

การคัดแยกและจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทจากดินที่มีฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลาย

Isolation and Identification of Actinomycetes from Soil for Controlling *Aedes aegypti* Larvae

ปามิน ทิมเจริญสมบัติ¹ ปภพ สินชยกุล^{1*} วิชัย สรพงษ์ไพศาล² และอารยา บุญศักดิ์³

Pamin Timcharoensombut¹ Pabhob Sinchayakul^{1*} Wichai Sorapongpaisal² and Araya Bunsak³

Received: June 11, 2021

Revised: July 15, 2021

Accepted: July 16, 2021

Abstract: *Aedes aegypti* is not only an annoying insect but also a carrier of many diseases to humans. Many control methods have been applied continuously. Microbial control using microorganism or its product is becoming outstanding because of highly efficiency, easily to apply and normally safe to human and environment. The objective of this research was to isolate and identify actinomycetes from soil for controlling *Aedes aegypti* larvae. Soil samples were collected from 2 collecting sites in Mae Hong Son Province with 20 soil samples/site. Actinomycetes were isolated using serial dilution technique from soil suspension and spread on starch casein agar (SCA) plates. The actinomycetes colonies were picked up and cultured in glucose yeast malt (GYM) liquid media for 21 days and extracted using high speed centrifuge at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant of culture medium was collected, adjusted to 5% concentration and used for efficacy test on 10 mosquito larvae (3rd stage). The isolate with the highest efficacy of crude extract to control mosquito larvae was selected and processed for 2 steps: first, to determine the efficacy of their crude extracts on mosquito larvae as above after being cultured in 5 liquid media: GYM, GYB, SY, ISP1 and ISP3 and second, to search for the related species using phylogenetic analysis based on ITS of 16S rDNA sequence. The result revealed that the total of 195 isolates of Actinomycetes were screened from all soil samples. Only was the crude extract of MSsm 007-6 the highest efficacy to control mosquito larvae with 50% mortality at 48 hours after application. The crude extracts of MSsm 007-6 cultured in GYM, Glucose Yeast extract Broth (GYB) and SY liquid media had high efficacy to control mosquitos at 73.3, 96.7 and 63.3 % mortality, respectively. The Neighbor-Joining phylogenetic analysis represented that ITS of 16S rDNA sequence of MSsm 007-6 was very closely related to *Streptomyces kasugaensis* strain M338-M1 with supporting bootstrap value at 75%

Keywords: Actinomycetes, *Aedes aegypti*, 16S rDNA, phylogenetic

¹ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Department of Entomology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, Thailand 73140.

²ศูนย์วิจัยและบริการวิชาการ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Center for Research and Academic Outreach, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, Thailand 73140.

³คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand 65000.

* Corresponding author: agrsci@ku.ac.th.

บทคัดย่อ: ยุงลาย ไม่เพียงแต่เป็นแมลงที่สร้างความรำคาญให้กับมนุษย์เท่านั้น แต่ยังเป็นพาหะนำโรคหลายชนิดสู่มนุษย์ด้วย วิธีการควบคุมหลากหลายรูปแบบถูกนำมาใช้กับยุงลายอย่างต่อเนื่อง วิธีการควบคุมโดยเชื้อจุลินทรีย์หรือสารผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ เป็นวิธีการควบคุมที่กำลังมีบทบาทสำคัญ เพราะมีประสิทธิภาพสูง ใช้สะดวก และปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม วัตถุประสงค์ ของการศึกษานี้คือเพื่อคัดแยกและจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทจากดินที่มีฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) โดยเก็บตัวอย่างดินป่าในพื้นที่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน จำนวน 2 พื้นที่ พื้นที่ละ 20 ตัวอย่าง คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากสารแขวนลอยดิน โดยวิธีเจือจางลดหลั่นต่อเนื่องและเทคนิคเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch casein agar (SCA) เพาะเลี้ยงเชื้อในสารอาหารเหลว glucose yeast malt (GYM) 21 วัน สกัดหยาบอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนของเหลวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับความเข้มข้นเป็น ร้อยละ 5 เพื่อใช้เป็นสารสกัดหยาบสำหรับทดสอบกับลูกน้ำยุงลาย วัยที่ 3 จำนวน 10 ตัว คัดเลือกไอโซเลตเชื้อที่พบว่าสารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงได้สูงสุด เพื่อศึกษาในอีก 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากอาหารเหลว 5 ชนิด คือ GYM, GYB, SY, ISP1 และ ISP3 ที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกกับลูกน้ำยุงลายวัยที่ 3 ส่วนที่ 2 ค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด โดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากสายพันธุ์กรรม ITS ของ 16S rDNA ผลการศึกษพบเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวนทั้งหมด 195 ไอโซเลตจากตัวอย่างดินทั้งหมดที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ สารสกัดหยาบจากเชื้อไอโซเลต MSsm 007-6 เพียงชนิดเดียวที่มีผลต่อการตายของลูกน้ำยุงลายวัยที่ 3 ร้อยละ 50 ที่ 48 ชั่วโมงหลังสัมผัสสาร โดยสารสกัดหยาบจากอาหารเหลว GYM, Glucose Yeast และ SY ที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อไอโซเลต MSsm 007-6 ที่มีประสิทธิภาพทำให้ลูกน้ำยุงตายในอัตรา ร้อยละ 73.3, 96.7 และ 63.3 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-Joining พบว่า สายพันธุ์กรรม ITS ของ 16S rDNA ของเชื้อไอโซเลต MSsm 007-6 มีความใกล้ชิดกับเชื้อ *Streptomyces kasugaensis strain M338-M1* มากที่สุด โดยมีค่า bootstrap รองรับที่ร้อยละ 75

คำสำคัญ: เชื้อแอคติโนมัยซีท ยุงลาย 16S rDNA การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

คำนำ

ยุงลาย (*Aedes aegypti*) จัดอยู่ในวงศ์ Culicidae อันดับ Diptera เป็นแมลงปากเจาะดูด มีความสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข ในประเทศแถบเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทย ทั้งนี้ยุงลายนอกจากสร้างความรำคาญและดูดกินเลือดจากมนุษย์และสัตว์เลี้ยงแล้ว ยังเป็นพาหะนำโรคหลายชนิดสู่มนุษย์ ที่สำคัญคือโรคไข้เลือดออก (dengue fever) (Singh and Prakash, 2012) โรคไข้เหลือง (yellow fever) (Christophers, 1960) โรคชิคุนกุนยา (chikungunya) (Thavara *et al.*, 2009) โรคไข้ซิกา (Zika Fever) (Izquierdo-Suzán *et al.*, 2019) ซึ่งโรคเหล่านี้ก่อให้เกิดการสูญเสียชีวิตของประชากรและสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อมอย่างต่อเนื่อง งบประมาณที่ใช้เกี่ยวกับยุงลาย

ในแต่ละปีนั้นมีจำนวนมหาศาล คิดเป็นมูลค่านับพันล้านบาทต่อปี เพื่อใช้ในส่วนของการให้ความรู้ในการจัดการแหล่งน้ำ การเฝ้าระวังและการป้องกันกำจัดในระดับครัวเรือน พื้นที่ชุมชนเทศบาล ท้องถิ่น จังหวัด หรือกระทรวงสาธารณสุข และค่าใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยอันเนื่องมาจากโรคต่างๆ ที่มียุงลายเป็นพาหะ การควบคุมยุงลายดำเนินการทั้งในช่วงที่ยุงอยู่ในระยะตัวอ่อน (ลูกน้ำยุง) และตัวเต็มวัย แม้ว่าวิธีการควบคุมมีทางเลือกที่หลากหลาย แต่วิธีการที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือการใช้สารเคมีฆ่าแมลง (Oliveira *et al.*, 2017) เนื่องจากให้ผลการควบคุมที่ชัดเจน สะดวก รวดเร็ว และมีเทคนิคการพ่นสารให้เลือกหลายวิธีการ เช่น ในกรณีตัวเต็มวัย นิยมใช้สารแบบกระป๋องพ่นพกพา (aerosol) หรือเครื่องพ่นแบบหมอกควัน (hot air smoke applicator) ส่วนตัวอ่อนนิยมใช้ทรายเคลือบสารที่มีฟอส (Temefos) ใส่ในแหล่งน้ำเพื่อ

ในการกำจัดลูกน้ำยุงลายเป็นหลัก ซึ่งสารเคมีดังกล่าว ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศทั้งหมด อย่างไรก็ตาม สารเคมีฆ่าแมลงจัดเป็นสารพิษที่มีอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม เมื่อใช้ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง มักประสบปัญหา ยุงลายต้านทานต่อสารเคมีฆ่าแมลง (อรัญ และคณะ, 2559) ทำให้ต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารให้สูงขึ้น หรือเปลี่ยนสารชนิดใหม่ทดแทน ดังนั้นความจำเป็นในการพัฒนาสารชนิดใหม่ๆ จึงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในส่วนของ การควบคุม ยุงลายนั้น จำเป็นต้องพิจารณาถึงความปลอดภัยของ ผู้ใช้ ผู้ใกล้ชิด รวมทั้งชุมชนโดยรวมเป็นหลักสำคัญ ร่วมกับประสิทธิภาพการควบคุม สารที่พัฒนาขึ้นจึง มักเริ่มต้นจากสารในธรรมชาติเป็นหลักเช่น สารสกัด พืช จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์ (Lacey, 2007) โดย จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในช่วงที่ผ่านมาได้แก่ เชื้อ *Bacillus thuringiensis* เป็นต้น (Tetreau *et al.*, 2018) นอกจากนี้สารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม แอคติโนมัยซีท (actinomycetes) เป็นอีกทางเลือกที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับในเชิงของความปลอดภัยโดยทั่วไป (Liu *et al.*, 2008; Anwar *et al.*, 2014) เช่น สาร spinosad จากเชื้อแอคติโนมัยซีท *Saccharopolyspora spinosa* (Bond *et al.*, 2004) สามารถใช้ควบคุมลูกน้ำยุงได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีท ชนิดใหม่ๆ ที่ผลิตสารพิษที่มีประสิทธิภาพในการ กำจัดลูกน้ำยุงลายเป็นหลัก โดยทำการคัดแยกเชื้อ จากดินป่า (Takizawa *et al.*, 1993) ในพื้นที่จังหวัด แม่ฮ่องสอน และคัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมเพื่อพัฒนา เป็นสารป้องกันกำจัดลูกน้ำยุงลายต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินใน 2 พื้นที่คือ บริเวณริม แม่น้ำปาย อำเภอเมือง และรอบๆ อุทยานแห่งชาติ สบเมย อำเภอสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน พื้นที่ละ 20 จุดๆ ละ 5 จุดเก็บย่อย ที่ระดับความลึกของดิน 5-10 เซนติเมตร จากผิวดิน ผสมรวมกันเป็น 1 ตัวอย่างดิน บรรจุลงถุงโพลีเอทิลีนที่ผ่านการฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำกลับมาละลายที่อุณหภูมิห้อง

การคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างดินปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวด ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วย เครื่องเขย่าเป็นเวลา 45 วินาที เจือจางสารแขวนลอย ตัวอย่างดิน 4 ระดับคือ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} ด้วยเทคนิค serial dilution technique คัดแยก แอคติโนมัยซีท โดยใช้สารแขวนลอยดินที่เจือจาง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch casein agar (SCA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ตรวจโคโลนีแอคติโนมัยซีทที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดแยกเชื้อที่พบแต่ละ ไอโซเลต และใส่รหัสสำหรับใช้อ้างอิงในการทดสอบ ในขั้นต่อไป

การสกัดยับยาสารจากแอคติโนมัยซีท

เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลต ที่คัดแยกได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM ชนิดเหลว ปริมาตร 120 มิลลิลิตร เขย่าขวดอาหารที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็น เวลา 20 วัน ทำการสกัดสารจากเชื้อ โดยปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นของเหลวในขวดสีชา เพื่อใช้ทดสอบกับ ลูกน้ำยุงลายต่อไป

