การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์เพื่อใช้ในการเตรียมสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพและพัฒนาสูตรหัวเชื้อผงสำหรับควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคข้าว

Screening of Antagonistic Actinomyces for the Preparation of Bioactive Crude Extract and Development of Starter Culture Powder for Suppression of Rice Pathogen

ทายาท ศรียาภัย[1] กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์[1] อรินทม์ งามนิยม[1] และ พิชาภัค ศรียาภัย[2*]

Thayat Sriyapai[1], Kun Silprasita[1], Arin Ngamniyoma[1] and Pichapak Sriyapai[2*]

[1]คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[1]Faculty of Environmental Culture and Ecotourism, Srinakharinwirot University

[2]Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Srinakharinwirot University

Received : 28 April 2017

Accepted : 16 October 2017

Published online : 20 October 2017

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์จากดินแปลงเกษตรในจังหวัดปทุมธานี และนครนายกเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) *Pyricularia oryzae* และ *Sclerotium* sp. ที่เป็นสาเหตุการก่อโรคขอบใบแห้ง โรคใบไหม้ และโรคลำต้นเน่าในข้าว ตามลำดับ เชื้อที่คัดแยกได้ถูกจัดจำแนกอยู่ในจีนัส *Streptomyces* และ *Micromonospora* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA *Streptomyces* จำนวน 9 สายพันธุ์มีศักยภาพสูงในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราเมื่อศึกษาบนอาหารแข็ง โดยพบว่า *Streptomyces hygroscopicus* สายพันธุ์ SWU-TH39 แสดงการยับยั้งทั้ง Xoo และเชื้อรา *Pyricularia oryzae* และ *Sclerotium* sp ได้สูงที่สุด เชื้อสายพันธุ์นี้ยังผลิตสารที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ indole-acetic acid (IAA) และ siderophores สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตจากสายพันธุ์ SWU-TH39 ถูกผลิตในอาหาร modified-antibiotic production medium และสกัดด้วยตัวทำละลาย *n*-butanol ซึ่งสามารถสกัดสารยับยั้งทั้งแบคทีเรีย Xoo และเชื้อราก่อโรคข้าวได้ดีที่สุด นอกจากนี้เชื้อสายพันธุ์ SWU-TH39 ยังสามารถนำมาพัฒนาเป็นสูตรหัวเชื้อผงและรักษาเซลล์ของแบคทีเรียให้อยู่รอดที่ $8x10^8$ CFU/g หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน เซลล์ที่อยู่รอดในหัวเชื้อผงยังคงให้ศักยภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าวและการผลิตสารสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืช

คำสำคัญ : แอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ จุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว การยับยั้งจุลินทรีย์ หัวเชื้อผงสารสกัดจุลินทรีย์

***Corresponding author. E-mail** : peechapack@g.swu.ac.th

Abstract

In the present study, several strains of antagonist actinomyces obtained from soils of agricultural fields in Pathum-Thani and Nakhon-Nayok province were screened for antagonistic activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) *Pyricularia oryzae* and *Sclerotium* sp., the causative agents of bacterial blight disease, blast disease and stem rot disease of rice, respectively. The isolates were identified as genus *Streptomyces* based on colony morphology, scanning electron microscope and 16S rRNA gene analysis. Nine *Streptomyces* isolates produced potential antibacterial or antifungal compounds on screening agars. Among of them, *Streptomyces hygroscopicus* strain SWU-TH39 showed the highest inhibition zone against both Xoo and rice pathogenic fungi such as *Pyricularia oryzae* and *Sclerotium* sp. This strain also produced plant growth promoting compounds including indole-acetic acid (IAA) and siderophores. The antimicrobial compounds produced by strain SWU-TH39 was obtained in modified-antibiotic production medium and extracted by solvent extraction method. *n*-Butanol was the best extraction solvent for the recovery of the antimicrobial compounds for inhibition against both Xoo and tested fungal phytopathogen. Furthermore, SWU-TH39 was adapted to the development of starter culture in powder formulation and, remarkably, this was successful as a carrier to maintain bacterial survival with 8×10^{8} CFU/g after 6-month storage at room temperature. Viable cells in the starter retained not only antagonistic potential against rice pathogens, but also capabilities of the production of plant growth promoting substances.

