การคัดแยกและจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทจากดินเพื่อใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูผักบางชนิด

Isolation and Identification of Actinomycetes from Soil for Controlling Certain Vegetable Insect Pests

วิชัย สรพงษ์ไพศาล[1] ปภพ สินชยกุล[2*] อารยา บุญศักดิ์[3] วิภา หอมหวล[4] และ ปาณิสรา เทพกุศล[4]

Wichai Sorapongpaisal[1] Pabhop Sinchayakul[2*] Araya Bunsak[3] Wipa Homhaul[4] and Panisara Thepkusol[4]

Received: October 19, 2021
Revised: October 26, 2021
Accepted: November 3, 2021

Abstract: Actinomycetes is bacteria producing various metabolites which some of them are highly efficient insecticides. Therefore, the research related to actinomycetes bacteria to control some vegetable insect pests was performed under the objective of isolation and identification of actinomycetes from soil for controlling certain insect pests of vegetables: *Spodoptera litura, Plutella xylostella* and *Lipaphis erysimi*. Soil samples were collected from 3, 3 and 9 sites in Ratchaburi, Kanchanaburi and Tak provinces, respectively, with 5 collecting spots of soil samples/site. Actinomyces were isolated using sequence dilution technique from soil suspension and spread on starch casein agar (SCA). The isolated actinomycetes colonies were picked up, cultured in glucose yeast malt (GYM) liquid media for 21 days and extracted by collecting supernatant of culture media for the efficacy test. The concentration of each crude extract was adjusted to 5% and applied on 10 larvae of *S. litura* at the 3rd instar. The high potential (mortality rate > 50%) of GYM crude extract of actinomycetes were screened and continuously used for determining their efficacy on *P. xylostella* and *L. erysimi*. The result reveled that the total of 477 actinomycetes isolates were found. The mortality rate above 50% on *S. litura* was detected on 9 GYM crude extracts of those actinomycetes isolates: KANAC011, RACAC007, RACAC032, RACAC05,5 TAKAC044, TAKAC094, TAKAC119, TAKAC178 and TAKAC181 and the highest efficacy (75.5% mortality at 72 hours after contact with the crude extract, HACE) was found from GYM crude extract of TAKAC094. Consequently, after applying the GYM crude extracts of those 9 isolates on *P. xylostella* and *L. erysimi*, the result showed that the highest potential to control

[1] ศูนย์วิจัยและบริการวิชาการ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Center for Research and Academic Outreach, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140.

[2] ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Department of Entomology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140.

[3] คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, 65000

[4] ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์ แห่งชาติ ภาคเหนือตอนล่าง มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
National Biological Control Research Center Lower Northern Regional Center, Naresuan University, Phitsanulok, 65000

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

P. xylostella (73.5 % mortality at 72 HACE) and *L. erysimi* (21.3% mortality at 72 HACE) was found from the GYM crude extracts of TAKAC181 and RACAC055, respectively.

Keywords: Actinomycetes, Metabolites, *Spodoptera litura Plutella xylostella, Lipaphis erysimi*

บทคัดย่อ: เชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารเมตาโบไลท์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลากหลายชนิด ดังนั้นจึงได้จัดทำโครงการวิจัยเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียแอคติโนมัยซีทควบคุมแมลงศัตรูผักขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทจากดินเพื่อใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูผักบางชนิด โดยทำการเก็บตัวอย่างดินจาก 3 พื้นที่ในจังหวัดราชบุรี กาญจนบุรีและตาก จังหวัดละ 3, 3 และ 9 พื้นที่ตามลำดับ โดยทำการเก็บตัวอย่างจาก 5 จุดในแต่ละพื้นที่ คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากสารแขวนลอยดิน โดยวิธีเจือจางลดหลั่นต่อเนื่องและเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch casein agar (SCA) คัดแยกโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว glucose yeast malt (GYM) 21 วัน สกัดหยาบอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อปรับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ร้อยละ 5 ทดสอบกับหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 จำนวน 10 ตัวต่อหน่วยทดลอง คัดเลือกไอโซเลตเชื้อที่พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการกำจัดหนอนกระทู้ผักได้เกินร้อยละ 50 เพื่อทดสอบต่อเนื่องกับหนอนใยผักและเพลี้ยอ่อนผัก ผลการศึกษาพบเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวนทั้งหมด 477 ไอโซเลท สารสกัดหยาบของอาหารเหลว GYM จากเชื้อไอโซเลท KANAC011, RACAC007, RACAC032, RACAC05,5 TAKAC044, TAKAC094, TAKAC119, TAKAC178 และ TAKAC181 มีผลต่อการตายของหนอนกระทู้ผักได้สูงกว่าร้อยละ 50 โดย พบอัตราการตายของหนอนสูงสุดร้อยละ 75.5 จากสารสกัดหยาบ GYM ของเชื้อไอโซเลท TAKAC094 ที่ 72 ชั่วโมงหลังสัมผัสสาร เมื่อทดสอบต่อเนื่องกับหนอนใยผักและเพลี้ยอ่อนผัก สารสกัด GYM จากเชื้อไอโซเลท TAKAC181 มีศักยภาพในการควบคุมหนอนใยผักสูงร้อยละ 73.5 ที่ 72 ชั่วโมงหลังสัมผัสสาร และ สารสกัดจาก เชื้อไอโซเลท RACAC055 มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยอ่อนได้ร้อยละ 21.3 ที่ 72 ชั่วโมงหลังสัมผัสสาร

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีท สารเมตาโบไลท์ หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก เพลี้ยอ่อนผัก

คำนำ

ปัจจุบันวิธีการควบคุมแมลงศัตรูพืชนั้นพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็ว เพื่อเป็นทางเลือกในการลดการใช้สารฆ่าแมลง และรองรับอนาคตของการเกษตรแบบปลอดสาร และเกษตรอินทรีย์ที่กำลังเติบโตมากขึ้นในปัจจุบัน เช่น การใช้วิธีกล ฟิสิกส์ กับดักชนิดต่างๆ พันธุ์พืชต้านทาน แมลงศัตรูธรรมชาติ จุลินทรีย์ต่างๆ เช่น เชื้อราเมตาไรเซียม เชื้อ *Bacillus* spp. เป็นต้น แต่ที่สำคัญและกำลังพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็วคือการใช้เมตาโบไลท์ของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอคติโนมัยซีท โดยสารเหล่านี้ถือว่าเป็นสารจากธรรมชาติสามารถใช้ในเกษตรธรรมชาติรูปแบบต่างๆ เช่น เกษตรปลอดสาร และเกษตรอินทรีย์ ได้

เชื้อแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นใย พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ ฝุ่นละออง ในอากาศ และบางชนิดดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ (saprophyte) (Coombs and Franco, 2003) เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ที่จัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) หลายชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อรา แบคทีเรีย สารกดภูมิคุ้มกัน สารปราบวัชพืช และสารฆ่าแมลง เป็นต้น (Dahiya *et al*., 2006; McCarthy and Williams, 1990) จากฐานข้อมูลใน antibiotic literature database (ABL) ซึ่งได้รวบรวมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ สร้างขึ้น มากกว่า 34,000 ชนิด โดย 57% เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นจากเชื้อแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท

ในทางการเกษตรเชื้อแอคติโนมัยซีทมีบทบาทสำคัญหลังจากมีการค้นพบสารเมตาโบไลท์ชื่อ abamectin จากแบคทีเรีย *Steptomyces avermitilis* สามารถฆ่าแมลงและไรชนิดต่างๆ ได้ดีมาก และการค้นพบสาร spinosyn จาก *Saccharopolyspora spinosa* ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด เช่น หนอนผีเสื้อ เพลี้ยไฟ ปลวก และแมลงวันผลไม้ ออกฤทธิ์ทั้งแบบกินตายและสัมผัสตาย (Mertz and Yao, 1990) ส่งผลทำให้แนวทางในการควบคุมแมลงศัตรูพืชเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากเพราะสารเมตาโบไลท์เหล่านี้ใช้สะดวก มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงได้สูงมาก สลายตัวในธรรมชาติได้ และมีพิษที่จำเพาะเจาะจงมาก ปัจจุบันกลายเป็นสารทางเลือกที่สำคัญทดแทนการใช้สารฆ่าแมลงได้ (Siegfried *et al*., 2003) อย่างไรก็ตาม การค้นหาเชื้อชนิดใหม่ๆ หรือสารเมตาโบไลท์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่ๆ เพื่อนำมาสู่การผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์ฆ่าแมลงนั้นยังมีน้อยมากในประเทศไทย ทั้งๆ ที่ประเทศไทยนั้นมีพื้นที่ป่าที่ยังอุดมสมบูรณ์และมีการรบกวนน้อยในหลายพื้นที่ โดยเฉพาะแนวป่าตะวันตกตามแนวชายแดนไทยเมียนมา ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีศักยภาพและมีความจำเพาะต่อการควบคุมหนอนผีเสื้อสำคัญในผัก เช่น หนอนกระทู้ หนอนใยผัก และแมลงปากเจาะดูดที่สำคัญ เช่น เพลี้ยอ่อนผัก เพื่อเป็นแหล่งเชื้อที่มีมาตรฐานสำหรับพัฒนาสู่ผลิตภัณฑ์และส่งเสริมการใช้ประโยชน์สู่เกษตรกรต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บรวบรวมตัวอย่างดิน

เก็บรวบรวมตัวอย่างดินป่าในเขตตะวันตกตามแนวเขตแนวเทือกเขาตะนาวศรีฝั่งประเทศไทย บริเวณจังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี และตาก โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ทั้งหมด 15 จุด (ตำบล) แต่ละจุดเก็บ 5 จุดย่อย ในแต่ละจุดย่อย ทำความสะอาดบริเวณผิวหน้าดิน กวาดเศษใบไม้ออกให้หมด และใช้พลั่วขนาดเล็กขุดและเก็บดินจากบริเวณผิวหน้าดินลึกประมาณ 10 เซนติเมตร ประมาณ 100 กรัม/จุดย่อย และนำมารวมกันเป็นตัวอย่างดินของจุดเก็บ บรรจุตัวอย่างดินในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ บันทึกข้อมูลของพื้นที่แหล่งอ้างอิงของเก็บตัวอย่างดิน ตำแหน่ง GPS วัน เดือน ปี ความสูงจากระดับน้ำทะเล นำกลับห้องปฏิบัติการ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินจำนวน 10 กรัม ใส่ลงใน Flask ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว เติม น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 90 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวนที่ ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เจือจางสารแขวนลอย แบบต่อเนื่อง ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ดูดสารแขวนลอยของสารละลายดินแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร starch casein agar (SCA) (Madigan and Martinko, 2006) ที่เติม Ketoconazole 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ nalidixic acid 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง อย่างน้อย 21 วัน คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่พบ บันทึกสีของโคโลนี ใส่รหัสของเชื้อตามแหล่งที่พบ คัดแยกแต่ละโคโลนีของเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร SCA อีกครั้ง และเก็บเชื้อแต่ละไอโซเลทในสารละลาย 20% glycerol เพื่อเป็น stock culture ที่ -20 องศาเซลเซียส

เตรียมแมลงศัตรูผักคือหนอนกระทู้ หนอนใยผัก และเพลี้ยอ่อน

เก็บแมลงศัตรูผักคือหนอนกระทู้ หนอนใยผัก และเพลี้ยอ่อน จากแปลงปลูกผักของเกษตรกร เลี้ยงเพิ่มปริมาณ ด้วยต้นคะน้า เพื่อทดสอบกับสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บรวบรวมจากพื้นป่าแนวตะวันตกของประเทศไทย ในระดับห้องปฏิบัติการ (Lacey, 1997)