การเลี้ยงลูกน้ำยุงลาย

เลี้ยงเพิ่มจำนวนลูกน้ำยุงลายจากระยะไข่ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย โดยนำแผ่นไข่ที่ได้รับแช่ ในน้ำสะอาดภายใต้ห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ $80 \pm 10\%$ และการควบคุมแสง 12:12 L:D เป็นเวลา 1-2 วัน เมื่อ ไข่ฟักเป็นลูกน้ำ ย้ายลูกน้ำลงในภาชนะพลาสติกขนาด $27 \times 42 \times 9$ เซนติเมตร ที่มีน้ำสะอาด 1,500 มิลลิลิตร เลี้ยงด้วยอาหารปลาประมาณ 5-6 เม็ด จนกระทั่ง ลูกน้ำยุงลายเข้าสู่วัยที่ 3 (Anwar *et al.*, 2014; Balakrishnan *et al.*, 2016)

การทดสอบสารสกัดยับยาสารจากแอคติโนมัยซีทกับ ลูกน้ำยุงลาย

เตรียมสารสกัดยับยาสารจากแอคติโนมัยซีท แต่ละไอโซเลตที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในแก้วพลาสติกขนาด 30 มิลลิลิตร

ใส่ลูกน้ำยุงลายวัยที่ 3 จำนวน 10 ตัวต่อแก้วพลาสติก บันทึกผลการตายของลูกน้ำยุงลายที่ 24 และ 48 ชั่วโมง วิเคราะห์อัตราการตาย และคัดเลือกไอโซเลตของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ให้ผลการตายสูงกว่าร้อยละ 50 (Ganesan *et al.*, 2017)

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทกับลูกน้ำยุงลาย

เพาะเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ผ่านการคัดเลือกข้างต้น ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 5 ชนิด คือ GYM, ISP3, Glucose Yeast extract Broth (GYB), SY และ ISP1 เขย่าขวดอาหารที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่ 200 รอบต่อนาที นาน 21 วันและทำการสกัดหยาบจากอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงเชื้อ ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดสอบข้างต้น แต่วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 3 ซ้ำ บันทึกผลการตายของลูกน้ำยุงลายที่ 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากสัมผัสสารวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) คัดเลือกชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เหมาะสมที่ให้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงลายมากที่สุด

ตรวจสอบชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกด้วยการเปรียบเทียบสายพันธุกรรม 16S rDNA

ทำการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ cross streak technique บนอาหาร GYM บ่มที่อุณหภูมิห้อง 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21-30 วัน ย้ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM บ่มที่อุณหภูมิห้อง 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ทำการถอดรหัสพันธุกรรมของ ITS ของ 16S rDNA ด้วย primers: 785F 5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3' และ 907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3' โดยบริษัท Microgen Asia (Incheon, Korea) ตรวจสอบสายพันธุกรรมของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้รับด้วยโปรแกรม BIOEDIT v. 7.0.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>) (Hall, 1999) เปรียบเทียบกับสายพันธุกรรมของเชื้อแอคติโนมัยซีทใน GENBANK จาก the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) ด้วย Blast search (Altschul *et al.*, 1990) คัดเลือกสายพันธุกรรม

ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด โดยทำการ alignment รหัสพันธุกรรมด้วยโปรแกรม CLASTALX (Thompson *et al.*, 1997) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ phylogenetic analysis โดยระดับความสัมพันธ์ของแต่ละชนิดยืนยันด้วยค่า BOOTSTRAP จากการคำนวณจำนวน 100 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA 4 software (<http://www.megasoftware.net/>) เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดที่สุด

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บรวบรวมตัวอย่างดินจากพื้นที่เป้าหมาย

ตัวอย่างดินที่เก็บรวบรวมพื้นที่เป้าหมายในจังหวัดแม่ฮ่องสอน รวม 2 แห่ง คือ บริเวณริมแม่น้ำปาย อำเภอเมือง และรอบๆ อุทยานแห่งชาติสบเมย อำเภอสบเมย ในแต่ละพื้นที่มีสภาพแวดล้อมและลักษณะของดินที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน พื้นที่ริมแม่น้ำปาย ลักษณะของดินตัวอย่างที่เก็บเป็นดินร่วน มีสีน้ำตาลเข้ม ปะปนไปด้วยเศษซากของอินทรีย์วัตถุ เช่น ใบไม้ กิ่งไม้ รากไม้ เป็นต้น มีความเป็นกรดและด่างแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความเป็นกรด pH 5.5-6.5 และกลุ่มที่มีความเป็นกลาง pH เท่ากับ 7 อุณหภูมิของตัวอย่างดินอยู่ในช่วง 22-27 องศาเซลเซียส ความสูงจากระดับน้ำทะเลอยู่ในช่วง 175-218 ตำแหน่งพิกัดที่ 19.23269:97.92506 ถึง 19.23232:97.95986 ในขณะที่พื้นที่รอบๆ อุทยานแห่งชาติสบเมย อำเภอสบเมย ลักษณะของดินตัวอย่างที่พบเป็นดินร่วน มีสีน้ำตาลอ่อน มีเศษซากของอินทรีย์วัตถุปะปนเล็กน้อย ค่าความเป็นกรดและด่างที่ตรวจพบมี 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีความเป็นกรด pH 6-6.5 และกลุ่มที่มีความเป็นกลาง pH เท่ากับ 7 อุณหภูมิของตัวอย่างดินอยู่ในช่วง 21-26 องศาเซลเซียส ความสูงระดับน้ำทะเลอยู่ในช่วง 195-392 ตำแหน่งพิกัดที่ 17.92409:97.90522 ถึง 17.94983:97.92558 (Table 1)

ลักษณะของเนื้อดินตัวอย่างที่ทำการศึกษาจากทั้ง 2 พื้นที่ มีลักษณะเป็นดินร่วน แต่สีของดินมีความแตกต่างกันมากและจัดได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สีน้ำตาลเข้ม และสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งตัวอย่างดินที่มี

สื่อน้ำตาลอ่อนพบจำนวนโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทมากที่สุด 108 ไอโซเลต ส่วนสื่อน้ำตาลเข้ม พบ 87 ไอโซเลต คุณสมบัติของตัวอย่างดินที่ทำการเก็บตัวอย่างอยู่ระหว่าง 21-27 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส พบเชื้อแอคติโนมัยซีทมากที่สุด 64 ไอโซเลต (Figure 1) ค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) ของตัวอย่างดินอยู่ในช่วง 5.5-7.0 โดย

ที่ค่า pH เท่ากับ 7 สภาพดินมีความเป็นกลางพบจำนวนโคโลนีแอคติโนมัยซีทมากที่สุด 147 ไอโซเลต และพบน้อยที่สุด 3 ไอโซเลตที่ค่า pH เท่ากับ 5.5 (Figure 2) ช่วงระดับความสูงจากน้ำทะเล 200-250 เมตร พบจำนวนโคโลนีแอคติโนมัยซีทมากที่สุด 70 ไอโซเลต และพบน้อยที่สุด 8 ไอโซเลต ที่ระดับความสูง 350-400 เมตร (Figure 3)

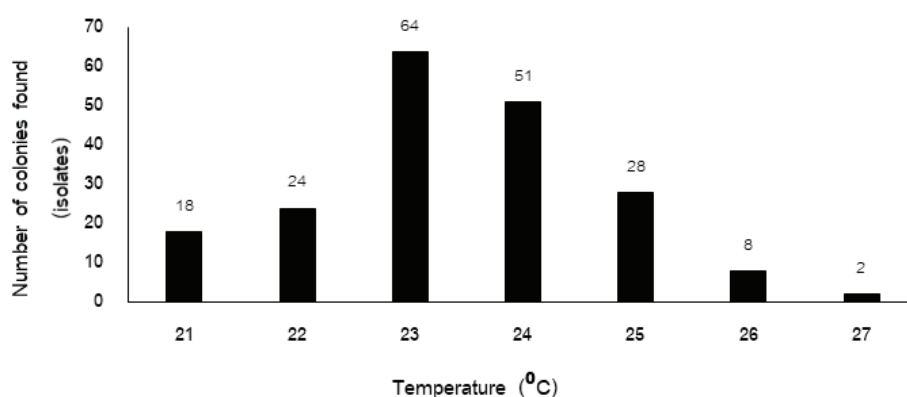


Figure 1 The number of actinomycetes colonies found at various soil temperature

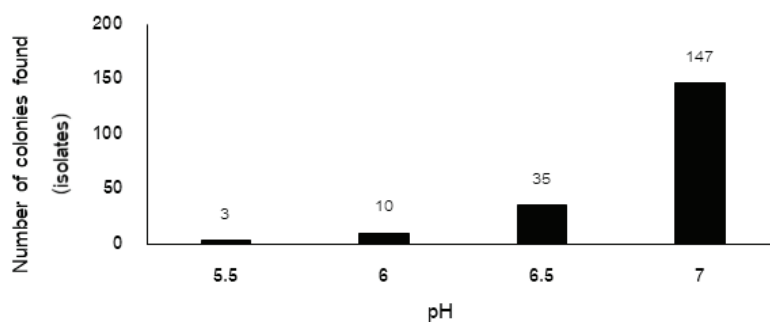


Figure 2 The number of actinomycetes colonies found in various soil pH values

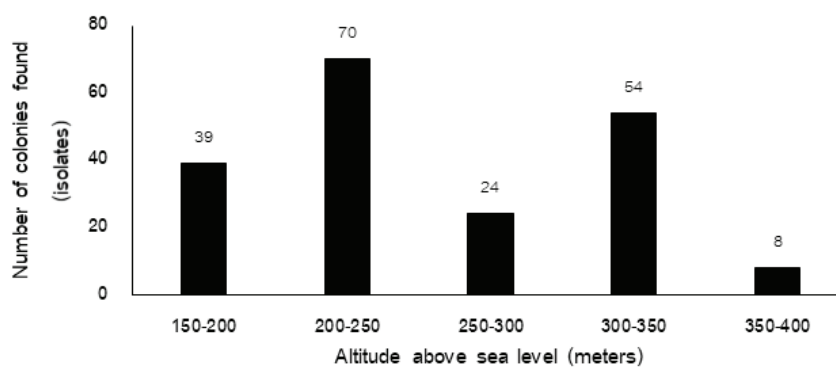


Figure 3 The number of actinomycetes colonies found at various altitudes above sea level (meters)

การคัดแยกแอกติโนมัยซีทจากดินตัวอย่าง

ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างดิน พบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแอกติโนมัยซีททั้งหมด 195 ไอโซเลต โดยตัวอย่างดินจากพื้นที่บริเวณริมแม่น้ำปาย อำเภอเมือง

พบจำนวน 87 ไอโซเลต ใสรหัสของโคโลนีเชื้อที่พบเป็น MSp 001-1 ถึง MSp 020-2 และตัวอย่างดิน พื้นที่รอบๆ อุทยานแห่งชาติสบเมย อำเภอสบเมย พบจำนวน 108 ไอโซเลต ใสรหัสของโคโลนีเชื้อที่พบเป็น MSsm 001-1 ถึง MSsm 020-8 (Table 1)

Table 1 Soil sampling areas with GPS in Mae Hong Son Province, number of actinomycetes colonies, colony (isolate) codes and mortality rate of mosquito larvae after contact to actinomycetes isolate at 48 hrs.

District	Soil sampling point	Location (GPS)	Number of colonies found	Isolate codes	Mortality rate at 48 hrs. (%) (infecting isolates)
Muang	1	19.23269:97.92506	6	MSp 001-1-6	0
	2	19.23269:97.92506	4	MSp 002-1-4	0
	3	19.23269:97.92506	3	MSp 003-1-3	0
	4	19.23269:97.92506	3	MSp 004-1-3	0
	5	19.23269:97.92506	6	MSp 005-1-6	0
	6	19.23232:9795973	7	MSp 006-1-7	0
	7	19.23232:9795973	4	MSp 007-1-4	0
	8	19.23232:9795973	6	MSp 008-1-6	0
	9	19.23246:97.95972	1	MSp 009-1	0
	10	19.23246:97.95972	8	MSp 010-1-8	0
	11	19.23246:97.95972	4	MSp 011-1-4	0
	12	19.23246:97.95972	1	MSp 012-1	0
	13	19.23246:97.95972	2	MSp 013-1-2	0
	14	19.23232:9795986	1	MSp 014-1	0
	15	19.23232:9795986	6	MSp 015-1-6	0
	16	19.23232:9795986	6	MSp 016-1-6	0
	17	19.23232:9795986	9	MSp 017-1-9	0
	18	19.23232:9795986	1	MSp 018-1	0
	19	19.23131:97.95983	3	MSp 019-1-3	0
	20	19.23131:97.95983	2	MSp 020-1-2	0
Sop Moei	1	17.92409:97.90522	3	MSsm 001-1-3	0
	2	17.92409:97.90522	6	MSsm 002-1-6	0
	3	17.92409:97.90522	7	MSsm 003-1-7	0
	4	17.92409:97.90522	8	MSsm 004-1-8	0
	5	17.92409:97.90522	7	MSsm 005-1-7	0
	6	17.92538:97.9063	1	MSsm 006-1	0

Table 1 (continued).