Keywords : antagonist actinomyces, rice pathogens, antimicrobial, starter culture powder

บทนำ

ปัญหาการระบาดของโรคพืชเศรษฐกิจที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ยังคงเป็นปัญหาสำคัญของเกษตรกรไทย โดยเฉพาะการระบาดของเชื้อราและแบคทีเรียที่ก่อโรคในการเพาะปลูกข้าว ส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตข้าวเป็นอย่างมาก ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคระบาดในข้าวที่สำคัญ เช่น *Pyricularia grisea* ก่อโรคไหม้, *Curvularia* sp. ก่อโรคเมล็ดด่าง, *Sclerotium* sp. ก่อโรคลำต้นเน่า และแบคทีเรีย เช่น *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) ก่อโรคขอบใบแห้ง (Dai *et al.,* 2007) ปัจจุบันการควบคุมโรคพืชด้วยสารเคมีพบว่ายังไม่ให้ผลดีเท่าที่ควรและยังก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมที่ขาดการแก้ไขอย่างต่อเนื่องมาเป็นระยะเวลาหลายสิบปี ทั้งปัญหาการสะสมสารพิษในสิ่งแวดล้อมและความเสื่อมโทรมของดินอันเนื่องจากขาดการบำรุงดินอย่างถูกวิธี (Zaitlin *et al.,* 2004) ดังนั้นการเพิ่มขีดความสามารถในการควบคุมโรคในการผลิตข้าวด้วยชีววิธีจากการพัฒนาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อใช้เป็นสารชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมโรคและรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดินนับว่าเป็นแนวทางที่มีความปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

หลักการของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่นำมาประยุกต์ใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ที่สามารถลดจำนวนหรือลดความสามารถในการก่อโรคของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชโดยอาศัยกลไกใดกลไกหนึ่ง เช่น การสร้างสารยับยั้ง การแข่งขันการเจริญ การเป็นปรสิต และการชักนำให้เกิดความต้านทานโรค ได้มีงานวิจัยที่พัฒนาสารชีวภัณฑ์จากแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์เพื่อควบคุมการระบาดของราและแบคทีเรียที่ก่อโรคในข้าวกันอย่างกว้างขวาง (Park *et al.,* 2011; Hastuti *et al.,* 2012)

โดยเฉพาะเชื้อในจีนัส *Streptomyces* ที่คัดแยกได้จากแปลงเกษตรกรรมและจากธรรมชาติที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้วว่ามีศักยภาพสูงในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดที่สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชได้ (Bressan, 2003; Yu *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตามยังมีรายงานการวิจัยน้อยมากที่ทำการศึกษาเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชและยังมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ตลอดจนเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินจากผลของฮอร์โมนหรือเอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้น ดังนั้นในการวิจัยนี้ได้คัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการดังกล่าวจนสามารถจะนำมาพัฒนาเป็นสารสกัดและผลิตภัณฑ์หัวเชื้อผงเพื่อทดสอบผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคข้าวในห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อและศึกษาลักษณะแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์

