การแยกเชื้อและการจำแนกสเตรปโตมัยซีสจากดินชายฝั่งของเกาะช้าง จังหวัดตราด

Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from coastal soil of Chang island, Trad.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์[1] จิรวรรณ เพ็ญ[2] ปรากรม ประยูรรัตน์[2]

[1]สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

Rattanaporn Sriwiboon[1] Jirawan Pen[2] Pragrom Prayoonrat[2]

[1]Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi, 20131

2Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อแอคติโนมียซีทจากดินบนเกาะช้าง จังหวัดตราดจำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อหาสเตรปโตมัยซีส ซึ่งเป็นแอคติโนมัยซีทสกุลที่พบว่ามีการสร้างสารแอนติไบโอติกมากที่สุด โดยใช้อาหาร Starch Casein Agar พบแอคติโนมัยซีททั้งหมด 175 ไอโซเลต จากการตรวจสอบโดยใช้วิธีทางสัณฐานวิทยารวมทั้งวิธีทางเคมี คือวิเคราะห์ชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิค และน้ำตาลที่พบในการย่อยสลายเซลล์ทั้งเซลล์ (whole-cell hydrolysate) สามารถจำแนก *Streptomyces* ได้ 30 ไอโซเลต และจัดแบ่งกลุ่มตามสีของสปอร์ (spore mass)ได้ 5 กลุ่ม สีของสปอร์สีเทาแยกเชื้อได้ 9 ไอโซเลต ได้แก่ *Streptomyces* T2-30, *Streptomyces* T2-41, *Streptomyces* T6-17, *Streptomyces* T6-29, *Streptomyces* T6-38, *Streptomyces* T6-43, *Streptomyces* T6-57, *Streptomyces* T6-60 และ *Streptomyces* T7-21 สีของสปอร์สีขาวแยกเชื้อได้ 12 ไอโซเลต ได้แก่ *Streptomyces* T2-36, *Streptomyces* T2-43, *Streptomyces* T3-23, *Streptomyces* T3-28, *Streptomyces* T5-1, *Streptomyces* T5-6, *Streptomyces* T5-7, *Streptomyces* T5-14, *Streptomyces* T6-40, *Streptomyces* T9-11, *Streptomyces* T9-40 และ *Streptomyces* T10-6 สีของสปอร์สีเหลือง น้ำตาลแยกเชื้อได้ 4 ไอโซเลต ได้แก่ *Streptomyces* T5-9, *Streptomyces* T10-12, *Streptomyces* T10-14 และ *Streptomyces* T10-31 สีของสปอร์สีแดง ส้ม แยกเชื้อได้ 4 ไอโซเลต ได้แก่ *Streptomyces* T6-15, *Streptomyces* T7-18, *Streptomyces* T9-17 และ *Streptomyces* T10-8 และพบ *Streptomyces* ที่มีสีสปอร์สีเขียวด้วยอีก 1 ไอโซเลต

คำสำคัญ : สเตรปโตมัยซีส ดินชายฝั่ง

Abstract

Ten soil samples from Koh Chang, Trad province were collected and isolated for Actinomycetes to screen for *Streptomyces*, the most antibiotic producing genus, by using Starch Casein Agar. By chemical studies of diaminopimelic acid in wall peptidoglycan, sugar pattern in whole-cell hydrolysates and morphological study, 30 isolates of *Streptomyces* were found out of 175 isolates of actinomycetes. All *Streptomyces* were grouped according to spore mass color. Nine isolates were found in gray spore mass: *Streptomyces* T2-30, *Streptomyces* T2-41, *Streptomyces* T6-17, *Streptomyces* T6-29, *Streptomyces* T6-38, *Streptomyces* T6-43, *Streptomyces* T6-57, *Streptomyces* T6-60 and *Streptomyces* T7-21. Twelve isolates were found in white spore mass: *Strepto-*

* **Corresponding author.** E-mail : ameepool@yahoo.com

myces T2-36, *Streptomyces* T2-43, *Streptomyces* T3-23, *Streptomyces* T3-28, *Streptomyces* T5-1, *Streptomyces* T5-6, *Streptomyces* T5-7, *Streptomyces* T5-14, *Streptomyces* T6-40, *Streptomyces* T9-11, *Streptomyces* T9-40 and *Streptomyces* T10-6. Four isolates were found in yellow and brown spore mass: *Streptomyces* T5-9, *Streptomyces* T10-12, *Streptomyces* T10-14 และ *Streptomyces* T10-31. Four isolates were found in red and orange spore mass: *Streptomyces* T6-15, *Streptomyces* T7-18, *Streptomyces* T9-17 and *Streptomyces* T10-8 and one isolates of green spore mass, *Streptomyces* T10-15, was also detected.

Keywords : *Streptomyces*, coastal soils

บทนำ

สเตรปโตมัยซีท (Streptomycetes) เป็นแอคติโนมัยซีทที่พบได้ทั่วไปในดิน และเป็นที่รู้จักดีในเรื่องของ คุณสมบัติในการสร้างสารแอนติไบโอติก ทั้งสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส โปรโตซัว สาหร่าย รวมทั้งสารต้านเนื้องอกและสารต้านมะเร็งด้วย โดยพบว่าแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างสารแอนติไบโอติกได้เป็นจำนวนถึง 2 ใน 3 ของสารแอนติไบโอติกที่เรารู้จักกันในปัจจุบัน (Miyadoh, 1997) และจากฐานข้อมูลของสารแอนติไบโอติก (Antibiotic Literature Database, ABL) พบข้อมูลว่าในบรรดาสารแอนติไบโอติกที่เรามีใช้กันอยู่ในปัจจุบันประมาณ 8000 กว่าชนิดนั้น ถูกสร้างขึ้นจากแบคทีเรียในสกุล สเตรปโตมัยซีส (*Streptomyces*) ถึง 45.6 เปอร์เซ็นต์ (Lazzarini, *et al.*, 2000)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นสิ่งที่สำคัญที่จะช่วยแยกความแตกต่างของสเตรปโตมัยซีส (*Streptomyces*) ออกจากแอคติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์ชนิดอื่นๆ และในวงชีวิตของสเตรปโตมัยซีส ก็จะมีลักษณะที่สำคัญหลักๆ ที่ช่วยในการแยกความแตกต่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อยู่ 3 ประการคือ ลักษณะเส้นใยใต้ผิวอาหาร ลักษณะเส้นใยเหนือผิวอาหาร ที่สร้างอาร์โธรสปอร์เป็นสายยาว และ ลักษณะของอาร์โธรสปอร์ ซึ่งลักษณะรูปร่างของเส้นสายสปอร์นี้เองที่มีความสำคัญเด่นชัดในการที่จะอธิบายว่าเป็นสเตรปโตมัยซีสชนิดใด ซึ่งโดยปกติแล้วจะมีความยาวประมาณ 50 อาร์โธรสปอร์ แต่บางชนิดก็พบว่ามีสปอร์ต่อกันเป็นสายโซ่สั้นๆ (น้อยกว่า 10 อาร์โธรสปอร์) (Williams, *et al.*, 1989a; Miyadoh, *et al.*, 1997)

นอกจากนี้สีของกลุ่มสปอร์ของสเตรปโตมัยซีส ก็ยังคงเป็นที่นิยมใช้ในการจัดจำแนก ซึ่งในสเตรปโตมัยซีส จะพบอยู่ 7 กลุ่มสีสปอร์คือ สีน้ำเงิน สีแดง สีเขียว สีแดง สีม่วง สีขาว และสีเหลือง และรวมทั้งสีของเส้นใยใต้ผิวอาหารและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (soluble pigment) ก็มีความสำคัญเช่นกัน (Williams *et. al.*, 1989a) และในทางนิเวศวิทยาแล้วสเตรปโตมัยซีทนับว่ามีบทบาทสำคัญในการช่วยย่อยสลายอินทรีย์สาร ทำให้มีการหมุนเวียนของแร่ธาตุในดินตามธรรมชาติในฐานะผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารเนื่องจากมีเอ็นไซม์หลายชนิด

แอคติโนมัยซีทในสกุล สเตรปโตมัยซีท นับเป็นสมาชิกหนึ่งเดียวที่สำคัญ ของครอบครัว *Streptomycetaceae* ในด้านคุณสมบัติการสร้างสารแอนติไบโอติก และเป็นสกุลที่มีมากถึงประมาณ 450 ชนิด (นับถึง ปี 2540) ชนิดที่พบว่ามีการสร้างสารแอนติไบโอติกที่สำคัญ และมีใช้กันอยู่ในปัจจุบันที่สำคัญ เช่น *Streptomyces griceus* (สร้าง สเตรปโตมัยซิน) *Streptomyces coelicolor* (สร้าง actinorhodin ซึ่งเป็นสารสีน้ำเงิน) *Streptomyces kanamyceticus* (ซึ่งสร้างกานามัยซิน) *Streptomyces* เป็นต้น (Miyadoh, 1997) แต่เนื่องจากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทหรือสเตรปโตมัยซีทจากดินทั่วไปในปัจจุบัน มักพบแต่ชนิดที่สร้างสารแอนติไบโอติกหรือสารเมตาโบไลท์อื่น ๆที่รู้จักแล้ว ดังนั้น ดินตะกอนของทะเลหรือดินบริเวณชายฝั่งทะเลจึงเป็นแหล่งที่มาของการแยกเชื้อเพื่อให้ได้สเตรปโตมัยซีสสายพันธุ์ใหม่ๆ ซึ่งในปัจจุบันพบว่าสเตรปโตมัยซีสชนิดใหม่ หรือสายพันธุ์ใหม่ มีแนวโน้มที่จะให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพใหม่ๆ ด้วยเช่นกัน (Baker, 2004) ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญที่ทำให้ทราบถึงการแพร่กระจายของสเตรปโตมัยซีสของดินชายฝั่งเพื่อใช้ในการวิจัยในขั้นต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

เก็บตัวอย่างจากดินชายฝั่งโดยเลือกดินร่วนที่ไม่แห้งจนเกินไป ใกล้รากพืช หรือใต้ร่มไม้บริเวณต่างๆ ของเกาะช้าง จังหวัดตราด และเก็บลึกจากผิวดิน 5 เซ็นติเมตร เก็บรวมทั้งหมด 10 ตัวอย่าง นำดินแต่ละตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกบ้าง และเป็นการกระตุ้นสปอร์ของแอคติโนมัยซีทด้วย ชั่งตัวอย่างดินตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เจือจางอีกครั้ง โดยถ่ายจากตัวอย่างที่เตรียมมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำ 9 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้สักครู่ให้ดินตกตะกอน ใช้ไปเปตดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร Starch Casein Agar (SCA) เกลี่ยให้ทั่วจาน บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน

เลือกโคโลนีทึบแสงที่มีสีเทา เขียว ม่วง ชมพู แดง เหลือง ส้ม หรือ ดำ ที่มีลักษณะเป็นปุยคล้ายกำมะหยี่ หรือเรียบด้านคล้ายหนังสัตว์มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ หลังจากที่ได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจึงถ่ายเชื้อเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง (SCA) เพื่อไว้ใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อ

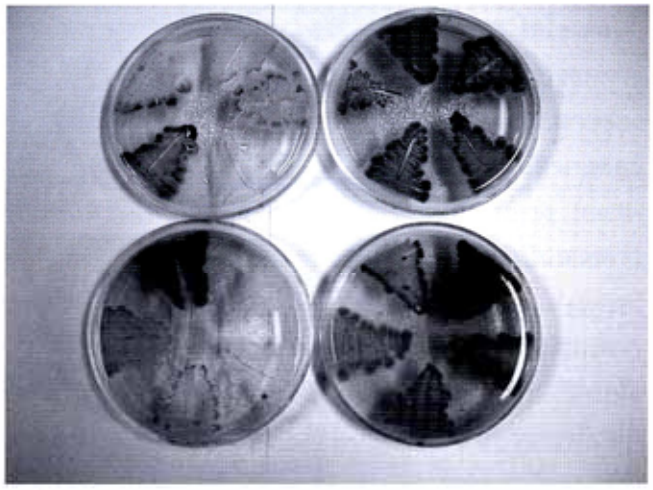
1. การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา

1.1 ตรวจดูการสร้างสีของเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บได้ ในอาหาร SCA บ่มเชื้อที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน หลังตรวจดูสีของกลุ่มสปอร์ (spore mass) และสีของเส้นใยที่อยู่ใต้ผิวของอาหาร (substrate mycelium) รวมทั้งสีที่แพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ (soluble pigment)

1.2 ตรวจดูลักษณะของเส้นใยโดยนำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่บริสุทธิ์ที่เก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียงมาขีด (streak) ลงบนอาหาร SCA แล้วฝังแผ่นกระจกปิดสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไปบนผิวอาหารบริเวณที่ streak เชื้อลงไปนั้น โดยให้แผ่นกระจกปิดสไลด์เอียงทำมุมประมาณ 45 องศา เป็นเวลา 7-10 วัน แล้วจึงนำกระจกปิดสไลด์มาย้อมสีแกรม เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted compound microscope) และ/หรือ กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

2. การทดสอบคุณสมบัติทางเคมี ตามวิธีของ Ruan (1994) และ Lechevalier and Lechevalier (1980)

2.1 วิเคราะห์ชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิค (Diamino pimelic acid, DAP) ในองค์ประกอบของผนังเซลล์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (broth) บ่มไว้ที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 6 วัน นำไปเหวี่ยง เพื่อเก็บเซลล์ โดยใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสข้างบนทิ้งไป แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แช่เซลล์ในแอลกอฮอล์ 95% 1 คืน เก็บเซลล์ด้วยวิธีการกรอง ผึ่งเซลล์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ชั่งเซลล์ 0.01 กรัม (น้ำหนักแห้ง) แช่ในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 6 นอร์มัล นำไปนึ่งในหม้อนึ่ง ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 30 นาที (หรือ 15 นาที2 ครั้ง) กรองเอากากเซลล์ทิ้ง เก็บเอาสารละลายส่วนบนไว้ ระเหยให้แห้งในตู้ควัน (hood) เมื่อแห้งแล้วเติมน้ำกลั่น 3 - 4 หยด เพื่อล้างกรดออกให้หมด ระเหยแห้ง และทำซ้ำอีกอีก 2 ครั้งเติมน้ำกลั่น 0.3 มิลลิลิตร แล้วใช้หลอดแคปิลารี่ดูดสารละลายมาจุด (spot) ลงบนกระดาษโครมาโตกราฟี โดยมี *meso* - DAP และ ไกลซีน ในความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน สารละลายชะประกอบด้วย เมธานอล : น้ำ :ไอโดรคลอริก 10 นอร์มัล : ไพริดีน ในอัตราส่วน 80 : 17.5 : 2.5 : 10 โดยปริมาตร ใช้เวลาชะ 2 ชั่วโมง ตรวจดูตำแหน่งของสารด้วยสารละลายนินไฮดริน 0.4% ใน water saturated butanol ฉีดพ่นสารให้ทั่วแผ่นโครมาโตแกรม แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาทีหรือจนกว่าจะมองเห็นสี



รูปที่ 1 spore mass และ เส้นใยใต้ผิวอาหารสีต่างๆ ของ *Streptomyces* หลังจากที่เลี้ยงเชื้อไว้ 7 วัน บนอาหาร Starch Casein Agar และในบางชนิดสามารถสร้างรงควัตถุแพร่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

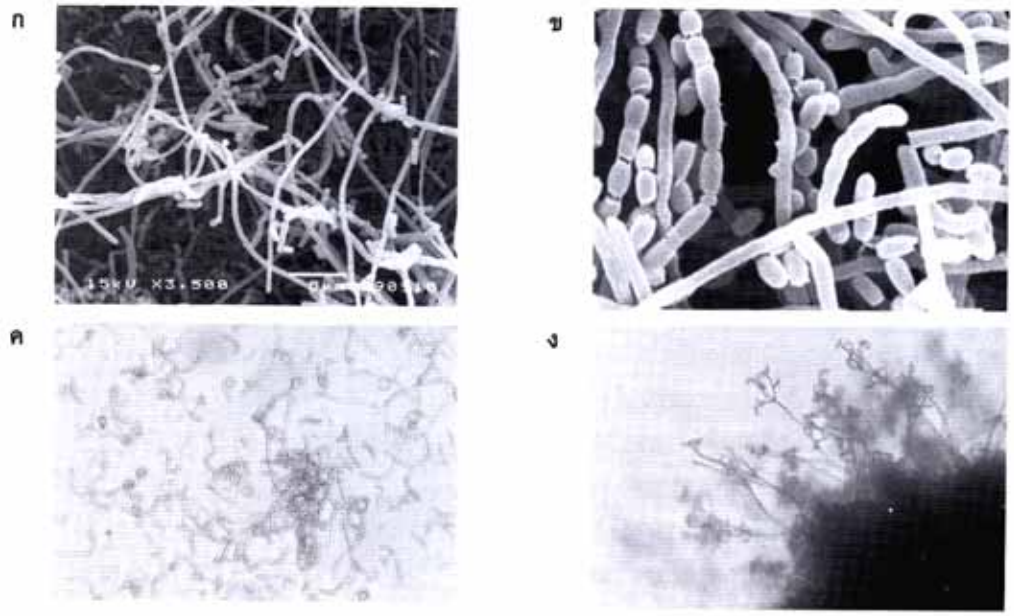
2.2 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลจากการย่อยสลายเซลล์ทั้งหมด โดยเลี้ยงเซลล์และเก็บเซลล์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 ชั่งเซลล์ 0.05 กรัม แช่ในกรดซัลฟุริค เข้มข้น 1 นอร์มัล ประมาณ 1 มิลลิลิตร อบให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง กรองเอาเซลล์ทิ้ง และเก็บสารละลายส่วนบนไว้ โดยปรับ pH ให้ได้ประมาณ 5.0 - 5.5 ด้วย $Ba(OH)_2$ นำไปเหวี่ยงที่ 8000 รอบ 1 นาทีเพื่อให้ตะกอนสีขาวของแบเรียมซัลเฟตตกตะกอน นำส่วนใสข้างบนมาจุดลงบนกระดาษโครมาโตกราฟี โดยมีน้ำตาลกาแลคโตส แมนโนส ไซโลส อะราบิโนส และแรมโนส (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายของไอโซโพรพานอล 10 % ในน้ำ) เป็นสารมาตรฐาน สารละลายชะประกอบด้วย บูทานอล : ไพริดีน : น้ำ : โทลูอีน ในอัตราส่วน 5 : 3 : 3 : 4 ใช้เวลาชะประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อแผ่นโครมาโตแกรมแห้งแล้ว ฉีดพ่นด้วย acid aniline phtalate นำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที หรือจนกว่าจะมองเห็นสาร

2.3 วิเคราะห์ผลและนำมาจำแนกในระดับสกุล ตามวิธีของ Williams, *et. al.* (1989b) และ Williams, *et. al.* (1989a) โดยนำผลที่ได้จากการทดสอบ ทั้งทางสัณฐานวิทยาและทางเคมีมาวิเคราะห์ เพื่อเลือกเอาเฉพาะแอคติโนมัยซีทในสกุล สเตรปโตมัยซิส โดยเลือกเอาผลเฉพาะไอโซเลตที่ผนังเซลล์มี *L*-DAP และไกลซีนเป็นองค์ประกอบ และไม่มีน้ำตาลชนิดใดที่ whole-cell hydrolysate และเป็นไอโซเลต ที่มีลักษณะของเส้นสายสปอร์บิดเป็นเกลียว (spiral) หรือเป็นห่วง หรือเป็นเกลียวสั้น ๆที่ปลาย (loop หรือ retinaculiaperti) ที่ปลายก้านชูสปอร์ หรืออาจมีเส้นสายสปอร์ตรง (rectiflexibile) ซึ่งเป็นลักษณะของสเตรปโตมัยซีท

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและคัดเลือกสเตรปโตมัยซีสจากดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินจากเกาะช้าง จังหวัดตราด จำนวน 10 ตัวอย่าง คัดแยกเชื้อโดยใช้อาหาร Starch Casein Agar แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทและทำให้เชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 175 ไอโซเลต โดยแยกได้จากตัวอย่างดินที่ 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 จำนวน 10,21, 20, 9,15 , 35, 21, 9,15 และ 20 ไอโซเลต ตามลำดับ จากการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาเพื่อตรวจดูลักษณะของเส้นใย (Aerial และ substrate mycelium) และโครงสร้างของเส้นสายของสปอร์ รวมทั้งสังเกตดูสีของกลุ่มสปอร์(spore mass color) รงควัตถุที่ละลายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (soluble pigments) และ จากการเลือกไอโซเลต ที่มีโครงสร้างของเส้นสายสปอร์ ที่มีลักษณะเป็นห่วงหรือเป็นเกลียว1-3 ที่ปลายก้านชูสปอร์ (rectinaculiaperti) ลักษณะตรง (rectiflexibile) และลักษณะเส้นสายสปอร์



รูปที่ 2 Streptomyces ที่มีลักษณะของสายโซ่สปอร์ ชนิดเป็นห่วง ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนกำลังขยาย 3,500 X (ก) ลักษณะตรง (rectiflexibile) ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนกำลังขยาย 7,500 X (ข) ลักษณะ ตรงและ บิดเป็นเกลียวสั้นๆ ที่ปลายสาย (retinaculiaperti) (ค) และลักษณะเป็นบิดเป็นเกลียวสั้นๆ (spiral) (ง)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และทางเคมีบางประการของสเตรปโตมัยซีส ที่แยกได้จากดินเกาะช้าง

Streptomyces	Isolate Number	Wall Chemotype*	Spore chain type
1. Gray spore mass	*Streptomyces* T2-30, T2-41, T6-17, T6-29, T6-38, T6-43, T6-57, T6-60 และ T7 -21	Type I	rectiflexibile, retinaculiaperti, open loop, spiral
2. White spore mass	*Streptomyces* T2-36, T2-43, T3-23, T3-28, T5-1, T5-6, T5-7, T5-14, T6-40, T9-11, T9-40 และ T10-6	Type I	spiral, retinaculiaperti, rectiflexibile, open loop
3. Yellow and brown spore mass	*Streptomyces* T10-12, T10-14, T10-31, และ T5-9	Type I	retinaculiaperti, open loop, spiral
4. Red spore mass	*Streptomyces* T6-15, T7-18, T9-17 และ T10-8	Type I	retinaculiaperti, spiral, open loop
5. Green spore mass	*Streptomyces* T10-15	Type I	spiral

*หมายเหตุ Type 1 ผนังเซลล์แบบที่ 1 มีเปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ประกอบด้วย L-diaminopimelic acid และ glycine และไม่พบน้ำตาลใน whole-cell hydrolysate

