

บทที่ 4 ผลการวิจัย

พื้นที่ศึกษาป่าชายเลน บริเวณตำบลกำพวน อำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง

พื้นที่ศึกษาในตำบลกำพวน อำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนองมีพื้นที่ด้านทิศตะวันออกติดกับผืนป่าอนุรักษ์ในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้แก่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าคลองแสง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าคลองย่น และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าควนแม่ยายหมอน ในเขตอำเภอพะโต๊ะ จังหวัดชุมพร และบางส่วนด้านทิศใต้ติดกับเขตอุทยานแห่งชาติศรีพังงา จังหวัดพังงา มีพื้นที่ป่าชายเลน ซึ่งมีขนาดประมาณ 9.86 ตารางกิโลเมตร หรือประมาณ 6,162 ไร่ สภาพพื้นที่มีทรัพยากรธรรมชาติที่มีความอุดมสมบูรณ์มาก มีไม้ป่าชายเลนหลายชนิดที่พบมาก ได้แก่ โกงกาง ประสัก ตะบูน แสม ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ลงพื้นที่ เพื่อเก็บตัวอย่างดิน ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงมีนาคม 2559 ซึ่งเป็นช่วงฤดูร้อน แต่อากาศในบริเวณนั้นไม่ร้อนมากนัก เนื่องจากได้รับกระแสลมและไอน้ำจากทะเล ส่วนลักษณะดินเป็นดินเหนียวอัดแน่นมีสภาพเป็นโคลนเลน ดินมีความชื้นสูง



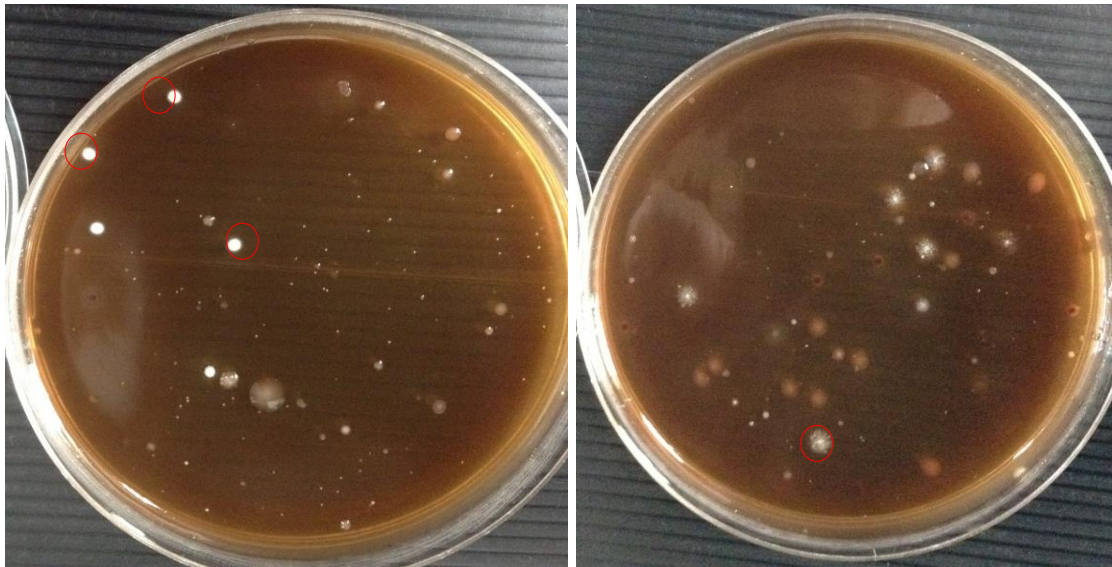
ภาพที่ 4.1 บริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่างดินในป่าชายเลน ตำบลกำพวน จังหวัดระนอง



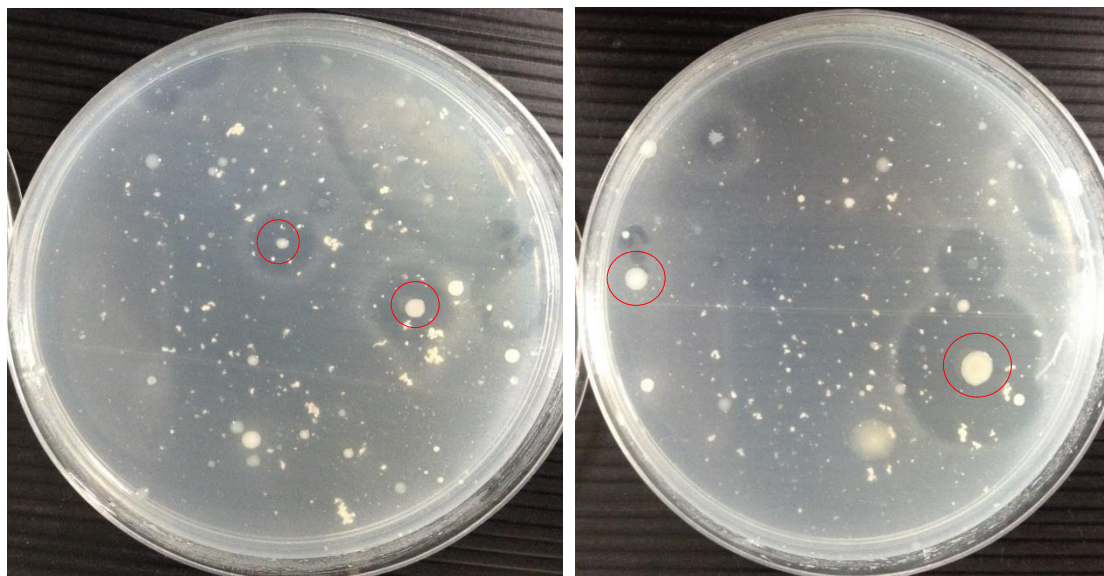
ภาพที่ 4.2 ตัวอย่างดินที่นำมาศึกษา

ผลการคัดแยกแอกติโนมัยซิสในเบื้องต้นด้วยอาหาร Humic acid vitamin agar Starch casein agar และ Yeast malt agar

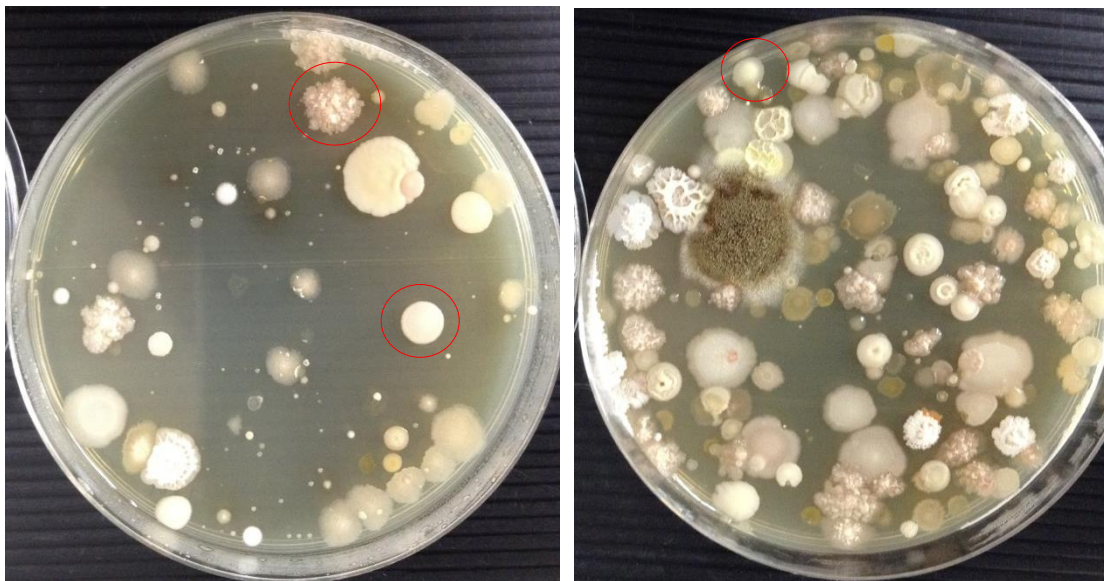
จากการลงพื้นที่สุ่มเก็บตัวอย่างดินในป่าชายเลน จำนวน 70 ตัวอย่าง แล้วนำมาคัดแยกแอกติโนมัยซิสด้วยอาหาร Humic acid vitamin agar Starch casein agar และ Yeast malt agar ศึกษาลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่าง และลักษณะเซลล์ โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะโคโลนีบนอาหาร Humic acid vitamin agar ที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว หรือสีเทา หรือสีครีม จนถึงสีเหลือง ผิวหน้าโคโลนีคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง หรือขรุขระคล้ายหนังสัตว์หรือผ้ากำมะหยี่บนอาหาร Starch casein agar เลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาวครีมจนถึงสีเหลืองบนอาหาร Yeast malt agar เลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาว สีเทา สีครีมจนถึงสีเหลือง มีผิวหน้าโคโลนีคล้ายผงฝุ่นแป้ง หรือขรุขระคล้ายหนังสัตว์ ซึ่งผลการศึกษาคัดแยกแอกติโนมัยซิส ในเบื้องต้นพบว่า สามารถคัดแยกแอกติโนมัยซิสที่มีลักษณะดังกล่าวข้างต้น ได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลต โดยลักษณะโคโลนีบนอาหาร Humic acid vitamin agar แสดงในภาพที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Starch casein agar แสดงในภาพที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Yeast malt agar แสดงในภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.3 โคโลนีของแอคทีโนมัยซีสบนอาหาร Humic acid vitamin agar



ภาพที่ 4.4 โคโลนีของแอคทีโนมัยซีสบนอาหาร Starch casein agar

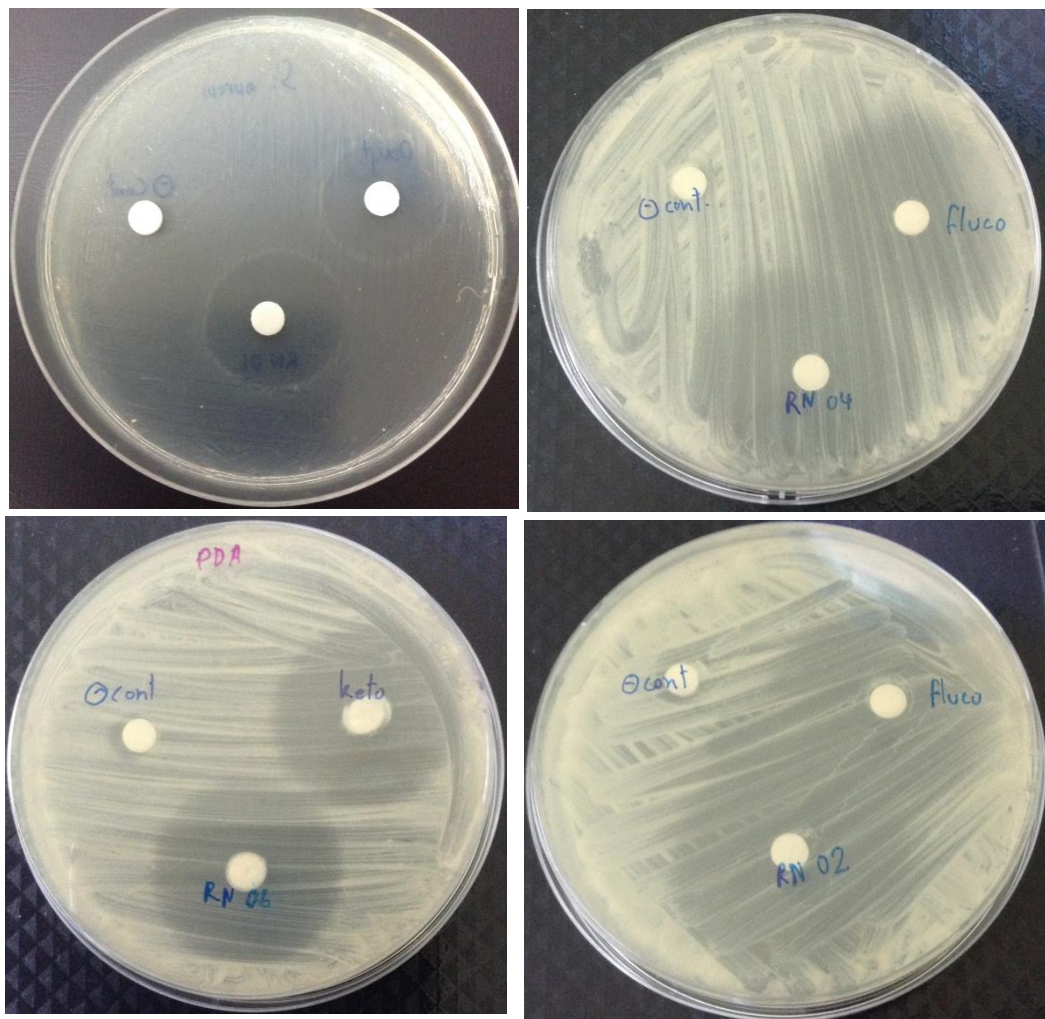


ภาพที่ 4.5 โคลนิจของแอดติโนมายซีสบนอาหาร Yeast malt agar

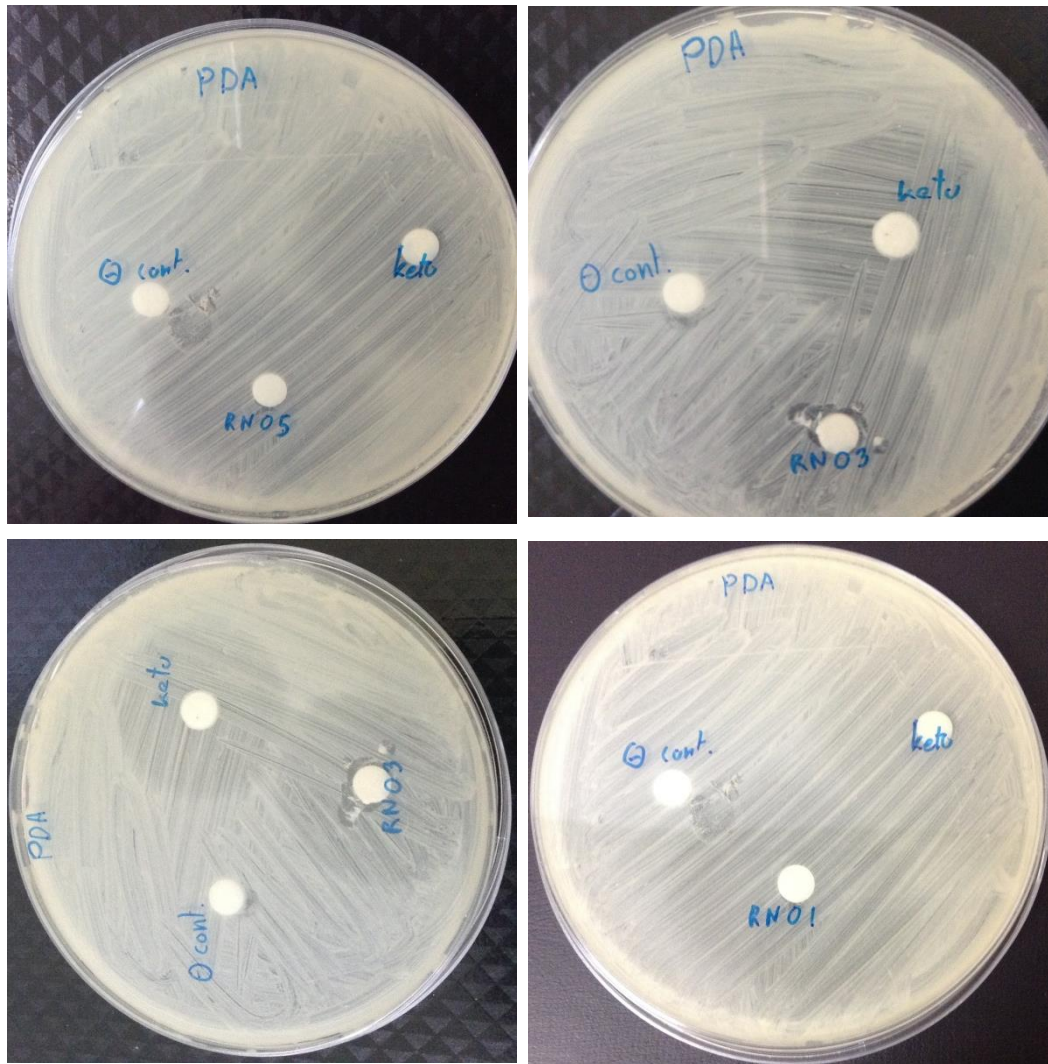
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอดติโนมายซีส

เมื่อนำไอโซเลตที่แยกได้ในเบื้องต้น ทั้ง 39 ไอโซเลต มาตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค โดยจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ผลการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอดติโนมายซีส (ภาพที่ 4.6) พบว่า แอดติโนมายซีส 16 ไอโซเลตสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 โดยมีค่า Inhibition zone และ Inhibition index แสดงในตารางที่ 4.1 และแอดติโนมายซีส 31 ไอโซเลตสามารถยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 90028 โดยมีค่า Inhibition zone และ Inhibition index แสดงในตารางที่ 4.2 และมีแอดติโนมายซีส 8 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ไอโซเลตที่ RN 01, RN 03, RN 19, RN 20, RN 21, RN 24, RN 25 และ RN 26 และแอดติโนมายซีสจำนวน 16 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 93.75) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 โดยให้ค่า Inhibition index มากกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิเมตร และแอดติโนมายซีสจำนวน 1 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 6.25) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 โดยให้ค่า Inhibition index เท่ากับ

0 และแอคติโนมัยซิสจำนวน 31 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 90028 (คิดเป็นร้อยละ 100) โดยให้ค่า Inhibition index มากกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซิส



ภาพที่ 4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซิส (ต่อ)

ตารางที่ 4.1 ค่า Inhibition zone และ Inhibition index ของแอสติโนมัยซิสกับ *Staphylococcus aureus* ATCC 25932

ไอโซเลต แอสติโนมัยซิส	ขนาดโคโลนี (cm.)	Inhibition zone (cm.)	Inhibition index
RN 01	0.7	3.6	5.14
RN 03	0.8	2.9	3.62
RN 07	0.7	3.1	4.42
RN 08	0.9	2.8	3.11
RN 10	0.8	3.1	3.87
RN 11	1.2	3.2	2.66
RN 14	0.6	2.5	4.16
RN 17	0.7	2.9	4.14
RN 19	0.4	2.3	5.75
RN 20	0.9	2.9	0.32
RN 21	0.7	3.1	4.42
RN 24	0.9	3.4	3.77
RN 25	1.1	3.3	3.00
RN 26	1.2	3.1	2.58
RN 39	0.6	2.8	4.66
RN 50	0.7	2.7	3.85

