ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การควบคุมการเจริญของราบนยางแผ่นดิบโดยแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารต้านรา

ผู้เขียน นายนิคม สุจดา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ. ดร. สายสมร ลำยอง

บทคัดย่อ

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกยางแผ่นธรรมชาติจากต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) รายใหญ่ การเจริญของเชื้อราหลายชนิดบนยางแผ่นดิบ ส่งผลทำให้น้ำหนักและคุณภาพของยางแผ่นดิบลดลง และก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพเกษตรกรผู้ผลิต ด้วยปัญหาดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดแยก บ่งบอกชนิดของเชื้อราที่ปนเปื้อนบนยางแผ่นดิบ และการคัดกรองแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราปนเปื้อน พบว่าสามารถแยกแอคติโนมัยซีทได้จำนวน 213 ไอโซเลท จากดินรอบรากต้นยางพารา โดยใช้อาหารแยกเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ humic acid vitamin (HV) agar, starch casein (SC) agar และ oatmeal (OM) agar และวิธีการ pre-treatment ดิน 4 แบบ อาหาร HV agar และการ pre-treatment ดินด้วย chloramine-T สามารถแยกจำนวนชนิดของแอคติโนมัยซีทได้หลากหลายและมากที่สุด นอกจากนี้แอคติโนมัยซีทอีกจำนวน 50 ไอโซเลท จากดินรังปลวกบริเวณสวนยางพารา เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าสามารถจัดจำแนกอยู่ในกลุ่ม Streptomycetes จำนวน 154 ไอโซเลท (58.5%) กลุ่ม Non-streptomycetes จำนวน 66 ไอโซเลท (25.0%) ประกอบด้วย 11 จีนัส ได้แก่ *Streptoverticillium*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Rhodococcus*, *Kitasatospora*, *Saccharomonospora* และ *Microtetraspora* และไม่สามารถระบุกลุ่มได้จำนวน 43 ไอโซเลท (16.3%)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การแยกและบ่งบอกชนิดของเชื้อราที่ปนเปื้อนบนยางแผ่นดิบจาก 12 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อราได้ 37 ไอโซเลท เชื้อราที่พบส่วนใหญ่จัดอยู่ในจีนัส *Aspergillus* (40.5%), *Fusarium* (29.7%), *Pennicilium* (18.9%) และยังไม่สามารถระบุจีนัสได้ (10.8%) เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราปนเปื้อนบนยางแผ่นดิบ โดยวิธี dual culture พบว่ามีจำนวน 117 ไอโซเลท (44.5%) สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ดี ซึ่งไอโซเลท CMU-NKS-3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราปนเปื้อนได้สูงสุด เมื่อนำไอโซเลท CMU-NKS-3 มาชักนำให้สร้างสารปฏิชีวนะในอาหารหมัก 5 ชนิด และทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี paper disc agar diffusion assay พบว่าอาหาร PDB เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะดีที่สุดในสภาพห้องปฏิบัติการ การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อราของสารสกัดหยาบจากไอโซเลท CMU-NKS-3 ด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Penicillium* sp. NKF-7 และ *Aspergillus* sp. NKF-9 ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.156 mg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับ Benomyl® (6.250 mg mL^{-1} และ 0.781 mg mL^{-1} ตามลำดับ)

นอกจากนี้ยังพบว่าแอคติโนมัยซีทจำนวน 97 ไอโซเลท (36.9%) มีความสามารถในการยับยั้ง ราก่อโรครากขาว *Rigidoporus microporus* และแอคติโนมัยซีทจำนวน 87 ไอโซเลท (33.0%) สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และยีสต์ก่อโรค ทดสอบโดยวิธี cross streak โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-3 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากขาว แบคทีเรีย และยีสต์ ได้สูง โดยมีค่า MIC ต่อ *Rigidoporus microporus* เท่ากับ 0.312 mg/mL^{-1} และมีค่า MIC ต่อแบคทีเรีย และยีสต์ก่อโรค ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29217, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Pseudomonas fluorescens* โดยมีช่วง MIC เท่ากับ 0.156-6.103x10^{-4} mg/mL^{-1} เมื่อเปรียบเทียบกับสารปฏิชีวนะ

เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 42 ไอโซเลท (15.9%) สามารถสร้างรงควัตถุเมลานินได้ และเมื่อนำมาศึกษาความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอร์ พบว่ามีแอคติโนมัยซีทจำนวน 93 (35.4%) ไอโซเลท ที่สามารถสร้างไซเดอโรฟอร์ได้ โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-LRB-172 ให้วงใสสูงสุด (37.3±1.5 mm)

การระบุชนิดของแอคติโนมัยซีทไอโซเลท CMU-NKS-3 โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่ามีความคล้ายคลึงระดับ 99% กับ *Streptomyces padanus* MITKK-103^{T} และเมื่อนำสารสกัดเมตาบอไลต์แห้งไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี ESI-MS และ HPLC MS/MS พบว่าสร้างสารปฏิชีวนะในกลุ่ม Actinomycin C_2 และ Actinomycin V

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อนำเชื้อราที่ปนเปื้อนบนยางแผ่นดิบ 6 ชนิด (*Aspergillus flavus* NKF-1, *Fusarium oxysporium* NKF-2, *Aspergillus* sp. NKF-3, *Penicillium* sp. NKF-7, *Aspergillus niger* NKF-8 และ *Aspergillus* sp. NKF-9) มาศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญบนยางแผ่นดิบ พบว่าเชื้อราเจริญได้ดีที่ 25°C ที่ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ 87.0% และเจริญได้เล็กน้อยที่ 30 และ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ 73.5% กับ 68.5% ตามลำดับ ไม่พบการเจริญของเชื้อราที่อุณหภูมิ 45 และ 50°C

จากการชุบยางแผ่นดิบด้วยสารสกัดเมตาบอไลต์แห้งจาก *Streptomyces* sp. CMU-NKS-3 ด้วยวิธีทำแห้งแบบต่างๆ และนำมาทดสอบด้วยวิธีการเพาะสปอร์ของเชื้อราลงไป พบว่าวิธีทำแห้งแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) สามารถลดการเจริญของเชื้อราได้ดี นอกจากนี้การเติมสารสกัดเมตาบอไลต์จากเส้นใยของ *Streptomyces* sp. CMU-NKS-3 ลงในน้ำยางสดในระหว่างกระบวนการผลิต พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และยังทำให้เกิดสีบนยางแผ่นดิบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Control of Fungal Growth on Unsmoked Rubber Sheet by Antifungal-producing Actinomycetes
Author	Mr. Nikhom Sujada
Degree	Master of Science (Applied Microbiology)
Thesis Advisor	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong

ABSTRACT

Thailand is the biggest producer and exporter of natural rubber or “latex”, from Para rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). There are many kinds of mold growing on rubber sheets which reduce the weight and quality of the rubber sheets and affect the health of farmers and producers. The objective of this study was to isolate and identify fungal contaminant on unsmoked rubber sheets. Later, screening for potential actinomycetes was conducted against fungal contaminants. In this study, 213 actinomycetes derived from rhizospheric soil of rubber trees were isolated by using 3 selective medium such as humic acid vitamin (HV) agar, starch casein (SC) agar and oatmeal (OM) agar, and pre-treatment with four methods. HV agar medium and pre-treatment soil with chloramine-T gave the highest diversity and number of actinomycetes. Addition, 50 isolates of actinomycetes were isolated from termite nest soil in rubber plantation. Based on morphological chemotaxonomic and 16S rRNA gene study were classified actinomycetes found 154 isolates (58.5%) as Streptomycetes, 66 isolates (25.0%) as Non-streptomycetes identified to the genera *Streptoverticillium, Nocardia, Micromonospora, Amycolatopsis, Pseudonocardia, Microbispora, Streptosporangium, Rhodococcus, Kitasatospora, Saccharomonospora* and *Microtetraspora* and 43 isolates (16.3%) remained as unidentified strains. Twelve samples of rubber sheets were subjected to screen fungal contaminants.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thirty-seven fungal strains were isolated from contaminated unsmoked rubber sheets. The most common fungi were identified which morphologically belong to the genera *Aspergillus* (40.5%), *Fusarium* (29.7%), *Pennicilium* (18.9%) and unknown genera (10.8%).

All of actinomycetes isolates were evaluated for their ability to produce antifungal activity by using dual culture method. It was found that 117 isolates (44.5%) exhibited greater potential of antifungal activity against 10 fungal contaminants. It was cultivated in five fermentation liquid media and tested against fungal contaminants using paper disc agar diffusion assay method. Potato dextrose broth (PDB) was the optimal medium for the production of antifungal compounds by isolate CMU-NKS-3. The minimal inhibitory concentrations (MICs) value of crude ethyl acetate extract of isolate NKS-3 against *Penicillium* sp. NKF-7 and *Aspergillus* sp. NKF-9 was 0.156 mg mL^{-1}, which was lower than the MIC of Benomyl®, a commercially available fungicide (6.250 mg mL^{-1} and 0.781 mg mL^{-1}, respectively).

Ninety-seven (39.6%) isolates were active against *Rigidoporus microporus*. Eighty-seven isolates (33.0%) ability to inhibit bacteria and yeast by using cross streak method. Isolate CMU-NKS-3 strongly inhibited all of the pathogenic fungi and against at least one of the bacteria and yeast. The MIC value of crude ethyl acetate extract of isolate CMU-NKS-3 was tested against *Rigidoporus microporus* was 0.312 mg/mL^{-1}, bacteria and yeast against *Bacillus cereus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29217, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Pseudomonas fluorescens* showed the following MICs values range of $1.250\text{-}6.103x10^{-4} mg/mL^{-1}$ when compared with antibiotics.

Melanin production was found in 42 (15.9%) of all actinomycetes isolates. Ninety-three (35.4%) of all actinomycetes isolates can be produce siderophore production. Isolate CMU-LRB-172 (37.3± 1.5 mm) gave the highest clear zone.

Molecular identification based on 16S rRNA gene sequences revealed that the strains showed 99% similarity with *Streptomyces padanus* MITKK-103^T. The crude extract of *Streptomyces* sp. CMU-NKS-3 was measured and identified *via* their ESI-MS and HPLC MS/MS. The result found two known metabolites, Actinomycin C_2 and Actinomycin V.

The effect of temperature on the growth of selected fungal from contaminated on rubber sheets were investigated. Six molds (*Aspergillus flavus* NKF-1, *Fusarium oxysporium* NKF-2,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Aspergillus sp. NKF-3, *Penicillium* sp. NKF-7, *Aspergillus niger* NKF-8 and *Aspergillus* sp. NKF-9) grew very well at 25°C with 87.0 %RH and showed slight growth at 30°C and 37°C with 73.5%, 68.5%RH, respectively. There were not growth when observed at 45°C and 50°C.

Unsmoked rubber sheets were dipped in dried crude extract of *Streptomyces* sp. CMU-NKS-3 preparied various dried methods, and inoculated with selective fungal contaminants. The results showed that crude extract presented by rotary evaporator could be inhibited fungal growth. Moreover, adding of dried crude extract from mycelium of *Streptomyces* sp. CMU-NKS-3 into para rubber process could not inhibited fungal growth, and colorly formation on para rubber sheet.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved