การยับยั้งเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยเชื้อ Actinomycetes

INHIBITION OF *ASPERGILLUS FLAVUS* BY ACTINOMYCETES

อุษณีย์ ศรณรินทร์ และ วิญญู ภักดี*

Usanee Sornnarain and Winyou Puckdee*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี อ.เมือง จ.จันทบุรี 22000

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Muang, Chanthaburi 22000

บทคัดย่อ

เชื้อ *Aspergillus flavus* เป็นเชื้อราที่สามารถสร้างสารพิษที่ชื่อว่า Aflatoxin ซึ่งมักพบในผลผลิตทางการเกษตร และเป็นอันตรายกับสิ่งมีชีวิต ส่วนเชื้อกลุ่ม Actinomycetes เป็นเชื้อที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อชนิดอื่นๆ ได้ (antibiotic) ในการศึกษานี้จึงทำการแยกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes จากป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่อง-มาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้จำนวน 95 isolates เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* พร้อมกับเชื้อทดสอบควบคุมอื่นๆ คือ Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA 815), *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 และ *Candida albicans* TISTR 718 ด้วยวิธีการขีดขวาง พบผลการยับยั้งจำนวน 5 (5.26%), 15 (15.79%), 38 (40.00%) และ 3 (3.16%) isolates ตามลำดับ นอกจากนั้นยังได้ทำการตรวจดูลักษณะเส้นใยของเชื้อ *A. flavus* ตรงบริเวณที่ถูกยับยั้งเทียบกับบริเวณที่ไม่ได้สัมผัสเชื้อ Actinomycetes พบว่าเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งมีขนาดเล็กลงและไม่พบการสร้างสปอร์และโคนิเดีย

Abstract

Aspergillus flavus is an aflatoxin-producing fungus. Aflatoxin is a liver-toxin that is released into crops and then act as a poison. Actinomycetes are a group of antibiotic-producing bacteria always found in soil. Ninety-five actinomycete isolates were isolated from 17 samples of soil in the plant genetic conservation forest at Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi province. The inhibition of *A. flavus* and other control microorganisms; Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA 815), *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 and *Candida albicans* TISTR 718 were tested by the cross streak method. Results of inhibition were 5 (5.26%), 15 (15.79%), 38 (40.00%) and 3 (3.16%) of actinomycetes isolates, respectively. Microscopic examination of mycelium of *A. flavus* in the inhibition zone showed the hyphae to be smaller and no conidia were produced.

คำสำคัญ: แอสเปอร์จิลลัส ฟลาวัส, แอคติโนมายซิส, อาฟลาทอกซิน, เทคนิคการขีดขวาง

Keywords: *Aspergillus flavus*, Actinomycetes, Aflatoxin, Cross streak method.

*ติดต่อนักวิจัย: วิญญู ภักดี (อีเมล์ win2ku@yahoo.com)

*Corresponding author: Winyou Puckdee (Email: win2ku@yahoo.com)