District	Soil sampling point	Location (GPS)	Number of colonies found	Isolate codes	Mortality rate at 48 hrs. (%) (infecting isolates)
	7	17.92794:97.9126	8	MSsm 007-1-8	50 (MSsm 007-6)
	8	17.93172:97.91067	6	MSsm 008-1-6	0
	9	17.93172:97.91067	7	MSsm 009-1-7	0
	10	17.93172:97.91067	5	MSsm 010-1-5	0
	11	17.93172:97.91067	5	MSsm 011-1-5	0
	12	17.93172:97.91067	7	MSsm 012-1-7	0
	13	17.94175:97.92219	5	MSsm 013-1-5	0
	14	17.94217:97.92292	1	MSsm 014-1	0
	15	17.94217:97.92293	6	MSsm 015-1-6	0
	16	17.94217:97.92293	10	MSsm 016-1-10	0
	17	17.94217:97.92295	1	MSsm 017-1	0
	18	17.94961:97.92574	1	MSsm 018-1	0
	19	17.94983:97.92558	10	MSsm 019-1-10	0
	20	17.94983:97.92558	8	MSsm 020-1-8	0

การทดสอบสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซีท์กับลูกน้ำยุงลาย

ผลการทดสอบสารสกัดหยาบที่สกัดจากอาหารเหลว GYM ที่ใช้เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท์แต่ละไอโซเลตที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 กับลูกน้ำยุงลายวัยที่ 3 พบว่า ที่ 24 ชั่วโมงหลังสัมผัสสาร ไม่พบสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่มีฤทธิ์สามารถกำจัดลูกน้ำยุงลายวัยที่ 3 ได้ แต่เมื่อเวลา 48 ชั่วโมงหลังสัมผัสสาร พบเชื้อแอคติโนมัยซีท์จากพื้นที่รอบๆ อุทยานแห่งชาติสบเมย อำเภอสบเมย จำนวน 1 ไอโซเลตที่มีฤทธิ์สามารถกำจัดลูกน้ำยุงลายวัยที่ 3 ได้ คือ MSsm 007-6 พบอัตราการตายร้อยละ 50 โดยลักษณะอาการของลูกน้ำยุงลายวัยที่ 3 ที่ตาย แสดงอาการเคลื่อนไหวช้าลงหลังสัมผัสสารจากนั้นหยุดนิ่ง ลำตัวเปลี่ยนเป็นสีดำ และตาย โดยซากแมลงจมน้ำ

เมื่อวิเคราะห์โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าลูกน้ำยุงได้เปรียบเทียบกับแหล่งที่เก็บตัวอย่างดินพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท์จากอำเภอสบเมยนั้น ลักษณะของตัวอย่างดินและสภาพพื้นที่เก็บตัวอย่างมีลักษณะสำคัญคือ ดินมีลักษณะ

เป็นดินร่วน มีสีน้ำตาลอ่อน อุณหภูมิของตัวอย่างดินอยู่ที่ 22 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 7 และมีความสูงจากระดับน้ำทะเลช่วง 200-250 เมตร

ทดสอบประสิทธิภาพการสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิดที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่ผ่านการคัดเลือกกับลูกน้ำยุงลาย

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท์ไอโซเลต MSsm 007-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด คือ GYM, ISP3, GYB, SY และ ISP1 และนำสารสกัดหยาบทดสอบฤทธิ์ในการควบคุมลูกน้ำยุงลายวัยที่ 3 พบว่า ที่ 24 ชั่วโมง สารสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลต MSsm 007-6 ที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 5 ชนิดมีอัตราการตายของลูกน้ำยุงในระดับต่ำกว่าร้อยละ 50 หรือ ไม่พบอัตราการตาย ส่วนที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ GYB, GYM และ SY ที่ใช้เพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีท์ MSsm 007-6 มีผลทำให้ลูกน้ำยุงตายในอัตราร้อยละ 96.7, 73.3 และ 63.3 ตามลำดับ (Figure 4)

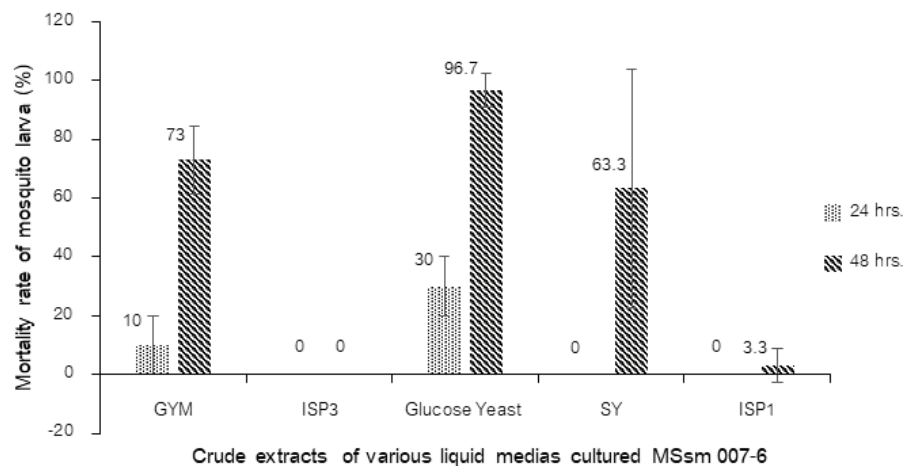


Figure 4 Mortality rate of mosquito larvae (%) \pm SD at 24 and 48 hours after exposure to crude extracts from 5 different culture media cultured actinomycete isolate MSsm 007-6.

ตรวจสอบชนิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดเลือกด้วยการเปรียบเทียบสายพันธุ์กรรม 16sDNA

จำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของสายพันธุ์กรรม ITS ของ 16sDNA ที่อ่านได้จากเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต MSsm 007-6 จำนวน 877 หน่วย น้ำหนักโมเลกุลของสายพันธุ์กรรมเส้นเดียวและเส้นคู่เท่ากับ 268694.00 และ 534413.00 ตามลำดับ ประกอบด้วย A, C, G และ T จำนวน 170, 301, 211 และ 195 หน่วย คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 19.38, 34.32, 24.06 และ 22.23 มีสัดส่วนของ GC ร้อยละ 58.38 และ AT ร้อยละ 41.62 โดยมีสัดส่วนของ GC มากกว่า AT เท่ากับ 1.40 เท่า

เมื่อทำการค้นหาสายพันธุ์กรรม ITS ของ 16sDNA ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีความใกล้เคียงใน GENBANK ด้วย BLAST search พบเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีสัดส่วนของความเหมือนกันของสายพันธุ์กรรมของไอโซเลต MSsm 007-6 (% identical nucleotide bases) ร้อยละ 98-99 คือ *Streptomyces kasugaensis*, *S. celluloflavus*, *S. verticillium* subsp. *quintum*, *S. lydicus*, *S. sioyanaensis*, *S. albofaciens*, *S. kronopolitis*, *S. platensis* และ *S. albulus*

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสายพันธุ์กรรม ITS ของ 16sDNA ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต MSsm 007-6 โดยมี *Streptomyces avermitilis* เป็นตัวเปรียบเทียบ และมี *Saccharopolyspora spinosa*, *Actinoplanes regularis*, *Nocardopsis lucentensis* และ *Micromonospora chokoriensis* เป็น out group ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987) โดย optimal tree มีผลรวมของความยาวของแขนงโดยรวมเท่ากับ 0.26831202 คำนวณและสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี LogDet (Tamura-Kumar) (Tamura and Kumar, 2002). ด้วยข้อมูลการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์จำนวน 16 ตำแหน่ง จากจำนวนทั้งหมด 698 ตำแหน่ง ภายใต้โปรแกรมการคำนวณ MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) สายสัมพันธ์ของวิวัฒนาการที่คำนวณได้ยืนยันด้วยวิธีการ Bootstrap โดยมีจำนวนซ้ำ 100 ครั้ง (Felsenstein, 1985) พบว่าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่เชื่อมโยงระหว่าง out group กับ ingroup นั้นรองรับด้วยค่า bootstrap ร้อยละ 100 โดยในกลุ่ม ingroup นั้นได้วิวัฒนาการแยกแตกออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 มีค่า

Bootstrap รองรับการรวมกลุ่มในระดับที่ร้อยละ 44 ประกอบด้วย *Streptomyces lydicus* strain ATCC25470, *S. sioyanaensis* strain NRRL B-5408, *S. albobaciens* strain JMC 432, *S. kronopolitis* strain NEAU-ML8, *S. platensis* strain JCM4662, *S. albulus* strain IMC S-0802 และ *S. avermitilis* strain 12804 กลุ่มที่ 2 มีค่า Bootstrap รองรับการรวมกลุ่มในระดับที่ร้อยละ 87 ประกอบด้วย เชื้อแอคติโนมัยซีท์ไฮโซเลต

MSsm007-6, *S. kasugaensis* strain M338-M1, *S. celluloflavus* strain NBRC 13780, *S. verticillium* subsp. *quintum* strain MA-267-A1 และ *S. kasugaensis* strain NBRC 13851 โดยผลการวิเคราะห์พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท์ไฮโซเลต MSsm007-6 มีความใกล้เคียงกับ *S. kasugaensis* strain M338-M1 มากที่สุด โดยมีค่า bootstrap รองรับการร้อยละ 75 (Figure 5)

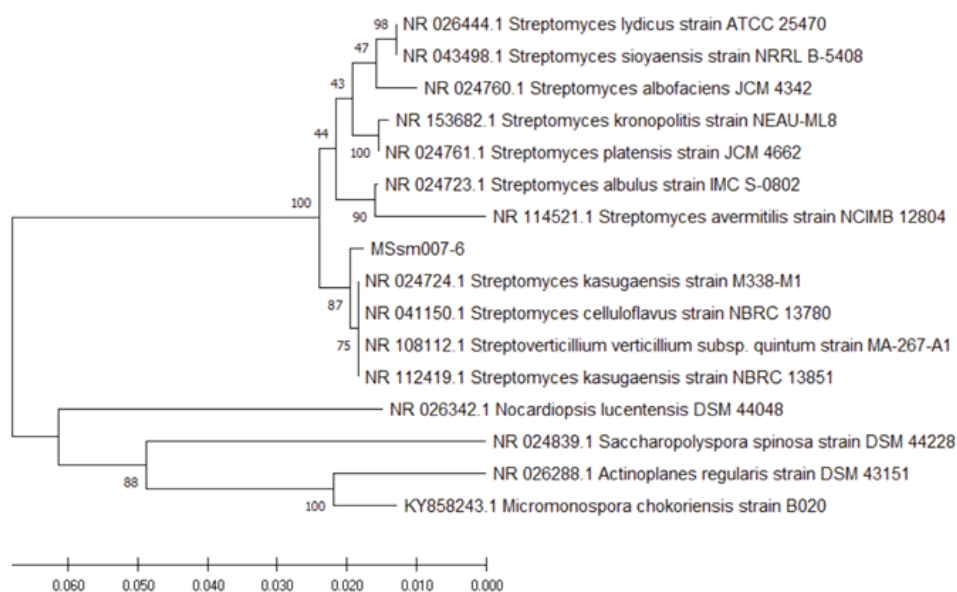


Figure 3 Phylogenetic tree (Evolutionary relationships of taxa) obtained by Neighbor-Joining statistics method with evolutionary distance calculated by LogDet based on the alignment of 16s rDNA of MSsm007-6 and other *Streptomyces* species. *Nocardioopsis lucentensis*, *Saccharopolyspora spinosa*, *Actinoplanes regularis* and *Micromonospora chokoriensis* were assigned as the out-group. The confidence supporting number on tree branch calculated from bootstraps method with 100 replications. The scale bar corresponds to 0.01 substitutions per nucleotide position.

วิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีโอกาสค้นพบเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายได้สูง (Jayasinghe and Parkinson, 2008) จากผลการเก็บตัวอย่างดินจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน ซึ่งอยู่ในพื้นที่ป่าฝน ตามแนวรอยเลื่อนระหว่างชายแดนไทย-สหภาพเมียนมา 2 พื้นที่ คือ บริเวณริมแม่น้ำปาย อำเภอเมือง และ รอบๆ อุทยานแห่งชาติสบเมย อำเภอสบเมย สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท์จากตัวอย่างดินได้ทั้งหมดถึง 195 ไอโซเลต

ในทำนองเดียวกัน การคัดแยกแอคติโนมัยซีท์จากดินในป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์หายากแห่ง ของ ชนินทร์ และคณะ (2546) ที่พบแอคติโนมัยซีท์จำนวน 160 และ 186 ไอโซเลตตามลำดับ

นอกจากนี้ ลักษณะเนื้อดินที่เป็นดินร่วน มีอินทรีย์วัตถุสูง มีความเป็นกรดอ่อนถึงด่างอ่อน ช่วงค่า pH 6.0-8.0 และมีช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นดินที่มีคุณสมบัติที่เอื้ออำนวยต่อการอยู่อาศัยและการเจริญเติบโตของ

จุลินทรีย์ต่างๆ มากที่สุด (พงศธรวี, 2558; Anupama *et al.*, 2007) และมีส่วนสำคัญต่อการค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ มาก ซึ่งในการศึกษานี้ พบจำนวนโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทสูงมากในตัวอย่างดินมีลักษณะเป็นดินร่วน สีน้ำตาลอ่อน มีอินทรีย์วัตถุสูง มีช่วงอุณหภูมิดินที่ 22-25 องศาเซลเซียส มีความเป็นกรด-ด่างของดินในช่วงค่า pH 7.0

ส่วนสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยซีทต่อการควบคุมแมลงศัตรูพืช คน และสัตว์นั้น คือสารเมตาโบไลต์ที่เชื้อผลิตขึ้น ซึ่งละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ Genesan *et al.* (2017) ศึกษาตัวอย่างดินจาก Western Ghats รัฐ Tamil Nadu ประเทศอินเดีย พบแอคติโนมัยซีททั้งหมด 400 ไอโซเลต เมื่อทดสอบกับลูกน้ำยุงพบแอคติโนมัยซีท 5 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) ได้ดี แต่มีฤทธิ์ต่ำเมื่อทดสอบกับลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) และยังพบแอคติโนมัยซีท 1 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่อง (*Anopheles stephensi*) ได้ร้อยละ 100 ในการศึกษานี้เมื่อสกัดหยาบอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่พบจากพื้นที่ต่างๆ และทดสอบกับลูกน้ำยุงลายวัยที่ 3 พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีท 1 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพกำจัดลูกน้ำยุงลายวัยที่ 3 ได้เกินกว่าร้อยละ 50 คือ ไอโซเลต MSsm 007-6 คิดเป็นร้อยละ 0.005 ของจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่พบ

การเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ในปริมาณมากนั้น อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีความสำคัญมาก เนื่องจากแอคติโนมัยซีทแต่ละชนิดมีความชอบต่อชนิดอาหาร และปัจจัยต่างๆ ที่แตกต่างกัน Wadetwar and Patil (2013) ศึกษาตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่าง จากหลายสถานที่ เช่น พื้นที่การเกษตร ทะเลสาบ แม่น้ำ และ ลำคลอง ใน Nagpur, Bhandara และ Chandrapur โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิดในการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ YMEA (Yeast extract-Malt extract agar) มีจำนวนโคโลนีของแอคติโนมัยซีทสูงสุดและเชื้อมีการเจริญเติบโตดีที่สุด ในการศึกษานี้ เมื่อทำการทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 5 ชนิด คือ GYM, ISP3, GYB, SY และ ISP1 พบว่า

อาหารเหลว GYB มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อไอโซเลต MSsm 007-6 มากที่สุด เนื่องจากสารสกัดที่ได้จากอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยง มีผลต่อการตายของลูกน้ำยุงลายสูงขึ้นเป็น 1.3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงใน GYM แบบปกติ

เมื่อทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของสายพันธุ์กรรม ITS ของ 16S rDNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลต MSsm007-6 พบว่าสายสัมพันธ์มีแนวโน้มใกล้เคียงกับ *Streptomyces kasugaensis* strain M338-M1 มากที่สุด โดย *S. kasugaensis* strain M338-M1 ดังกล่าวเป็นเชื้อแบคทีเรียในไฟลัม Actinobacteria อันดับ Streptomycetales วงศ์ Streptomycetaceae สกุล Streptomyces คัดแยกได้จากดิน บริเวณศาลเจ้า Kasuga ในเมือง Nara ประเทศญี่ปุ่น ตั้งแต่ปี 1963 เป็นเชื้อที่ผลิตสารเมตาโบไลต์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Piricularia oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคใบไหม้ของข้าว (Blast) ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลต MSsm007-6 ผลิตสารเมตาโบไลต์ที่มีผลต่อการตายของลูกน้ำยุง ซึ่งเป็นประเด็นที่ต้องมีการศึกษาทางจุลชีววิทยา ชีวเคมีและพิษวิทยา เพิ่มเติม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความชัดเจน และสามารถพัฒนาต่อยอดให้เกิดการใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

สรุป

การศึกษาคัดแยกและจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินในพื้นที่จังหวัดแม่ฮ่องสอนพบเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวนทั้งหมด 195 ไอโซเลต โดยพบโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นจำนวนมากในพื้นที่เก็บตัวอย่างดินที่เป็นดินร่วน สีน้ำตาลอ่อน มีอินทรีย์วัตถุสูง มีช่วงอุณหภูมิดินที่ 22-25 องศาเซลเซียส มีความเป็นกรด-ด่างของดินในช่วงค่า pH 7.0 และพบว่าสารสกัดหยาบจากอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อไอโซเลต MSsm 007-6 ที่คัดแยกได้มีฤทธิ์ในการกำจัดลูกน้ำยุงได้ มากกว่าร้อยละ 50 โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไอโซเลต MSsm 007-6 ในอาหารเหลว 5 ชนิด คือ GYM, GYB, SY, ISP1 และ ISP3 พบว่าสารสกัดหยาบจากอาหารเหลว

GYM, GYB และ SY ที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อไอโซเลต MSsm 007-6 มีประสิทธิภาพทำให้ลูกน้ำยุงตายในอัตราร้อยละ 73.3, 96.7 และ 63.3 ตามลำดับ จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต MSsm 007-6 และจัดจำแนกชนิดด้วยการวิเคราะห์สายพันธุ์กรรม ITS ของ 16S rDNA พบว่าเชื้อมีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces kasugaensis* strain M338-M1 มากที่สุด ซึ่งคณะผู้วิจัยกำลังดำเนินการศึกษาในรายละเอียดเพิ่มเติมในส่วนของคุณลักษณะต่างๆ ทางจุลชีววิทยา ชีวเคมี และพิษวิทยา เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการพัฒนาเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต MSsm 007-6 สำหรับการให้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทั้งในส่วนของวิทยาเขตกำแพงแสน และบางเขน คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนล่าง มหาวิทยาลัยนเรศวร คณะเทคโนโลยีการเกษตร และอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทำการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ชนินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา น้าฝน บัอมทอง จรรย์เจตนะจิตร พัทธี สุนทรนัน และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2546. เชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรังบริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่า เขานางรำ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง. ใน: รายงานการประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาวิทยาศาสตร์สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม). หน้า 363-370. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พงศ์ระวี นิมน้อย. 2558. แอคติโนมัยซีท. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

อรัญ งามผ่องใส สนั่น ศุภธีรสกุล และ ธีรพล ศรีชนะ. 2559. องค์ประกอบทางเคมีและการ

ปรับปรุงผลิตภัณฑ์น้ำมันเมล็ดสะเดาช้าง (*Azadirachta excelsa* Jack.) เพื่อควบคุมยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* Linnaeus). รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ คณะการแพทย์แผนไทย และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Anupama, M. K.J.P Narayana and M. Vijayalakshmi. 2007. Screening of *Streptomyces purpeofuscus* for antimicrobial metabolites. *Research Journal of Microbiology* 2(12): 992-994.
- Anwar, S., B. Ali, F. Qamar and I. Sajid. 2014. Insecticidal activity of actinomycetes isolated from salt range, Pakistan against mosquitoes and red flour beetle. *Pakistan Journal of Zoology*. 46(1): 83-92.
- Balakrishnan, S., P. Santhanam and M. Srinivasan. 2016. Larvicidal potency of marine actinobacteria isolated from mangrove environment against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Journal of Parasitic Diseases* Doi: 10.1007/s12639-016-0812-3.
- Bond, J.G., C.F. Marina and T. Williams. 2004. The naturally derived insecticide spinosad is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* mosquito larvae. *Medical and Veterinary Entomology* 18: 50-56.
- Christophers, R.S. 1960. *Aedes aegypti* (L.) the Yellow Fever Mosquito. The University Press, Cambridge (Brooke Crutchley, University Printer). 750 p.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

- Ganesan, P., H.R. David, D.A. Reegan., R.M. Gandhi, G.M. Paulraj, S. Ignacimuthu and N.A. Al-Dhabi. 2017. Isolation and molecular characterization of actinomycetes with antimicrobial and mosquito larvicidal properties. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 6: 209-217.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Hamada, M., N. Kinoshita, S. Hattori, A. Yoshida, Y. Okami, K. Higashide, N. Sakata and M. Hori. 1995. *Streptomyces kasugaensis* sp. nov.: a new species of genus *Streptomyces*. Actinomycetologica 9(1): 27-36
- Izquierdo-Suzán, M., S. Zárate, J. Torres-Flores, F. Correa-Morales, C. González-Acosta, E.E. Sevilla-Reyes, R. Lira, L.S. Alcaraz-Estrada and M. Yocupicio-Monroy. 2019. Natural vertical transmission of zika virus in larval *Aedes aegypti* populations, Morelos, Mexico. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • 25(8): 1477-1484.
- Jayasinghe, B.A.T.D and D. Parkinson. 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. Applied Soil Ecology 38: 109-118.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35(6): 1547-1549.
- Lacey, A.L. 2007. The role of biological control of mosquitoes in integrated vector control. The American Mosquito Control Association Bulletin 23(7): 133-163.
- Liu, H., S. Qin, Y. Wang, W. Li and J. Zhang. 2008. Insecticidal action of Quinomycin A from *Streptomyces* sp. KN-0647, isolated from a forest soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24(10): 2243-2248.
- Oliveira, R.S., T.R.R. Caleffe and H. Conte. 2017. Chemical control of *Aedes aegypti*: a review on effects on the environment and human health. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET e-ISSN 2236 1170. 21(3): 240-247.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4(4): 406-425.
- Singh, G and S. Prakash. 2012. Lethal effect of *Streptomyces citreofluorescens* against larvae of malaria, filaria and dengue vectors. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine Doi: 10.1016/S1995-7645(12) 60123-0.
- Takizawa, M., R.R. Colwell and R.T. Hill. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. Applied Environmental Microbiology 59(4): 997-1002.
- Tamura, K. and S. Kumar. 2002. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages. Molecular Biology and Evolution 19(10): 1727-1736.
- Tetreau, G., S. Grizard, C.D. Patil, F-H. Tran, V.T. Van, R. Stalinski, F. Laporte, P. Mavingui, L. Després and C.V. Moro. 2018. Bacterial microbiota of *Aedes aegypti* mosquito larvae is altered by intoxication with *Bacillus thuringiensis israelensis*. Parasites & Vectors. 11: 121.

- Thavara, U., A. Tawatsin, T. Pengsakul, P. Bhakdeenuan, S. Chanama, S. Anantapreecha, C. Molito, J. Chompoosri, S. Thammapalo, P. Sawanpanyalert and P. Siriyasatien. 2009. Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: culicidae). Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health 40(5): 951-962.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25(24): 4876-4882.
- Wadetwar, N.R. and T.A. Patil. 2013. Isolation and characterization of bioactive actinomycetes from soil in and around Nagpur. International Journal Pharmaceutical Sciences and Research 4(4): 1428-1433.