เตรียมสารสกัดหยาบเชื้อแอคติโนมัยซีทจากไอโซเลทที่คัดเลือก

ทำการเพาะเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast malt (GYM) ชนิดเหลว ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวนที่ ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดเป็นเวลา 21-30 วัน

ทำการสกัดหยาบสารเมตาโบไลท์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยนำอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทข้างต้นปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดเก็บส่วนใส และกรองด้วย microfilter esters of cellulose ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร pore size 0.22 ไมครอน ปรับความเข้มข้นสารสกัดที่ผ่านการกรองเป็นร้อยละ 5 และเก็บในขวดแก้วสีชาที่ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Sujitwanit *et al*., 2007)

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทกับแมลงศัตรูผัก

ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบกับแมลงศัตรูผักแบบต่อเนื่อง โดยเริ่มจากการทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก ใช้วิธีการทดสอบแบบ feeding technique ด้วยใบคะน้าที่จุ่มในสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลทที่พบ ผึ่งให้แห้ง และใส่ในกล่องเลี้ยงแมลง ทำการปล่อยหนอนวัยที่ 3 จำนวน 10 ตัวต่อหน่วยทดลองลงไป ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์จำนวน 3 ซ้ำ ทำการตรวจนับจำนวนหนอนที่ตายที่ 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังได้รับสาร คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สารสกัดหยาบมีผลต่อการตายของหนอนกระทู้ผักสูงเกินกว่าร้อยละ 50 จากนั้นทำการทดสอบสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ผ่านการคัดเลือกกับหนอนใยผัก โดยวิธี feeding technique และคัดเลือกต่อเนื่องเพื่อทดสอบกับเพลี้ยอ่อนผักโดยวิธี contact technique

คัดเลือกไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยซีท

คัดเลือกไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่พบว่าสารสกัดหยาบมีผลต่อการตายของแมลงศัตรูผักทั้งสามชนิดในระดับที่สูงที่สุด และเก็บโคโลนีเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกไว้ในรูปของการแช่แข็งที่ระดับอุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาทางจุลชีววิทยา ชีวเคมีและพิษวิทยา ในลำดับต่อไป

ผลการทดลอง

การสำรวจ เก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท

จากตัวอย่างดินสุ่มเก็บจากพื้นที่ภาคตะวันตกตามแนวชายแดนไทย-เมียนมาครอบคลุม 3 จังหวัด คือ ราชบุรี กาญจนบุรี และตาก ครอบคลุม 9 อำเภอ 15 จุดเก็บโดยตัวอย่างดินจากจังหวัดกาญจนบุรีเก็บจากพื้นที่จุดเก็บหลัก 3 จุด คือ ตำบลหินดาด อำเภอทองผาภูมิ ตำบลไล่โว่ อำเภอสังขละบุรี และตำบลนาสวน อำเภอศรีสวัสดิ์ ตัวอย่างดินจากจังหวัดราชบุรีเก็บจากพื้นที่จุดเก็บหลัก 3 จุดเช่นกัน คือ ตำบลตะนาวศรี อำเภอสวนผึ้ง ตำบลสวนผึ้ง อำเภอสวนผึ้ง และ ตำบลบ้านบึง อำเภอบ้านคา ส่วนตัวอย่างดินจากจังหวัดตากเก็บจากพื้นที่จุดเก็บหลัก 9 จุด คือ ตำบลแม่สอง และแม่อุสุ อำเภอท่าสองยาง ตำบลขะเนจือ อำเภอแม่ระมาด ตำบลพบพระ ช่องแคบ และคีรีราษฎร์ อำเภอพบพระ ตำบลโมโกร แม่จัน และหนองหลวง อำเภออุ้มผาง (Table 1)

Table 1 Soil samples collecting sites, Global position references, number of found actinomycetes colonies with isolate codes.

Collecting sites			Global position references	No. colonies found (isolates)	Isolate codes
Province	District	Subdistrict			
Kanchanaburi	Thong Pha Phum	Hindard	14.625433, 98.724330	84	KANAC001-084
	Sangkhlaburi	Laiwo	15.131590, 98.507908	67	KANAC085-151
	Srisawat	Nasuan	14.822794, 99.111468	42	KANAC152-193
Ratchaburi	Suanphung	Tanaosri	13.434425, 99.204525	76	RACAC001-076
	Suanphung	Suanphung	13.519311, 99.245548	8	RACAC077-084
	Ban Kha	Ban Bueng	13.260609, 99.407303	17	RACAC085-101
Tak	Tha Song Yang	Mae Song	17.520517, 97.968159	11	TAKAC001-011
	Tha Song Yang	Mae Usu	17.303757, 98.155377	16	TAKAC012-027
	Mae Ramat	Khanue Chue	17.060376, 98.440732	18	TAKAC028-045
	Phop Phra	Chong Kab	16.473977, 98.646314	4	TAKAC046-049
	Phop Phra	Phop Phra	16.437965, 98.660637	23	TAKAC050-072
	Phop Phra	Khiri Rat	16.429732, 98.976500	7	TAKAC073-079
	Umphang	Mokro	16.227439, 98.980398	21	TAKAC80-100
	Umphang	Mae Chan	15.839802, 98.648750	35	TAKAC101-135
	Umphang	Nong Luang	15.917815, 98.763465	48	TAKAC136-183
Total	9	15		477	