บทนำ

เชื้อรา *A. flavus* เป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไป อยู่ได้ในที่ความชื้นไม่มากและในสภาพที่เป็นกรดอ่อนๆ จึงมักพบอยู่ทั่วไป สามารถก่อโรคได้หลายแบบ เช่น allergic aspergillosis, aspergilloma, invasive aspergillosis และ otomycosis (นงนุช, 2540) แต่ที่สำคัญคือราชนิดนี้สามารถสร้างสารพิษที่ชื่อว่า aflatoxin ได้ โดยเมื่อได้รับและมีการสะสมเป็นระยะ เวลานานอาจทำให้เป็นโรคมะเร็งตับได้ นอกจาก นี้เชื้อรา *A. flavus* ยังเป็นปัญหากับพืชเศรษฐกิจ อีกด้วย โดยเฉพาะพืชจำพวกถั่วเพราะเชื้อราจะเจริญบนเมล็ดถั่วและปลดปล่อยสารพิษ aflatoxin ออกมาและสะสมอยู่ในเมล็ดถั่วนั้น ซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดไว้ว่าต้องมี aflatoxin ปนเปื้อนอยู่ในอาหารได้ไม่เกิน 20 μg ต่ออาหาร 1 kg หรือไม่เกิน 20 ppb (กระทรวงสาธารณสุข, 2529) ดังนั้นด้วยสภาพภูมิอากาศในประเทศไทยที่มีความชื้นสูง และอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา จึงเป็นการยากในการควบคุมการปนเปื้อนของราชนิดนี้ ส่วนเชื้อ actinomycetes เป็นเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา แต่มีขนาดเล็กกว่า มักพบอาศัยอยู่ในดิน มีรายงานการสร้างสารต้านจุลชีพได้ ซึ่งเป็นสาร secondary metabolite ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของเชื้อนั้นๆ จากหลายๆ รายงานก่อนหน้านี้ พบว่าสามารถแยกเชื้อ actinomycetes ที่สามารถยับยั้งการเจริญของทั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ฯลฯ (Okay, 2004) หรือเชื้อรา เช่น *Candida albicans* และ *Phytopthera* sp. (รัตนาภรณ์, 2541; Park, 2002) ดังนั้นจึงมีแนวคิด ในการแยกและใช้เชื้อ actinomycetes มาควบคุม และยับยั้งเชื้อ *A. flavus* จุดประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อแยกและทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ของ Actinomycetes จากดินในป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี และจะศึกษาสาเหตุของการยับยั้งเชื้อทดสอบของ actinomycetes ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. <u>การเก็บตัวอย่างดิน</u> ทำการสุ่มเก็บในพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี จำนวน 17 จุดๆ ละ 2 ตัวอย่าง โดยตักดินที่อยู่ลึก 5 - 10 เซนติเมตร เก็บใส่ถุงพลาสติกเพื่อนำไปแยกเชื้อต่อไป

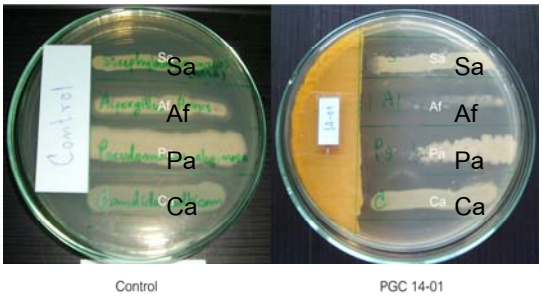
2. <u>การแยกเชื้อ Actinomycetes จากดิน</u> ทำการวัดค่า pH ของดินแต่ละตัวอย่างและแบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และส่วนที่สองอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำการชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ทั้งสองส่วนแล้วทำการเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) ด้วย 0.85% normal saline จากนั้นทำการ spread plate โดยถ่ายสารละลายของดินที่อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเข้มข้นที่ 10^{-3} และส่วนที่อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ใช้ความเข้มข้นที่ 10^{-2} ตัวอย่างละ 0.1 ml ลงบนอาหาร starch casein agar (SCA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นโดยพิจารณาจากโคโลนีที่ทึบแสง ผิวและขอบขรุขระ สีมีทั้งเทา เขียว ชมพู แดง ส้ม หรือเหลือง และลักษณะของโคโลนีที่ปุยคล้ายกำมะหยี่ แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และทำการย้อมแกรม เพื่อดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยเลือกเชื้อที่มีลักษณะเป็นเส้นใย หรือเลือกที่มีลักษณะ

ของ actinomycetes เก็บเชื้อที่ได้ในอาหาร tryptic soy agar (TSA) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาต่อไป

