

50401208 : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ : แอคติโนมัยสีท / ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย / *Ralstonia solanacearum* / การควบคุมโดยชีววิธี

นวลรัตน์ หนูขาว : การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อ. ดร.บุษยา อภิชัยเสถียรโชติ, รศ. ดร.สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์ และ ญ. รศ. ดร.ชุตินา ลิ้มมัททาภิรัตน์. 110 หน้า.

ทำการแยกแอคติโนมัยสีทจากลำต้น ใบ ราก และดินรอบรากของต้นมะเขือเทศจากสวนเกษตรอินทรีย์ในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี และกาญจนบุรี พบว่าสามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้รวมทั้งสิ้น 107 สายพันธุ์ โดยแยกมาจาก ราก (6), ลำต้น (20), ใบ (8) และดินบริเวณรอบราก (73) แล้วทำการทดสอบฤทธิ์การสร้างสารต้านแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* พบว่า แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ KM 1.1-7.9 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญสูงสุด นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ต้าน *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ KM 1.1-7.9 โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา ชีวเคมี องค์ประกอบของผนังเซลล์ และการตรวจสอบลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA พบว่า แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ KM 1.1-7.9 เป็น *Streptomyces vinaceusdrappus* โดยมี % similarity เท่ากับ 100% ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะโดยใช้อาหารเหลว Glucose malt extract peptone (GMP) บนเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 9 วัน พบว่า สารสกัดอาหารเหลวจากเอทิลอะซีเตดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *R. solanacearum* สารสกัดหยาบแต่ละชนิดถูกแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 พบว่าส่วนสกัด EX1-003 สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ นอกจากนี้ยังสามารถแยกสารอีก 2 ชนิด คือ EX2-002-2 และ EX2-002-3 แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย มาทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี พบว่า EX2-002-2 เป็นสารในกลุ่ม diglycerides และ EX2-002-3 คาดว่าเป็นสารในกลุ่ม glycerides ที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรเมติก จากการศึกษาคงตัวของสารสกัดอาหารเหลวจากเอทิลอะซีเตด พบว่า สารสกัดหยาบมีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดค่า 7.8 เมื่อเก็บไว้นาน 8 สัปดาห์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

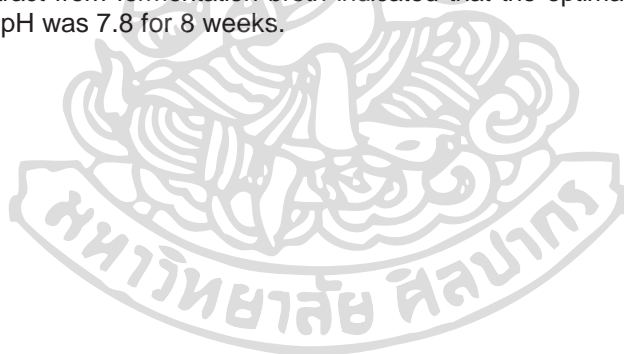
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. 2. 3.

50401208 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : ACTINOMYCETES / ANTIBACTERIAL ACTIVITY / *RALSTONIA SOLANACEARUM* / BIOLOGICAL CONTROL

NUANRAT NUKHAW : ISOLATION AND SELECTION OF ACTINOMYCETES FOR ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST *RALSTONIA SOLANACEARUM* CAUSING BACTERIAL WILT OF TOMATO. THESIS ADVISORS : BUSAYA APICHAISATAIENCHOTE, Ph. D., ASSOC. PROF. SOMBOON TANASUPAWAT, Ph. D, AND ASSOC. PROF. CHUTIMA LIMMATVAPIRAT, Ph. D., 110 pp.

One hundred and seven strains of actinomycetes were isolated from surface stems (20), leaves (8), roots (6) and rhizospheric soils (73) of healthy tomato plants grown in organic farms in Nakhon Pathom, Ratchaburi and Kanchanaburi provinces. Actinomycete strain KM 1.1-7.9 showed the most antibacterial activity against *R. solanacearum*. Furthermore, it also inhibited *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Based on morphology, cultural characteristics, biochemical properties, cell wall compositions and 16S rRNA gene sequencing analysis, the strain KM1.1-7.9 was identified as *Streptomyces vinaceusdrappus* with similarity 100%. It was cultured in Glucose malt extract peptone (GMP) as antibiotic production medium on a rotary shaker with 200 rpm at 30°C for 9 days. It was found that the ethyl acetate extract of fermentation broth inhibited *R. solanacearum*. Each crude extract was isolated by Sephadex LH-20 column. The result showed that the EX1-003 fraction inhibited *R. solanacearum*, but the EX2-002-2 and EX2-002-3 fractions couldn't inhibit the growth of bacteria. The study of chemical structures of EX2-002-2 and EX2-002-3 fractions using nuclear magnetic resonance spectroscopy found that the EX2-002-2 fraction was diglycerides and the EX2-002-3 fraction was supposed to be glycerides consisting of an aromatic ring. The study of stability test of the ethyl acetate extract from fermentation broth indicated that the optimal temperature was -80 °C and the optimal pH was 7.8 for 8 weeks.



Department of Biotechnology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2011

Student's signature

Thesis Advisors' signature 1. 2. 3.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือเป็นอย่างดีของ อ.ดร.บุษยาอภิชาติเสถียรโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์ และภญ.รศ.ดร.ชุติมา ลิ้มมัทวาริทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็น และความช่วยเหลือ ในด้านต่างๆ พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ภญ.รศ.ดร.เพ็ญพรรณ เวชวิทยาคลัง ที่กรุณาได้รับเป็นประธาน กรรมการ และผศ.ดร.เกียรติวี ชวงค์โกมล ซึ่งกรุณาได้รับเป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ในการ ตรวจสอบวิทยานิพนธ์นี้ พร้อมทั้งได้กรุณาให้ข้อเสนอแนะ และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่ได้อำนวยความสะดวก และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณนายโกเมศ แสงอุทัย ที่อำนวยความสะดวกด้านต่างๆ นายนิศ พลอยเจริญ และนางสาวนารีรัตน์ เจนลาภวัฒน์กุล ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้ให้ทุนสนับสนุน งานวิจัย

ท้ายที่สุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับบิดา มารดา น้อง และครอบครัว ของผู้วิจัย ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้โอกาส และสนับสนุนในทุกด้านเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

คุณค่าและประโยชน์ที่พึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน