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

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินบนเกาะช้าง 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* T2-38, *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* ที่มีสีสปอร์สีเขียวตัวยอีก 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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

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 ตินตะกอนของทะเลหรือดินบริเวณชายฝั่งทะเลจึงเป็นแหล่งที่มาของการแยกเชื้อเพื่อให้ได้สเตรปโตมัยซีสสายพันธุ์ใหม่ๆ 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

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

การตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อ

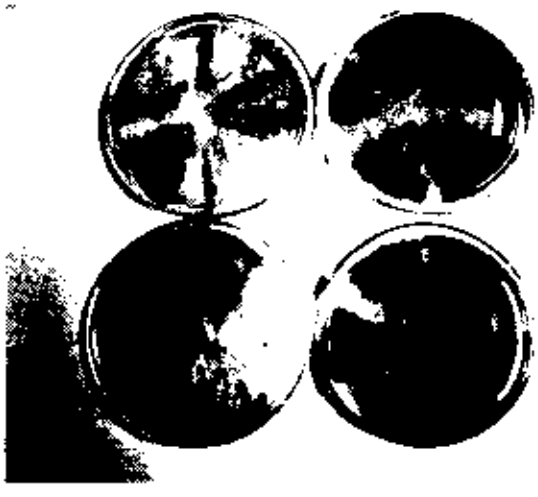
1. การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา

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 เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หักกลับ (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 เทสวนใสข้างบนทิ้งไป 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 แล้วใช้หลอดแคปิลารีดูดสารละลายมาจุด (spot) ลงบนกระดาษโครมาโตกราฟี โดยมี *meso* DAP และ ไกลซีน ในความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน สารละลายชะประกอบด้วย เมธานอล : น้ำ :ไฮโดรคลอริก 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

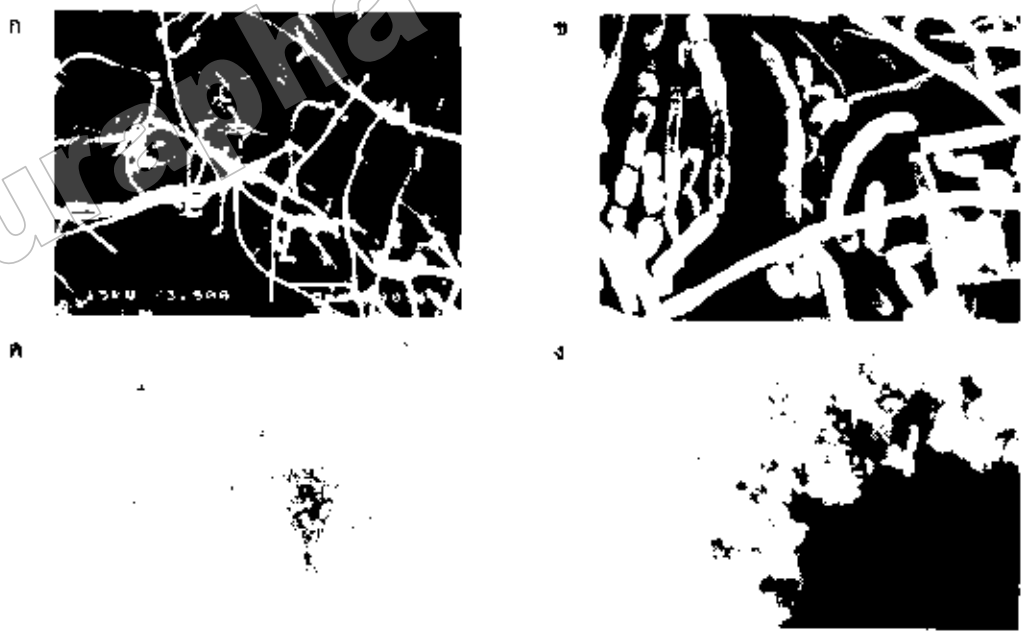
2.2 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลจากการย่อยสลายเซลล์ทั้งหมด โดยเลี้ยงเซลล์และเก็บเซลล์เช่นเดียวกับข้อ 2.1 ชั่งเซลล์ 0.05 กรัม แช่ในกรดซัลฟูริค เข้มข้น 1 นอร์มัล ประมาณ 1 มิลลิลิตร อบให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง กรองเอาเซลล์ทิ้ง และเก็บสารละลายส่วนบนไว้ โดยปรับ pH ให้ได้ประมาณ 5.0 5.5 ด้วย Ba $(OH)_2$ นำไปเหวี่ยงที่ 8000 รอบ 1 นาทีเพื่อให้ตะกอนสีขาวของแบเรียมซัลเฟตตกตะกอน นำส่วนใสข้างบนมาจุดลงบนกระดาษโครมาโตกราฟี โดยมีน้ำตาลกาแลคโตส แมนโนส ไซโลส อะราบิโนส และแรมโนส (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายของไอโซโพรพานอล 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 ตาม วิธีของ Williams. *et al.* (1989b) และ Williams. *et al.* (1989a) โดยนำผลที่ได้จากการทดสอบ ทั้งทางสัณฐานวิทยาและทางเคมีมาวิเคราะห์ เพื่อเลือกเอาเฉพาะแกคติโนมัยซีทในสกุล สเตรปโตมัยซีส 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 จากการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา เพื่อตรวจดูลักษณะของเส้นใย (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 ที่มีลักษณะของสายโซสปอร์ 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 I ผนังเซลล์แบบที่ 1 มีเปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ประกอบด้วย L diaminopimelic acid และ glycine และไม่พบน้ำตาลใน whole-cell hydrolysate

ที่ขดเป็นเกลียว (spirals) มาทดสอบทางคุณสมบัติทางเคมี คือทดสอบหาชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิค (diaminopimelic acid, DAP) ที่เป็นองค์ประกอบของเปปติโดไกลแคนของผนังเซลล์ และตรวจหาชนิดของน้ำตาลที่พบใน whole-cell hydrolysate โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟิกระดาษ จากขั้นตอนเหล่านี้พบว่าเป็นสเตรปโตมัยซีส 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 จะมีลักษณะของเส้นสายสปอร์ที่เป็นชนิดขดเป็นเกลียว (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 ไกโซเลตจากดินที่นำมาแยกเชื้อ 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