ที่บิดเป็นเกลียว (spirals) มาทดสอบทางคุณสมบัติทางเคมี คือทดสอบหาชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิค (diaminopimelic acid, DAP) ที่เป็นองค์ประกอบของเปปติโดไกลแคนของผนังเซลล์ และตรวจหาชนิดของน้ำตาลที่พบใน whole-cell hydrolysate โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีกระดาษ จากขั้นตอนเหล่านี้ พบว่าเป็นสเตรปโตมัยซีส 30 ไอโซเลต จากที่แยกเชื้อทั้งหมดจำนวน 175 ไอโซเลต หรือประมาณ 17.14 เปอร์เซ็นต์ โดยพบจากดินตัวอย่างที่ 6 มากที่สุดคือ 8 ไอโซเลต รองลงมาได้แก่ดินตัวอย่างที่ 10 คือ 6 ไอโซเลต นอกจากนั้นพบจากดินตัวอย่างที่ 2, 3, 5, 7 และ 9 จำนวน 4, 2, 5, 2 และ 3 ไอโซเลต ตามลำดับ และไม่พบ Streptomyces เลยในดินตัวอย่างที่ 1 ตัวอย่างที่ 4 และตัวอย่างที่ 8 ซึ่งแต่ละเชื้อมีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และทางเคมี ดังแสดงในตารางที่ 1

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การแยกเชื้อจากดินจากชายฝั่งเกาะช้าง จังหวัดตราด 10 ตัวอย่างนี้ พบเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมดจำนวน 175 ไอโซเลต และจากการจำแนกชนิดด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา และวิธีทางเคมีพบสเตรปโตมัยซีส 30 สายพันธุ์ แม้ว่าสีของแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนจานอาหารนั้น จะสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของอาหาร ตามการเปลี่ยนแปลงของ pH และตามอายุของเชื้อที่มากขึ้นได้ อย่างไรก็ตามการพิจารณาสีของสปอร์แอคติโนมัยซีทก็ยังคงมีความสำคัญ ซึ่งจากการวิจัยนี้พบสเตรปโตมัยซีทที่สร้างสปอร์ สีต่างๆ แบ่งได้ 5 กลุ่มดังนี้ กลุ่มของสปอร์สีเทาพบ 9 ไอโซเลต กลุ่มของสปอร์ สีขาว 12 ไอโซเลต กลุ่มของสปอร์สีเหลือง น้ำตาลพบ 4 ไอโซเลต กลุ่มของสปอร์สีแดง 4 ไอโซเลต และกลุ่ม ของสปอร์ สีเขียว 1 ไอโซเลต

ความหลากหลายของสเตรปโตมัยซีส ที่พบจากการสังเกตสีของสปอร์และลักษณะรูปร่างของเส้นใยและสายของสปอร์ แม้ว่าหลายไอโซเลต จะมีลักษณะของเส้นสายสปอร์ที่เป็นชนิดบิดเป็นเกลียว (spiral) หรือชนิดเส้นตรง (rectiflexibile) เป็นลักษณะ คล้ายห่วง (loop) หรือ เป็นสายยาวและม้วนเป็นเกลียวที่ปลาย 1- 2 รอบ (retinaculiaperti) ก็พบว่ามีลักษณะความยาวของสายสปอร์ จำนวนรอบของการม้วนเกลียว หรือ ลักษณะที่แตกออกจากเส้นใย รวมทั้งลักษณะการแตกแขนงของเส้นใยที่แตกต่างกัน นับว่าการค้นพบครั้งนี้ มีความหลากหลายมากกว่า รายงานของรัตนาภรณ์ (รัตนาภรณ์, 2541) ที่ทำการแยกเชื้อ แอคติโนมัยซีทจากดินเลน จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา พังงา จากดิน 84 ตัวอย่าง พบสเตรปโตมัยซีส 21 ไอโซเลต แต่ความหลากหลายของสายพันธุ์