ตารางที่ 4.2 ค่า Inhibition zone และ Inhibition index ของแอสติโนมัยซิสกับ *Candida albicans* ATCC 90028

ไอโซเลต แอสติโนมัยซิส	ขนาดโคโลนี (cm)	Inhibition zone (cm)	Inhibition index
RN 01	0.7	4.1	5.85
RN 02	0.8	3.9	4.87
RN 03	0.7	3.6	5.14
RN 04	0.9	3.8	4.22
RN 05	0.8	3.6	4.50
RN 06	1.2	3.1	2.58
RN 13	0,6	2.5	4.16
RN 16	0.7	2.8	4.00
RN 19	0.6	2.5	4.16
RN 20	0.9	3.0	3.33
RN 21	0.7	2.7	3.85
RN 24	0.9	2.6	2.88
RN 25	1.1	2.9	2.63
RN 26	1.2	3.8	3.16
RN 29	0.6	2.7	4.50
RN 30	0.7	3.7	5.28
RN 34	0.5	2.3	4.60
RN 37	0.6	2.6	4.33
RN 41	0.5	2.6	5.20
RN 42	0.5	2.2	4.40
RN 43	0.9	2.4	2.66
RN 49	0.5	2.3	4.60
RN 52	0.9	2.7	3.00
RN 55	0.7	3.0	4.28
RN 58	0.7	2.8	4.00
RN 61	0.5	2.4	4.80
RN 62	0.7	2.1	3.00
RN 64	0.6	2.3	3.83
RN 65	0.8	3.1	3.87
RN 67	0.5	2.3	4.60
RN 70	0.5	2.4	4.80

ตารางที่ 4.3 ระดับของค่า Inhibition index ของแอกติโนมัยซิสที่แยกจากดินต่อจุลินทรีย์ทดสอบ

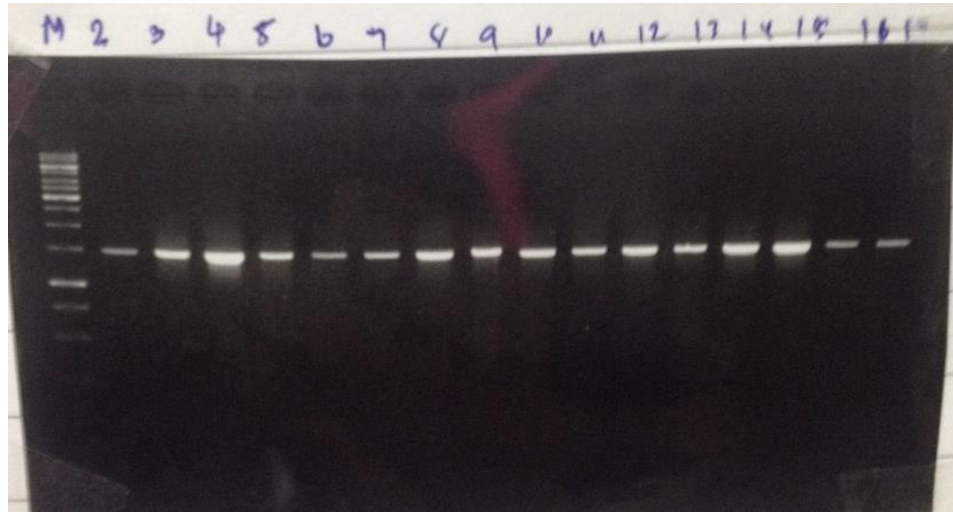
Inhibition index	จำนวนแอกติโนมัยซิสที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบ	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028
++++	15 (93.75%)	31 (100%)
+++	-	-
++	-	-
+	-	-
-	1 (6.25%)	-

++++ : inhibition index(X) ≥ 20 mm., +++: 20 mm. $\geq X > 10$ mm., ++: 10 mm. $\geq X > 5$ mm., +: 5 mm. $\geq X \geq 1$ mm., -: 0

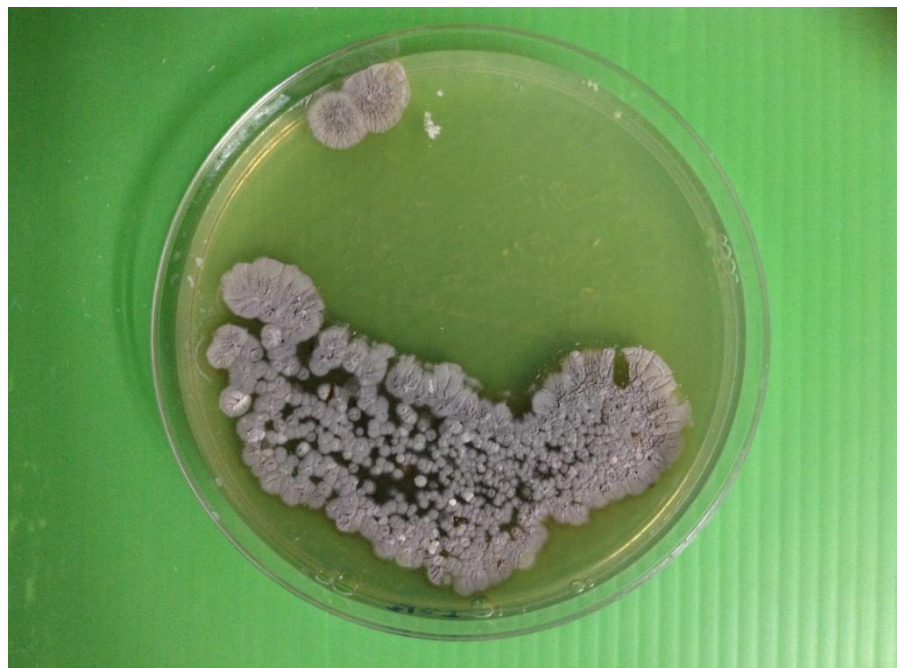
การจัดจำแนกแอกติโนมัยซิสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซิสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 39 ไอโซเลต เพื่อจำแนกแอกติโนมัยซิสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved region ของ 16S rRNA ของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ได้ PCR Product ที่มีขนาด 1,500 bp ภาพที่ 4.6 แสดงตัวอย่าง PCR Product ขนาด 1500 bp ของแอกติโนมัยซิสจากตัวอย่างดินที่แยกได้ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบกับลำดับเบสอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ RN 01 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส 16S rRNA ยีนของ *Streptomyces griseus* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 100% แอกติโนมัยซิสรหัส RN 01 แสดงลักษณะโคโลนีสีเทา ล้อมรอบด้วยเส้นใยสีขาวบนอาหาร SP-2 ดังแสดงในภาพที่ 4.8 และลักษณะเซลล์เป็นเส้นสาย ติดสีแกรมบวก ดังแสดงในภาพที่ 4.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ RN 03 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส 16S rRNA ยีนของ *Streptomyces albus* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 100% แอกติโนมัยซิสรหัส RN 03 แสดงลักษณะโคโลนีสีเหลือง ไม่มีเส้นใยบนอาหาร SP-2 ดังแสดงในภาพที่ 4.10 และลักษณะเซลล์เป็นรูปท่อน มี

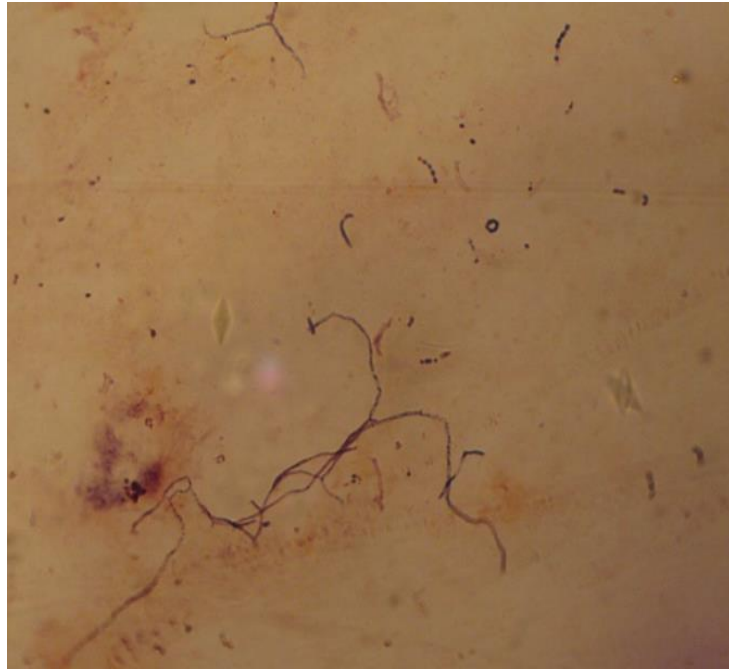
เส้นสาย ติดสีแกรมบวก ดังแสดงในภาพที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ RN 19 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส 16S rRNA ยีนของ *Streptomyces avermitilis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 99% แอคติโนมัยซิสรหัส RN 19 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร SP-2 มีโคโลนีสีดำเทา มีเส้นใยสีขาวล้อมรอบ ดังแสดงในภาพที่ 4.12 และลักษณะเซลล์เป็นรูปร่างกลม เซลล์เรียงตัวเป็นสายคล้ายลูกปัด ติดสีแกรมบวก ดังแสดงในภาพที่ 4.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ RN 02 RN 04 RN 05 RN 06 RN 07 RN 08 RN 09 RN 10 RN 11 RN 13 RN 14 RN 16 RN 17 RN 20 RN 29 RN 30 RN 34 RN 37 RN 39 RN 41 RN 42 RN 43 RN 49 RN 50 RN 52 RN 55 RN 58 RN 61 RN 62 RN 64 RN 65 RN 67 และ RN 70 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส 16S rRNA ยีนของ *Streptomyces* sp. ซึ่งแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร SP-2 โคโลนีผิวย่นสีเหลือง ดังแสดงในภาพที่ 4.14 และลักษณะเซลล์ รูปร่างกลม เซลล์เรียงตัวเป็นสายคล้ายลูกปัด ติดสีแกรมบวก ดังแสดงในภาพที่ 4.15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ RN 20 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส 16S rRNA ยีนของ *Streptomyces aminophilus* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 99% แอคติโนมัยซิสรหัส RN 20 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร SP-2 มีโคโลนีสีเหลือง มีผงแป้งสีขาว ดังแสดงในภาพที่ 4.16 และลักษณะเซลล์เป็นเส้นสาย ติดสีแกรมบวก ดังแสดงในภาพที่ 4.17 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ RN 26 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส 16S rRNA ยีนของ *Microbispora rosea* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 100% แอคติโนมัยซิสรหัส RN 26 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร SP-2 มีโคโลนีสีส้ม มีผงแป้งสีขาว ดังแสดงในภาพที่ 4.18 และลักษณะเซลล์เป็นเส้นสาย ติดสีแกรมบวก ดังแสดงในภาพที่ 4.18



