปสปอร์ใช้สิ่งหุ้มหลายรูปแบบ การศึกษารูปลักษณะบ่งถึงว่าเป็นสายพันธุ์ของวงศ์ *Streptomyces*, *Microbispora* และ *Microtetraspora*

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีท, ดิน, อุทยานแห่งชาติ,

Abstract

Isolation and identification of actinomycetes from soil were studied at Phulangka national park, Nakhonphanom province. The soil samples were randomly collected from rhizosphere soil of orchids, trees, mushroom growing soil and, anthill soil. The nature of soil was brown loam. Soil samples were pretreated by 10% calcium carbonate (CaCO_3) and air dried 2 days at room temperature. The isolation of actinomycetes strain from soil samples was obtained by serial dilution method and spread plate technique on starch casein agar. One hundred and twenty nine isolates were identified. The characteristics of colonies adhesion, hardened packed on the surface of agar media. Colonies were white, grey, brown and yellow resemble velvet leather or something like powdery. Most of substrate mycelium was white in color, no broken mycelia were observed, melanin pigment black, brown and yellow. Conidia were formed in various manners. Morphological studies indicated that the strains belonged to genera *Streptomyces*, *Microbispora* and *Microtetraspora*.

Keywords: Actinomycetes, soil, national park

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี จังหวัดอุดรธานี 41000

รับต้นฉบับวันที่ 6 พฤษภาคม 2557, รับลงตีพิมพ์วันที่ 5 มีนาคม 2558

บทนำ

แอกติโนมัยซีท (*actinomycetes*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกพบมากในดิน เจริญเป็นสายใยและสร้างสปอร์คล้ายเชื้อรา เจริญดีเมื่อมีออกซิเจน ดำรงชีพเป็นผู้ย่อยสลายของระบบนิเวศเพื่อเกิดความสมดุล [1-3] แพร่กระจายมากบริเวณแหล่งอินทรีย์วัตถุ อันมีสิ่งได้จากการย่อยสลายของสารอินทรีย์ แหล่งน้ำธรรมชาติ และดิน โดยเฉพาะรอบรากพืชและตะกอน [4-6] บางสายพันธุ์เป็นจุลชีพก่อโรคของคน สัตว์ และพืช [7] บางสายพันธุ์ผลิตสารชีวภาพอันเป็นประโยชน์ [8] เป็นต้นว่า สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 70 ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทวงศ์ *Streptomyces* [9-12] แอกติโนมัยซีทยังผลิตเอนไซม์หลายชนิดได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส ไลเปส ไคติเนส [13-15] และสารสี [16] ผู้วิจัยประสงค์คัดแยกและระบุหาแอกติโนมัยซีทอาศัยในดิน

วัสดุและวิธีการ

เก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติลังกา จังหวัดนครพนม จำนวน 40 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 กรัม ตั้งแต่ดินบริเวณใต้กล้วยไม้ (20 ตัวอย่าง) ดินต้นไม้ (7 ตัวอย่าง) ดินบริเวณเห็ดเจริญ (6 ตัวอย่าง) และดินจอมปลวก (7 ตัวอย่าง) เก็บดินส่วนลึกประมาณ 5 เซนติเมตร

ผสมดินตัวอย่างด้วยร้อยละ 10 แคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อกำจัดแบคทีเรียชนิดสร้างเมือก [1] ตากแห้งอุณหภูมิห้องนาน 2 วัน คัดแยกแอกติโนมัยซีทด้วยวิธีเจือจางลดหลั่นต่อเนื่องและเทคนิคเกลี่ยลงจานอาหารเพาะเลี้ยงประกอบด้วยแป้งและโปรตีนเคซีน (starch casein agar) ป่มอุณหภูมิห้อง นาน 5 ถึง 7 วัน

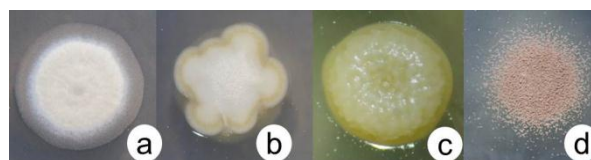
ศึกษาสีสายใยได้อาหารและสปอร์ด้วยการเพาะในอาหารเพาะเลี้ยงประกอบด้วยข้าวโอ๊ต (oatmeal agar) ตรวจสอบการแตกหักของสายใยและการสร้างสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ประเมินการผลิตรงควัตถุ (melanin) ด้วยการเพาะลงอาหารเพาะเลี้ยงประกอบด้วย ferric ammonium citrate สาร

สกัดจากยีสต์ และ proteose peptone (peptone yeast extract iron agar) [1,3] และระบุหาวงศ์ด้วยรูปลักษณะเทียบเคียงกับเอกสารอ้างอิงการจำแนก [3,17-19]

ผลการศึกษา

ดินประกอบด้วยดินร่วนร้อยละ 97 และดินทรายร้อยละ 3 ส่วนสีประกอบด้วยสีน้ำตาลร้อยละ 67 สีดำร้อยละ 25 สีแดงอิฐร้อยละ 8 พิสัยของอุณหภูมิระหว่าง 24 ถึง 28 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดต่างระหว่าง 5 ถึง 7

คัดแยกและระบุหาแอกติโนมัยซีทได้กลุ่มแยก 129 กลุ่ม แยกแยกเป็นดินใต้ต้นกล้วยไม้ (62 กลุ่ม) ดินใต้ต้นไม้ (28 กลุ่ม) ดินบริเวณเห็ดเจริญ (18 กลุ่ม) ดินจอมปลวก (21 กลุ่ม) มีกลุ่ม (colony) เฉลี่ยเท่ากับ 33.70, 9.10, 4.83 และ 1.10 คูณ 10^4 หน่วยก่อรูปกลุ่ม (colony forming unit – CFU) ต่อดินหนึ่งกรัม กลุ่มมีสีขาว ขอบเรียบ ฐานโค้ง ตรงกลางยุบลงเล็กน้อย ลักษณะของการยืดยึดกลุ่มอัดแน่นแปรผัน ดังภาพที่ 1



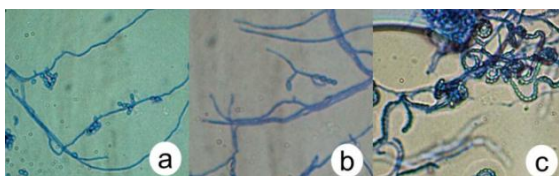
ภาพที่ 1 กลุ่มแอกติโนมัยซีท a) แข็งกระด้าง หยาบ และขรุขระ b) คล้ายกำมะหยี่ c) หน้างัสต์ และ d) คล้ายผงแป้ง

สีกลุ่มสปอร์ (spore mass) ส่วนใหญ่เป็นสีเทา (ร้อยละ 43) และหลากหลายตั้งแต่ ขาว น้ำตาล ดำ เหลือง และครีม ทุกกลุ่มสร้างสปอร์รูปร่างหุ้ม (conidia)

สีสายใยได้อาหารส่วนใหญ่เป็นสีขาว (ร้อยละ 29) และหลากหลายตั้งแต่ เทา เหลือง น้ำตาล ดำ ครีม แดง และส้ม การผลิตรงควัตถุแพร่สู่อาหารส่วนใหญ่เป็นสีดำ (ร้อยละ 77) รองลงมาคือน้ำตาลและเหลือง ส่วนสายใยทั้งหมดไม่แตกหัก (ร้อยละ 100)

การระบุหาแอกติโนมัยซีทโดยรูปลักษณะพบว่า 125 กลุ่มแยก คล้ายคลึงกับวงศ์ *Streptomyces*

อันมีสปอร์ไร้สิ่งห่อหุ้มต่อเป็นสายโซ่ยาว 3 กลุ่มแยก คล้ายคลึงกับวงศ์ *Microbispora* ซึ่งสร้างสปอร์แบบคู่ และ 1 กลุ่มแยกคล้ายคลึงกับวงศ์ *Microtetraspora* อันสร้างสปอร์เรียงต่อกัน 4 สปอร์ ดังภาพที่ 2 สายใย ได้อาหารส่วนใหญ่เป็นสีขาว ไม่แตก และมีเม็ดสีดำ น้ำตาล และเหลือง



ภาพที่ 2 ลักษณะสปอร์ของ a) *Microbispora* sp. E5-1, b) *Microtetraspora* sp. A11-1 และ c) *Streptomyces* sp. E6-4

วิจารณ์

แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่ของพื้นที่ศึกษาเป็น วงศ์ *Streptomyces* เช่นเดียวกับการคัดแยกและระบุ หารดินจากอุทยานแห่งชาติ จังหวัดแพร่และจังหวัด น่าน พบ 420 ใน 629 กลุ่มแยก [20]