จะน้อยเมื่อเทียบกับงานทดลองของ Saadoun และ Al-Momani (Saadoun and Al-Momani, 1997) ที่ทำการสำรวจหาสายพันธุ์ของสเตรปโตมัยซีสจากดินสวนป่าทางเหนือของประเทศจอร์แดนพบสเตรปโตมัยซีส 339 สายพันธุ์จากดิน 45 ตัวอย่าง ในขณะที่การศึกษาของ Sahin และ Ugur(2003) ในประเทศตุรกี ได้รายงานว่าพบสเตรปโตมัยซีสเพียง 74 ไอโซเลตจากดินที่นำมาแยกเชื้อ 46 ตัวอย่าง ความหลากหลายของจำนวนที่แตกต่างกันนี้เนื่องมาจากองค์ประกอบทางกายภาพของดินในแต่ละพื้นที่คือ ปริมาณสารอินทรีย์และความอุดมสมบูรณ์ของดิน ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิและความชื้น ตลอดจนวิธีการแยกเชื้อที่แตกต่างกัน จากรายงานของ Williams และคณะ (Williams, *et al.* 1989a) พบสเตรปโตมัยซีสที่เป็นพวกชอบอุณหภูมิสูงปานกลาง (mesophile) ส่วนใหญ่พบหนาแน่นในดินที่มีปริมาณสารอินทรีย์มาก และความเป็นกรดเป็นเบสอยู่ระหว่าง 6.5-8.0 อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่พบสเตรปโตมัยซีสในตัวอย่างดินที่ 1 และตัวอย่างที่ 8 อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของดิน และสเตรปโตมัยซีสบางสายพันธุ์อาจจะไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ใช้แยกเชื้อ การอบดินก่อนทำการแยกเชื้อที่อุณหภูมิสูงก็อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่ง รวมทั้งทุกขั้นตอนของการแยกเชื้อจะใช้วิธีสุ่มโดยตลอด ทำให้บางครั้งไม่พบแบคทีเรียที่ต้องการขึ้นบนจานเพาะเชื้อเลย อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้เหล่านี้นับเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญที่จะนำไปสู่การค้นหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆ จากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ในขั้นตอนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์. 2541. การเก็บรวบรวมและตรวจหา Actinomycete จากดินป่าชายเลนที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 6:23-33.

Baker, D. 2004. Trip Report: International Society for the Biology of Actinomycetes, 13th Symposium and World Federations of Culture Collections. Workshop onCommercial Uses of Microbial Recources, December 1-7, 2003, Melbourne. Victoria. Australia.

Boomer, S., and Lodge, D. 2001. Soil microbiology project. http://www.wou.edu/las/nstsci__math/biology/boomer/waksman/weekon?soil.html

Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H.A.1980. The chemotaxonomy of actinomycetes. *In Actinomycete Taxonomy* (Special Publication 6), Diet and Thayer (eds). Society for Industrial Microbiology, Arlington, pp227-291

Lazzarini, A.,Cavaletti, L.,Toppo, G. and Marinelli, F. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek. 78: 399-405.

Miyadoh, S., Hamada, M., Hotta, K.,Kudo, T., Seino, A., Vobis, G and Yokota, A.1997. Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan. Tokyo.

Ruan Ji - sheng. 1994. Rapid Isolation and Identification of *Actinomyces* in Southeast Asia. Rapid Method Microbiology and Biotechnology. 39:19-28.

Saadoun, I. and Al - Momani, F. 1997. Activity of North Jordan soil *Streptomycetes* isolates against *Candida albicans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16:139-142.

Sahin, N. and Ugur, A. 2003. Investigation of the antimicrobial activity of some Streptomyces isolates. *Turk Journal* of Biology. 27:79-84

Williams, S. T.,Goodfellow, M. and Anderson, G. 1989a. Genus Streptomyces *Waksman and Henrici1943,339*[AL] *In* Williams, Sharpe, and Holt (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 4. Williams and Wilkins. Baltimore.pp 2452-2492.

Williams, S. T., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. 1989b. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 4. Williams and Wilkins. Baltimore. P2299-2648