ภาพที่ 4.7 ผลการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ เลน M 100 bp DNA ladder; เลน 1 ถึง 17 PCR product ขนาด 1500 bp จากดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกจากดินป่าชายเลน



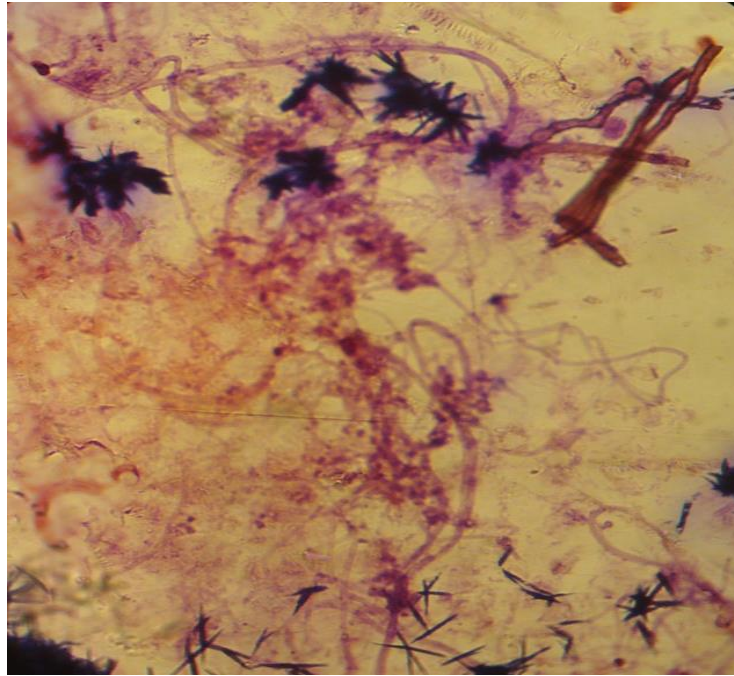
ภาพที่ 4.8 โคลนีสของ *Streptomyces griseus* ที่เลี้ยงบนอาหาร SP-2



ภาพที่ 4.9 ลักษณะเซลล์ของ *Streptomyces griseus* ที่เลี้ยงบนอาหาร SP-2



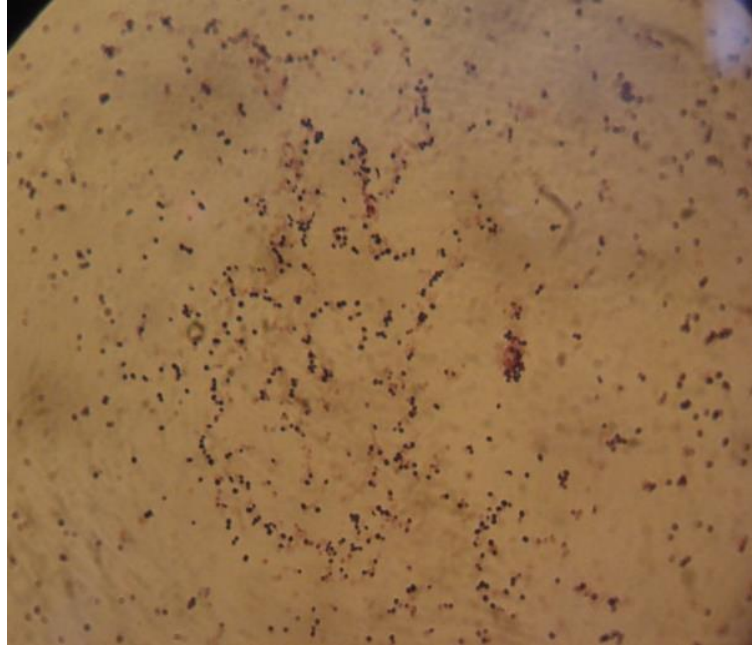
ภาพที่ 4.10 โคโลนีของ *Streptomyces albus* ที่เลี้ยงบนอาหาร SP-2



ภาพที่ 4.11 ลักษณะเซลล์ของ *Streptomyces albus* ที่เลี้ยงบนอาหาร SP-2



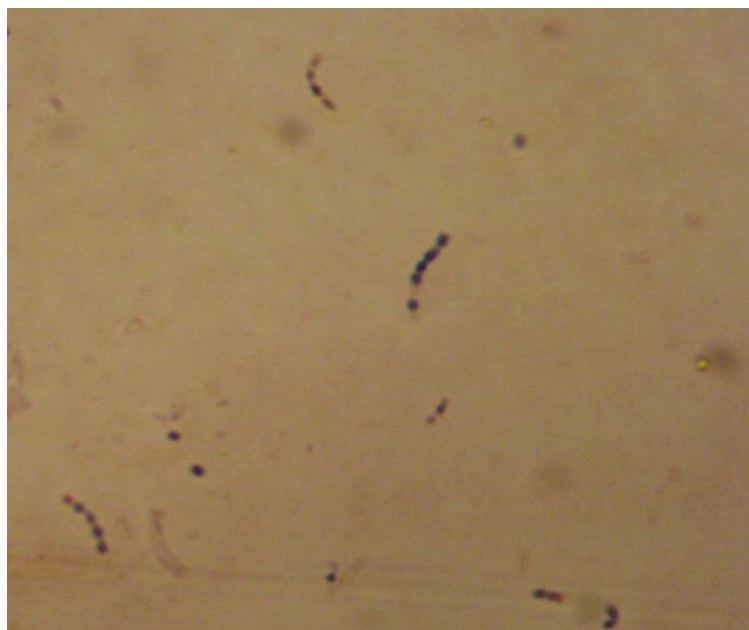
ภาพที่ 4.12 โคโลนีของ *Streptomyces avermitilis* ที่เลี้ยงบนอาหาร SP-2



ภาพที่ 4.13 ลักษณะเซลล์ของ *Streptomyces avermitilis* ที่เลี้ยงบนอาหาร SP-2



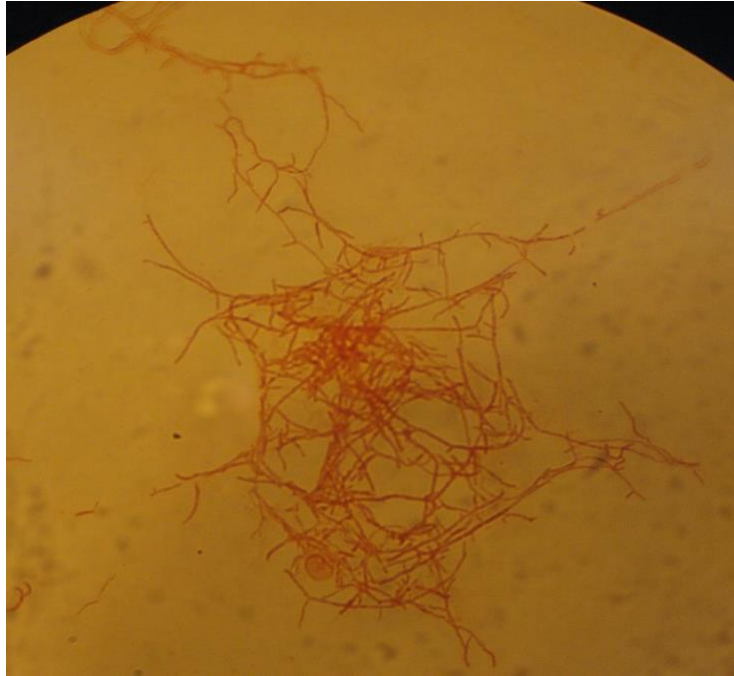
ภาพที่ 4.14 โคลนีของ *Streptomyces* sp. ที่เลี้ยงบนอาหาร SP-2



ภาพที่ 4.15 ลักษณะเซลล์ของ *Streptomyces* sp. ที่เลี้ยงบนอาหาร SP-2



ภาพที่ 4.16 โคลนินของ *Streptomyces aminophilus* ที่เลี้ยงบนอาหาร SP-2



ภาพที่ 4.17 ลักษณะเซลล์ของ *Streptomyces aminophilus* ที่เลี้ยงบนอาหาร SP-2



ภาพที่ 4.18 โคลนีของ *Microbispora rosea* ที่เลี้ยงบนอาหาร SP-2



ภาพที่ 4.19 ลักษณะเซลล์ของ *Microbispora rosea*