วงศ์ *Streptomyces* มีมากกว่า 500 สายพันธุ์ แม้จะมีการจัดระบบจำแนกสายพันธุ์ แต่จุลชีพวงศ์นี้ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ชีวภาพ เชิงอุตสาหกรรม การแข่งขันทางธุรกิจเป็นผลให้เกิด การปกปิดข้อมูล ทำให้ขาดข้อมูลการจำแนกเป็น ระบบชัดเจน [21]

สารปฏิชีวนะใช้เป็นยานับสิบชนิดผลิตจากจุล ชีพวงศ์ *Streptomyces* [22] การศึกษาด้านลึกเกี่ยวกับการ คัดแยก ระบุหา อาหารเพาะเลี้ยงเหมาะสม และ สภาวะเหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจำนวนมาก ล้วนเป็นสิ่งท้าทายการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์และ อุตสาหกรรม

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้เงินสนับสนุนจาก สำนักบริหาร โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนา มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการ

การอุดมศึกษา และกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและ พันธุ์พืช อุทยานแห่งชาติภูลังกา จังหวัดนครพนม

เอกสารอ้างอิง

1. งามนิจ นนทโส. Systematic bacteriology laboratory. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2547.
2. ชรินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา, น้ำฝน ป้อมทอง, จรัญ เจตนะจิตร, พชรี สุนทรนน, วิเชียร กิจ ปริชาวนิช. เชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าเบญจ พวรรณและป่าเต็งรังบริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางราเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง. เอกสาร ประกอบการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 สาขา วิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและ สิ่งแวดล้อม; 3 ถึง 7 กุมภาพันธ์ 2546; กรุงเทพมหานคร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: 2546; หน้า 363-70.
3. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
4. Bredholt H, Fjærvik E, Johnsen G, Zotchev SB. Actinomycetes from sediments in the Trondheim Fjord, Norway: diversity and biological activity. *Mar Drugs*. 2008;6:12-24.
5. Mishra A. Biology of higher actinomycetes from soils of Kanpur in relation to cultural and physiological characteristics. [PhD thesis] Kanur: Chhatrapati Shahu Ji Maharaj University; 2007.
6. Rifaat HM The biodiversity of actinomycetes in the River Nile exhibiting antifungal activity. *J Mediterr Ecol*. 2003;4:5-7.
7. Martin A. Introduction to Soil Microbiology. New York: John Wiley & Sons; 1961.

8. Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(4):795–811.
9. Basilio A, Gonzalez I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A, González A, et al. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different condition of pH and salinity. *J Appl Microbiol.* 2003;95(4):814–23.
10. Bull A, Goodfellow M, Slater JH. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu Rev Microbiol.* 1992;42:219–57.
11. McCarthy JA, Williams TS. Methods for studying the ecology of actinomycetes. In: Grigorova R, Norris JR, editors. *Method in Microbiology.* London: Academic Press Limited; 1990. p. 333–63.
12. Terkina LA, Parfenova VV, Ahn TS. Antagonistic activity of actinomycetes of Lake Baikal. *Appl Biochem Microbiol.* 2006;42(2):173–6.
13. Choomponla K, Upadhyay RS. Chitinase production from actinomycetes by solid state fermentation. LAP LAMBERT Academic Publishing; 2012.
14. Reyad MA. Diverse of enzymatically active actinomycetes associated with mangrove rhizosphere in Janzan coast. *Ann Biol Res.* 2013;4(4):100–8.
15. Selvam K, Vishnupriya B, Subhash Chandra Bose V. Screening and quantification of marine actinomycetes producing industrial enzyme amylase, cellulose and lipase from South coast of India. *Int J Pharm Biol.* 2011;2(5):1418–87.
16. นฤมล เกื่อนกุล. การใช้สารสกัดจากจุลินทรีย์ในการยับยั้งเส้นใยจากธรรมชาติและเส้นใยสังเคราะห์ [วิทยานิพนธ์]. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม; 2547.
17. Shirling EB, Gottlieb D. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol.* 1966;16:313–44.
18. Williams ST, Davies FL, Cross T. Identification of genera of the Actinomycetales. In: Gibbs BM, Shapton DA, editors. *Identification Methods for Microbiologists.* London: Academic Press; 1968.
19. Bergey's manual of determinative bacteriology, Actinomycetales. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 2000.
20. นาริลักษณ นาแก้ว. ความหลากหลายของแอคติโนมัยซีทที่หายากจากดินและการผลิตยาปฏิชีวนะ [วิทยานิพนธ์]. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2552.
21. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics.* Norwich: John Innes Foundation; 2000.
22. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Brock biology of microorganisms.* 12th ed. San Francisco: Pearson; 2009.