เมื่อทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท พบเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมดรวม 477 ไอโซเลทจากทุกพื้นที่ โดยตัวอย่างดินของจังหวัดกาญจนบุรี พบโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทรวม 193 ไอโซเลท จากพื้นที่ตำบลหินดาด อำเภอทองผาภูมิ ตำบลไล่โว่ อำเภอสังขละบุรี ตำบลนาสวน อำเภอศรีสวัสดิ์ จำนวน 84, 67 และ 42 ไอโซเลท ใส่รหัสเป็น KANAC001-193 จังหวัดราชบุรี พบโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท 101 ไอโซเลท จากพื้นที่ ตำบลตะนาวศรี และสวนผึ้ง อำเภอสวนผึ้ง ตำบลบ้านบึง อำเภอบ้านคา จำนวน 76, 8 และ 17 ไอโซเลท ใส่รหัสเป็น RACAC001-101 ส่วนตัวอย่างดินของจังหวัดตาก พบโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท 183 ไอโซเลท จาก ตำบลแม่สองและแม่อุสุอำเภอท่าสองยาง ตำบลขะเนจือ อำเภอแม่ระมาด ตำบลช่องแคบ พบพระและคีรีราษฎร์ อำเภอพบพระ ตำบลโมโกร แม่จันและหนองหลวง อำเภออุ้มผาง จำนวน 11, 16, 18, 4, 23, 7, 21, 35 และ 48 ไอโซเลท ใส่รหัสเป็น TAKAC001-183 (Table 1)

ในการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเบื้องต้นจากตัวอย่างดิน ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ SCA พบว่าสีสันของโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีความแตกต่างหลากหลายถึง 7 สี คือ ขาวนวล เทา ครีม เหลือง ดำ ส้ม และน้ำตาล ในสัดส่วนร้อยละ 34, 26, 15, 11,

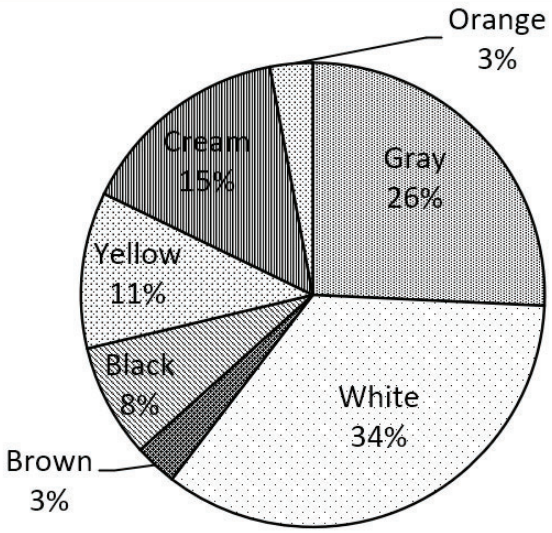

Figure 1 Ratio of the colors of actinomycetes colonies on SCA culture medium.

ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีศักยภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก

ผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลทต่างๆ ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ต่างๆ กับหนอนกระทู้ผัก พบว่าหนอนที่ตาย ส่วนใหญ่แสดงอาการผิดปกติตั้งแต่หลังกินสารสกัดนาน 12 ชั่วโมง อัตราการตายเริ่มพบที่ 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นต่อเนื่องช้าๆ จนถึงระดับสูงสุดที่ 72 ชั่วโมงหลังกินสารสกัด โดยพบสารสกัดหยาบของเชื้อจากจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 49 ไอโซเลทมีผลต่อการตายของหนอนกระทู้ผัก ในช่วงร้อยละ 3.3-70.0 ที่ 72 ชั่วโมงหลังได้รับสาร โดยแยกเป็นไอโซเลทของเชื้อจากตำบลหินดาด ไล่โว่ และนาสวนจำนวน 20, 27 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลท KANAC011 ทำให้หนอนกระทู้ผักมีอัตราการตายของสูงถึงร้อยละ 70.0

ที่จังหวัดราชบุรี สารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 101 ไอโซเลท พบสารสกัดหยาบจากเชื้อจำนวน 31 ไอโซเลทมีผลต่อการตายของหนอนกระทู้ผัก ในช่วงร้อยละ 3.3-72.0 ที่ 72 ชั่วโมงหลังได้รับสาร เป็นไอโซเลทเชื้อจากตำบลตะนาวศรี สวนผึ้ง และ บ้านบึง จำนวน 22, 1 และ 8 ไอโซเลท โดยสารสกัดหยาบของไอโซเลท RACAC007, RACAC032 และ RACAC055 ทำให้หนอนกระทู้ผักมีอัตราการตายของสูงถึงร้อยละ 53.5, 72.0 และ 63.7 ตามลำดับ

ที่จังหวัดตาก สารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 183 ไอโซเลท พบสารสกัดหยาบจากเชื้อ 68 ไอโซเลทมีผลต่อการตายของหนอนกระทู้ผัก ในช่วงร้อยละ 3.3-75.5 ที่ 72 ชั่วโมงหลังได้รับสาร เป็นไอโซเลทเชื้อจากตำบล แม่สอง แม่อุสุ ขะเนจือ โมโกร แม่จัน และ หนองหลวง จำนวน 6, 17, 12, 4, 18 และ 11 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลท TAKAC044, T AKAC094, TAKAC119, TAKAC178 และ TAKAC181 ทำให้หนอนกระทู้ผักมีอัตราการตายสูงถึง ร้อยละ 55.0, 75.5, 63.0, 60.0 และ 57.0 ตามลำดับ ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพในการทำให้หนอนกระทู้ผักตายเกินร้อยละ 50 จำนวน 9 ไอโซเลทสำหรับศึกษาในลำดับต่อไป (Table 2)

Table 2 Effect of crude extracts of culture media of actinomycetes isolates on *S. litura* larvae at 72 hours after contact.