3. <u>การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* และเชื้อทดสอบควบคุมอื่นๆ โดยวิธี cross streak method</u> ทำการเลี้ยงเชื้อ actinomycetes โดยการ streak ลงบนอาหาร Muller Hinton (MH) agar ให้ชิดขอบจานเพาะเชื้อให้ได้ขนาดพื้นที่เป็น 1 ใน 4 ของจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เตรียมเชื้อ *A. flavus* และ *C. albicans* ใน potato dextrose broth (PDB) และ Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA 815) และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 ใน tryptic soy broth เชื้อทดสอบทั้ง 4 ชนิด บ่มที่อุญหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อที่ใหม่และพร้อมต่อการทดลอง แล้วใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อชุบในเชื้อทดสอบแล้วขีดตั้งฉากและห่างจากรอยขีดของเชื้อ actinomycetes เดิม 1 mm แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการถูกยับยั้งของเชื้อทดสอบ ศึกษาลักษณะและสัณฐานวิทยาของเชื้อ actinomycetes ที่ให้ผลยับยั้งเชื้อ *A. flavus* โดยดูการสร้างสีโคโลนีของเชื้อบนอาหาร SCA ภายหลังบ่มนาน 14 วัน ลักษณะเส้นใยและสปอร์จาก cover slide culture ศึกษาลักษณะและสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* ในบริเวณที่ถูกยับยั้ง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองสามารถแยกเชื้อ actinomycetes จากดินในป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ได้ทั้งหมด 95 isolate เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* พร้อมกับเชื้อทดสอบควบคุมอื่นๆ ด้วยวิธี cross streak method พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อที่นำมาทดสอบได้ทั้งหมด 39 isolate คือ สามารถยับยั้งเชื้อ *A. flavus* จำนวน 5 isolates เชื้อ Methicilin-Resistant *S. aureus* (MRSA 815) จำนวน 15 isolates เชื้อ *P. aeruginosa* (TISTR 781) จำนวน 38 isolates และเชื้อ *C. albicans* (TISTR 718) จำนวน 3 isolates



รูปที่ 1 แสดงผลการยับยั้งเชื้อ Methicilin-Resistant *S. aureus*; Sa, *A. flavus*; Af, *P. aeruginosa*; Pa และ *C. albicans*; Ca อายุ 24 ชั่วโมง ของ actinomycetes รหัส PGC 14-01 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar

นอกจากนั้นได้ทำการตรวจสอบลักษณะการสร้างเม็ดสีลักษณะเส้นใยและ สปอร์ของเชื้อ actinomycetes ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. flavus* ได้ พบว่ามีลักษณะคือ เชื้อรหัส PGC2-02 และ PGC14-01 เป็นเชื้อในกลุ่ม *Actinomadura* sp., เชื้อรหัส PGC5-03 เป็นเชื้อในกลุ่ม *Saccharomonospora* sp. และเชื้อรหัส PGC10-08 และ PGC14-07 เป็นเชื้อในกลุ่ม *Nocardiopsis* sp. และยังตรวจดูลักษณะเส้นใยของเชื้อ *A. flavus* ตรงบริเวณที่ถูกยับยั้งเปรียบเทียบกับบริเวณที่ไม่ได้สัมผัสเชื้อ actinomycetes ทั้ง 5 ชนิด พบว่าเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งมีขนาดเล็กลง และไม่พบการสร้างสปอร์ และ conidia จากการทดลองจะพบว่ายังไม่ได้ทดสอบว่าการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้งหมดของเชื้อ actinomycetes ที่เกิดขึ้นนี้ เกิดขึ้นจากตัวเชื้อหรือสารที่ตัวเชื้อหลั่งออกมา จึงต้องมีการทดสอบต่อไป

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี และโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ประกาศกระทรวงสาธารณ สุข 21 ม.ค. 2529 [cited 2007 Mar 29]; (98): [1 screen]. Available from: URL: http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/food/ntfmoph/ntf098.htm.

นงนุช วณิตย์ธนาคม. 2540. วิทยาเชื้อรา การแพทย์. พี.บี. ฟอเรนบุ๊คส์เซ็นเตอร์. กรุงเทพฯ.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์. 2541. การเก็บรวบรวมและการตรวจหา Actinomycetes จากดินป่าชายเลนที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 6(1): 23-33.

Lukic, A., Welty, R.E. and Lucus, G.B. 1972. Antifungal spectra of actinomycetes isolated from Tobacco. Antimicrob. Agents Chemother. 1(4): 363-365.

Oskay, M., Tamer, A.U. and Azeri, C. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. Afr. J. Biotechnol. 3(9): 441-446.

Park, J.O., El-Tarabily, K.A., Ghisalberti, E.L. and Sivasithamparam, K. 2002. Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. Lett. Appl. Microbiol. 35: 361-365.