Actinomycetes isolates	Effect of crude extracts of culture media of actinomycetes isolates on *S. litura* larvae			
	No. effective isolates (isolates)	Mortality ranges (%)	No. isolates with mortality rate >50% (isolates)	Isolate code with mortality rate (%)
KANAC001-084	20	(3.3-70.0%)	1	KANAC011(70%)
KANAC085-151	27		0	
KANAC152-193	2		0	
RACAC001-076	22	(3.3-72.0%)	3	RACAC007(53.5%), RACAC032(72.0%), RACAC055(63.7%)
RACAC077-084	1		0	
RACAC085-101	8		0	
TAKAC001-011	6	(3.3-75.5%)	0	
TAKAC012-027	17		0	
TAKAC028-045	12		1	TAKAC044(55.0%)
TAKAC046-049	0		0	
TAKAC050-072	0		0	
TAKAC073-079	0		0	
TAKAC80-100	4		1	TAKAC094(75.5%)
TAKAC101-135	18		1	TAKAC119(63.0%)
TAKAC136-183	11		2	TAKAC178(60.0%), TAKAC181(57.0%)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีศักยภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก กับหนอนใยผัก และเพลี้ยอ่อนผักในห้องปฏิบัติการ ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมงหลังได้รับสาร

ผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดสอบกับหนอนกระทู้ผักข้างต้นต่อเนื่องกับหนอนใยผักและเพลี้ยอ่อน พบว่า

ในกรณีหนอนใยผัก หนอนที่ตายเริ่มแสดงอาการผิดปกติหลังกินสารสกัดนาน 6 ชั่วโมง เริ่มพบอัตราการตายที่ 12 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นต่อเนื่องช้าๆ จนสูงสุด ที่ 72 ชั่วโมง โดยพบอัตราการตายของหนอนใยผักเกิดขึ้นจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท อยู่ในช่วงร้อยละ 3.3-73.5 โดยสารสกัดหยาบจากไอโซเลท KANAC011, RACAC055 และ TAKAC181 ทำให้หนอนใยผักมีอัตราการตายสูงร้อยละ 55.0, 70.5 และ 73.5 ตามลำดับ

เพลี้ยอ่อนผัก เริ่มแสดงอาการผิดปกติหลังได้รับสารสกัดนาน 12 ชั่วโมง พบอัตราการตายที่ 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นต่อเนื่องช้าๆ จนสูงสุด ที่ 72 ชั่วโมง อัตราการตายของเพลี้ยอ่อนผักที่เกิดขึ้นอยู่ในระดับที่ต่ำมาก และมีสารสกัดหยาบจากเชื้อเพียง 5 ไอโซเลทเท่านั้นที่มีผลต่อการตายของเพลี้ยอ่อนผัก คือไอโซเลท KANAC011, RACAC032, RACAC055, TAKAC094 และ TAKAC181 พบอัตราการตายที่ร้อยละ 10.0, 4.7, 21.3, 6.3 และ 14.0 ตามลำดับ (Table 3)

Table 3 Comparison on the mortality rate of *S. litura, P. xylostella* and *L. erysimi* after contact with crude extract of culture media of selected actinomycetes isolates.

Selected actinomycetes isolates	Mortality rate (%) after contact with crude extract of culture media		
	S. litura	*P. xylostella*	*L. erysimi*
KANAC011	70.0	55.0	10.0
RACAC007	53.5	14.3	0.0
RACAC032	72.0	29.5	4.7
RACAC055	63.7	70.5	21.3
TAKAC044	55.0	3.3	0
TAKAC094	75.5	21.7	6.3
TAKAC119	63.0	48.0	0
TAKAC178	60.0	33.5	0
TAKAC181	57.0	73.5	14.0

วิจารณ์

แอคติโนมัยซีทเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีถิ่นอาศัยที่หลากหลายมาก สามารถพบได้ทั่วไปในระบบนิเวศในธรรมชาติ เช่นในดิน ในรากและเนื้อเยื่อพืช ในดินที่เค็มจัด ดินตะกอนแม่น้ำ ดินตะกอนแนวชายฝั่งทะเล หินปูน แหล่งน้ำจืด ทะเล ฟองน้ำ ถ้ำ ภูเขาไฟ บ่อน้ำพุร้อน ทะเลทราย อากาศ ในลำไส้สัตว์ มูลสัตว์ (Rifaat, 2003; Benhadj *et al*., 2018; Selim *et al*., 2021; Ruttanasutja and Pathom-aree, 2015; Cheeptham *et al*., 2013; Shan *et al*., 2018) Talekar และ Shelton (1993) รายงานว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยส่วนใหญ่พบในดินมากที่สุดถึงร้อยละ 90 โดยแอคติโนมัยซีทที่พบบริเวณผิวหน้าดินความลึกประมาณ 5-10 เซนติเมตร ไม่เกิน 1 เมตร จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* มากถึงร้อยละ 80 (Anupama *et al*., 2007; Xu *et al*., 1996) ดินในเขตภูมิอากาศร้อนพบจำนวนแอคติโนมัยซีทอาศัยอยู่มากกว่าดินในเขตภูมิอากาศอบอุ่น (Cross, 1968) Jayasinghe และ Parkinson (2008) รายงานว่าพื้นที่ป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ชนิดต่างๆ เช่น ป่าสนในอเมริกาเหนือ และอินเดีย ป่าฝนเขตร้อนในสิงค์โปร์ และป่าภูเขาในญี่ปุ่น สามารถค้นพบเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายได้เป็นจำนวนมาก เนื่องจากพื้นที่ป่าโดยทั่วไปมีความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีกลไกตามธรรมชาติที่ควบคุมสมดุลของระบบให้คงความเสถียรได้อย่างยั่งยืน ผ่านทางสายโซ่อาหารระหว่างผู้ผลิต ผู้บริโภคและผู้ย่อยสลายที่สลับซับซ้อนมากกว่าบริเวณอื่นๆ แอคติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในฐานะของการเป็นผู้ย่อยสลายโดยการก่อโรคกับพืช และสัตว์ทั้งในส่วนที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต ในระบบนิเวศป่าฝน ผลของการย่อยสลายคือดิน และธาตุอาหารต่างๆ ที่หมุนเวียนคืนกลับสู่ผืนป่า จากผลการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าฝนตามแนวชายแดนไทยเมียนมา 15 พื้นที่ ครอบคลุม 3 จังหวัด คือ ราชบุรี กาญจนบุรีและตาก สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินได้ทั้งหมดถึง 477 ไอโซเลต โดยพื้นที่ชายป่าเป็นบริเวณที่พบเชื้อแอคติโนมัยซีทมากที่สุดเฉลี่ย 44.4 โคโลนีต่อพื้นที่ เช่นเดียวกับ การคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ของ ชนินทร์ และคณะ (2546) ที่พบแอคติโนมัยซีทจำนวนมากถึง 160 และ 186 ไอโซเลทตามลำดับ

สีของโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ปรากฏบนอาหารที่เพาะเลี้ยงเป็นลักษณะทางกายภาพที่มักพบได้โดยทั่วไป (Pridham, 1964) โดยเชื้อสามารถสร้างสีได้หลากหลาย เช่นแดง เหลือง ส้ม ชมพูครีม น้ำตาล ม่วง เป็นต้น และมักใช้ประกอบในการคัดแยกเชื้อ

ในเบื้องต้นร่วมกับลักษณะอื่นๆ ของโคโลนี เช่น ผิวโคโลนี เส้นใย การสร้างเมือก ฯลฯ (Kim, 1992) ในการศึกษาครั้งนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้มีความหลากหลายของสีโคโลนีแตกต่างกันถึง 7 สี โดยสีขาวนวลและสีเทาเป็นสีที่พบมากถึง ร้อยละ 34 และ 26 เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Malisorn และ Nikhome (2014) ซึ่งทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินที่เก็บรวบรวมจากอุทยานแห่งชาติภูลังกาพบเชื้อแอคติมัยซีท 129 ไอโซเลท โดยโคโลนีส่วนใหญ่ที่พบมีสีเทาและขาว ถึงร้อยละ 25 และ 24

บทบาทสำคัญเชื้อแอคติโนมัยซีทคือเป็นผู้ผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อน และมีศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์มากมายทางการแพทย์ อุตสาหกรรม ปิโตรเคมีและเกษตร ยกตัวอย่างเช่น ยาปฏิชีวนะ (Balachandar *et al*., 2018) เอนไซม์สำคัญหลายชนิด (Kafilzadeh and Dehdari, 2015; Zhao et al., 2017) สารเคมีกำจัดวัชพืช (Singh *et al*., 2018) และสารเคมีกำจัดแมลง (Loganathan *et al*., 2013) เป็นต้น สารเมตาโบไลท์ที่เชื้อผลิตขึ้นมีทั้งแบบ intra cellular และ intercellular metabolites การศึกษาของ Vijayabharathi และคณะ (2014) พบว่าสารเมตาโบไลท์ที่เชื้อแอคติโนมัยซีทผลิตขึ้นและเกี่ยวข้องกับการควบคุมแมลงศัตรูพืชนั้น ส่วนใหญ่เป็นชนิด intercellular ที่เซลล์ผลิตขึ้นและปลดปล่อยออกจากเซลล์ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ สามารถทำการสกัดได้ง่าย และใช้ในการพ่นบนพืชเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชได้โดยตรง

ในช่วงระยะเวลา 50 ปีที่ผ่านมามีการศึกษาค้นพบสารเมตาโบไลท์จากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงและศัตรูพืชหลากหลายชนิด รวมทั้งแมลงในเคหะสถาน เช่น แมลงสาบ มด เป็นต้น (Dybas, 1989; Lasota and Dybas, 1991) สารเมตาโบไลท์ที่ได้จากเชื้อมีกลไกเข้าไปรบกวนการส่งผ่านกระแสประสาทในส่วนของ nicotinic acetylcholine receptors และ γ-amino-butyric acid (GABA) neurotransmitter และมีผลทำให้แมลงเกิดภาวะ hyperexcitation ชัก เป็นอัมพาต และตายในที่สุด โดยหลายชนิดได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างกว้างขวาง เช่น อะบาเม็คติน อีมาเมคติน เบ็นโซเอต (Dybas *et al*., 1989; Cox *et al*., 1995; Jansson *et al*., 1997) สปินโนแซดและสไปนิโทแรม (Wanner *et al*., 2000; Kharboutli *et al*., 1999; Downard, 2001; Wang *et al*., 2009; Pineda *et al*., (2006) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่ๆ ที่สร้างสารเมตาโบไลท์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมศัตรูพืชยังคงดำเนินการต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากสารเมตาโบไลท์เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยเชื้อชนิดใหม่ๆ ที่ถูกค้นพบและรายงานนั้นแม้สัดส่วนของการค้นพบเชื้อเป้าหมายมีโอกาสต่ำมากในระดับน้อยกว่า ร้อยละ 1 ก็ตาม เช่น สารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท 20 ไอโซเลท คัดแยกจากดินทะเลทรายจุดต่างๆ รอบๆ เมืองไคโร พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลท A11 มีประสิทธิภาพควบคุมหนอนกระทู้ผักได้ดี (El-khawaga and Megahed, 2012) Chen และคณะ (2018) คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 85 strains ได้จากต้นสะเดา และใช้สารสกัดหยาบทดสอบกับเพลี้ยอ่อน *Myzus persicae* พบว่า สารสกัดหยาบจากเชื้อ 8 strains มีประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยอ่อนในอัตราการตายที่ มากกว่าร้อยละ 60 โดย strain G30 มีพิษสูงสุดกับเพลี้ยอ่อน LC50 และ LC95 เท่ากับ 1.680 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 4.370 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมงหลังสัมผัสเชื้อ Shivakumar และคณะ (2015) พบว่า สารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท AUDT-732 และ AUDT-55 มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักด้วยอัตราการตายที่ ร้อยละ 83.3 และ 76.6 ตามลำดับ และสามารถควบคุมหนอนกระทู้ผักด้วยอัตราการตายที่ร้อยละ 50 และ 43.3 ตามลำดับ

นอกจากนี้พบว่าสารสกัดหยาบของเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงศัตรูผักทั้งสามชนิดในระดับสูงสุดนั้นมีความจำเพาะเจาะจงที่จำกัดต่อชนิดของแมลงมาก โดยสารสกัดจาก

ไอโซเลท TAKAC094 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมหนอนกระทู้ผักได้ถึงร้อยละ 75.5 แต่มีผลต่อหนอนใยผักและเพลี้ยอ่อนผักในระดับต่ำ เพียงร้อยละ 21.7 และ 6.3 เท่านั้น เช่นเดียวกับ ไอโซเลท TAKAC181 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักได้ดีสูงถึงร้อยละ 73.5 แต่มีผลต่อหนอนกระทู้ผักและเพลี้ยอ่อนร้อยละ 57.0 และ 14 ตามลำดับ โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้ในเบื้องต้นยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด

อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากไอโซเลท RACAC055 จากราชบุรี มีแนวโน้มที่สามารถควบคุมแมลงศัตรูผักทั้ง 3 ชนิดได้ดี ให้ผลในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก และเพลี้ยอ่อนผัก ได้ร้อยละ 63.7, 70.5 และ 21.3 ตามลำดับ ดังนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท คือ RACAC055 เพื่อศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของชีวโมเลกุล จุลชีววิทยา ชีวเคมี และพิษวิทยา สำหรับพัฒนาต่อยอดและใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูผักต่อไป

สรุป

การศึกษาคัดแยกและจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินป่าในพื้นที่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรีและตาก พบเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวนทั้งหมด 477 ไอโซเลท และพบว่าสารสกัดหยาบจากอาหารเหลวที่ใช้ขยายเชื้อจำนวน 9 ไอโซเลท KANAC011, RACAC007, RACAC032, RACAC055, TAKAC044, TAKAC094, TAKAC119, TAKAC178 และ TAKAC181 มีประสิทธิภาพในการทำให้หนอนกระทู้ตายได้ในอัตราสูงกว่าร้อยละ 50 โดยไอโซเลท TAKAC094 พบอัตราการตายของหนอนสูงสุดร้อยละ 75.5 ในจำนวนทั้ง 9 ไอโซเลทนี้ พบเชื้อแอคติโนมัยซีท 3 ไอโซเลทที่ทำให้หนอนใยผักตายในอัตราสูงกว่าร้อยละ 50 คือ KANAC011 RACAC055 TAKAC181 เท่ากับร้อยละ 55.0, 70.5 และ 73.5 อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 9 ไอโซเลทมีผลต่อเพลี้ยอ่อนผักในระดับต่ำมาก โดยพบไอโซเลท RACAC055 มีอัตราการตายของเพลี้ยอ่อนผักสูงที่สุดคือร้อยละ 21.3 เท่านั้น และเมื่อพิจารณาผลการทดสอบโดยรวมกับ หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก และเพลี้ยอ่อนผัก พบว่าสารสกัดหยาบจากไอโซเลท RACAC055 จากราชบุรี มีแนวโน้มที่สามารถควบคุมแมลงศัตรูผักทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด ให้ผลในการควบคุมได้ร้อยละ 63.7, 70.5 และ 21.3 ตามลำดับ ดังนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท RACAC055 เพื่อศึกษาเพิ่มเติมและพัฒนาต่อยอดสู่การใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูผักต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนล่าง มหาวิทยาลัยนเรศวร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทำการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ชนินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา น้ำฝน ป้อมทอง จรัญ เจตนะจิตร พัชรี สุนทรนัน และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2546. เชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรังบริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่า เขานางรำ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง. ในรายงานการประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม). หน้า 363-370. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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.

Balachandar, R., N. Karmegam, M. Saravanan, R. Subbaiya and P. Gurumoorthy. 2018. Synthesis of bioactive compounds from vermicast isolated actinomycetes species and its antimicrobial activity against human pathogenic bacteria. Microbial Pathogenesis. 121: 155-165.

Benhadj, M., D. Gacemi-Kirane, T. Menasria, K. Guebla and Z. Ahmane. 2018. Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. Journal of King Saud University – Science. Doi: 10.1016/j.jksus.2018.03.008.

Cheeptham, N., T. Sadoway, D. Rule, K. Watson, P. Moote, L. C. Soliman, N. Azad, K. K. Donkor and D. Horne. 2013. Cure from the cave: volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. International Journal of Speleology. 42(1): 35-47.

Chen, Y., J. Shafi, M. Li, D. Fu and M. Ji. 2018. Insecticidal activity of endophytic actinomycetes isolated from *Azadirachta indica* against *Myzus persicae*. Arch. Biol. Sci. 70(2): 349-357.

Coombs, J. T., and C. M. M. Franco. 2003. Isolation and identification of actinobacteria from surface sterilized wheat root. Applied and Environmental Microbiology. 69: 5603-5608.

Cox, D. L., D. Remick, J. A. Lasota and R. A. Dybas. 1995. Toxicity of avermectins to *Liriomyza trifolii* (Diptera Agromyzidae) larvae and adults. J. Econ. Entomol. 88: 1415–1419.

Cross, T. 1968. Thermophilic actinomycetes. Journal of Applied Microbiology. 31: 36-53.

Dahiya, N., R. Tawari, and G. H. Sigh. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Applied Microbiology and Biotechnology. 71: 773-782.

Downard, P. 2001. Spinosad controls a range of lepidopteran pests in crucifers in Australia. In: Proc 4th Int Work Melbourne, Nov 2001, Australia, pp 351–355.

Dybas, R. A. 1989. Abamectin use in crop protection. pp 287–310. In: W.C. Campbell (ed) Ivermectin and Abamectin. Springer, Berlin.

Dybas, R.A., N. J. Hilton, J. R. Babu, F. A. Preiser and G. J. Dolce. 1989. Novel second-generation avermectin insecticides and miticides for crop protection. pp 203–212. *In*: A. L. Demain, G. A. Somkuti, J. C. Hunter-Cevera and H. W. Rossmoore. (eds) Novel microbial products for medicine and agriculture. Society Industrial Microbiology, Annandale.

El-khawaga M. A. and M. M. M. Megahed. 2012. Antibacterial and insecticidal activity of actinomycetes isolated from sandy soil of (Cairo-Egypt). Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. 4(1): 53-67.

Jansson, R. K., R. F. Peterson, P. K. Mookerjee, W. R. Halliday, J. A. Argentine and R. A. Dybas. 1997. Development of a novel soluble granule formulation of emamectin benzoate for control of Lepidopterous pests. Florida Entomologist. 80: 425–442.

Jayasinghe, B. A. T. D. and D. Parkinson. 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. Applied Soil Ecology. 38: 109-118.

Kafilzadeh, F. and F. Dehdari. 2015. Amylase activity of aquatic actinomycetes isolated from the sediments of mangrove

forests in south of Iran. Egyptian Journal of Aquatic Research. 41(2): 197-201.

Kharboutli, M. S., C. T. Allen, C. Jr. Capps, L. Earnest and D. M. Oosterhuis. 1999. Bollworm and tobacco budworm control studies. pp 209–213. *In*: Proceedings of the cotton research meeting and summaries of cotton research in progress, Arkansas, USA.

Kim, J. C. 1992. Isolation and screening of actinomycetes from natural environment. In UNESCO Regional Training Workshop on Exploitation of Novel Microorganism, Especially Actiomycetes. Taedox Science Town, Taejon, Republic of Korea, 29 September 2019.

Lacey, L. A. 1997. Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, New York. 409 p.

Lasota, J. A. and R. A. Dybas. 1991. Avermectin, a novel class of compound: implications for use in arthropod pest control. Annual Review of Entomology. 36: 96–117.

Loganathan, K., G. Kumar, A. V. Kirthi, K. V. B. Rao and A. A. Rahuman. 2013. Entomopathogenic marine actinomycetes as potential and low-cost biocontrol agents against bloodsucking arthropods. Parasitol. Res. 112(11): 3951-3959.

Madigan, M. T., and J. M. Martinko. 2006. Biological of Microorganism. 11th ed. Upper Saddle River NJ: Pearson Prentice Hall. 992 p.

Malisorn, K. and K. Nikhome. 2014. Isolation and screening of Actinomycetes from soil for their enzymatic and antifungal activity. Khon Kaen Agriculture Journal. 42 (suppl.4): 151-156.

McCarthy, J. A., and T. S. Williams. 1990. Methods for studying the ecology of actinomycetes. pp 533-563. *In*: R. Grigorova and J. R. Norris (Eds.) Method in Microbiology. Academic Press Limited, London.

Mertz, F. P. and R. C. Yao. 1990. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still. International Journal of Systematic Bacteriology. 40: 34–39.

Pineda, S., G. Smagghe, M. I. Schneider, P. D. Estal, E. Vinuela, A. M. Martinez and F. Budia. 2006. Toxicity and pharmacokinetics of spinosad and methoxyfenozide to *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Environmental Entomology. 35: 856–864.

Pridham, T. G. 1964. Color of Streptomyces: report of an international workshop on determination of color of Streptomyces. Applied Microbiology. 13: 43-61.

Rifaat, H. M. 2003. The biodiversity of actinomycetes in the River Nile exhibiting antifungal activity. J. Mediterr. Ecol. 4(3-4): 5-7.

Ruttanasutja, P. and W. Pathom-aree. 2015. Selective isolation of cultivable actinomycetes from Thai coastal marine sediment. Chiang Mai Journal of Science. 42(1): 89-104.

Selim, M. S. M., S. A. Abdelhamid and S. S. Mohamed. 2021. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 19: 1-132.

Shan, W., Y. Zhou, H. Liu and X. Yu. 2018. Endophytic actinomycetes from tea

plants (*Camellia sinensis*): isolation, abundance, antimicrobial, and plant-growth-promoting activities. BioMed Research International. 12 p.

Shivakumar, C., P. Hugar and P U Krishnaraj. 2015. Bioassay of *Plutella xylostella* and *Spodoptera litura* as influenced by different concentrations of cultural filtrate of potent actinomycetes isolates. Biochemical and Cellular Archives. 15. 531-533.

Siegfried, K., K. Philip, and S. Christian. 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. Biocontrol 48: 307-319.

Singh, H., B. Naik, V. Kumar and G. S. Bisht. 2018. Screening of endophytic actinomycetes for their herbicidal activity. Annals of Agricultural Sciences. 16(2): 101-107.

Sujitwanit, A., P. Chunthong, J. Piluk, W., Tantithanagorngul, V. Tolieng, T. Palaga, P. Sangvanich, A. Petsom and P. Pinphanichakarn. 2007. Screening for insecticide-producing Streptomyces isolates from Thai soil. The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology.

Talekar, N. and A. Shelton. 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. Annual Review of Entomology. 38(1): 275-301.

Vijayabharathi, R., B. R. Kumari, A. Sathya, V. Srinivas, R. Abhishek, H. C. Sharma and S. Gopalakrishnan. 2014. Biological activity of entomopathogenic actinomycetes against lepidopteran insects (Noctuidae: Lepidoptera). Canadian Journal of Plant Science. 94: 759-769.

Wang, D., X. Qiu, X. Ren, W. Zhang and K. Wang. 2009. Effects of spinosad on *Helicoverpa armigera* from China: tolerance status, synergism and enzymatic responses. Pest Management Science. 65: 1040–1046.

Wanner, K. W., B. V. Helson and B. J. Harris. 2000. Laboratory and field evaluation of spinosad against the gypsy moth, *Lymantria dispar*. Pest Management Science. 56: 855–860.

Xu, L. H., Q. I. Li and C. L. Jiang. 1996. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. Applied and Environmental Microbiology Journal. 62(1): 244-248.

Zhao, Y., Y. Zhao, Z. Zhang, Y. Wei, H. Wang, Q. Lu, Y. Li and Z. Wei. 2017. Effect of thermo-tolerant actinomycetes inoculation on cellulose degradation and the formation of humic substances during composting. Waste Managemen. 68: 64-73.