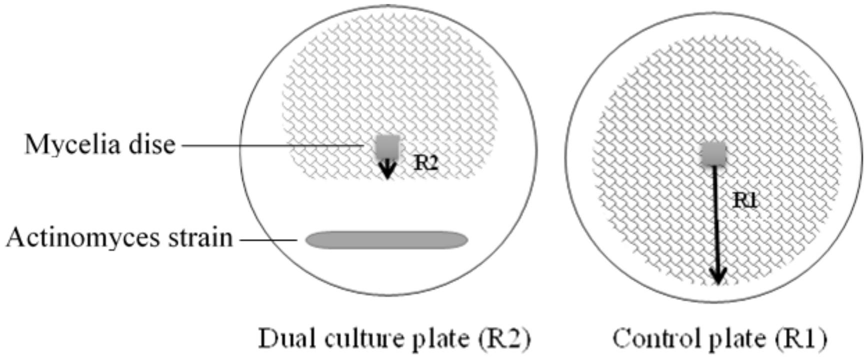
ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินในบริเวณพื้นที่การเกษตร เช่น ดินในแปลงนาข้าวและดินกองปุ๋ยหมักในจังหวัดปทุมธานี และจังหวัดนครนายกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ Nutrient agar (NA), Trypticase soy agar (TSA) และ Starch-Casein agar (SCA) ประกอบด้วย soluble starch 10 g/L, KNO_3 2 g/L, NaCl 2 g/L, casein 0.3 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 g/L, $CaCO_3$ 0.02 g/L, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 g/L และ agar 15 g/L ปรับ pH 7.2 โดยใช้เทคนิค dilution spread plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ จากนั้นทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียโรคพืชและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจะถูกนำมาทดสอบการย้อมสีแบบแกรม ตรวจสอบรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ศึกษาลักษณะเฉพาะเชื้อบนอาหารแข็ง International Streptomyces Project (ISP) (Williams *et al*, 1989) ได้แก่ yeast-malt extract agar (ISP-2) ประกอบด้วย yeast extract 4 g/L, malt extract 10 g/L, dextrose 4 g/L และ agar 20 g/L oatmeal agar (ISP-3) ประกอบด้วย oatmeal 20 g/L และ agar 20 g/L inorganic salts-starch agar (ISP-4) ประกอบด้วย soluble starch 10 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 1 g/L, NaCl 1 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L, $CaCO_3$ 2 g/L, trace salts solution 1 ml และ agar 20 g/L การเตรียม trace salts solution 100 ml ประกอบด้วย $FeSO_4.7H_2O$ 0.1 g, $MnCl_2.4H_2O$ 0.1 g และ $ZnSO_4.7H_2O$ 0.1 g และ glycerol asparagine agar (ISP-5) ประกอบด้วย L-asparagine 1 g/L, glycerol 10 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, trace salts solution 1 ml และ agar 20 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะสีและการเจริญของ aerial mycelium ลักษณะโคโลนี ลักษณะของเส้นสายสปอร์ที่ปรากฏอยู่บนอาหารในแต่ละชนิด เมื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM : Scanning Electron Microscope) โดยเลี้ยงแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์บนอาหาร ISP-2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ เพื่อให้เชื้อเจริญเต็มที่และสร้างสปอร์ที่สมบูรณ์

2. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียโรคพืชด้วยแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์

เชื้อก่อโรคข้าวที่ใช้ทดสอบเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงในแปลงนา ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจากศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท จังหวัดชัยนาท เชื้อราโรคข้าวที่ใช้ทดสอบได้แก่ *P. grisea* ที่ก่อโรคไหม้ในข้าว, *Sclerotium* sp. ที่ก่อโรคลำต้นเน่า และเชื้อแบคทีเรีย Xoo ที่ก่อโรคขอบใบแห้ง การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์โดยวิธี dual culture plate technique เริ่มจากเลี้ยงแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยขีดเชื้อให้มี

ระยะห่างจากขอบจานเพาะเชื้อประมาณ 2 เซนติเมตร บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วันจนเชื้อสร้างสปอร์ตามแนวรอยที่ขีด จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อราก่อโรคพืชที่เจริญบน PDA วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน จัดชุดการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ ตรวจผลโดยวัดขนาดรัศมีของ inhibition zone และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากขนาดการเจริญของเชื้อราด้านที่เจริญไปหาแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ (R2) และ ขนาดรัศมีของเชื้อราที่เจริญในจานเลี้ยงเชื้อควบคุมที่ไม่ได้ขีดเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ (R1) (ภาพที่ 1) โดยใช้สูตรดังนี้

% การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ = (R1-R2)/R1 x100



ภาพที่ 1 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Xoo สายพันธุ์ที่ก่อโรคได้รุนแรงด้วยแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ โดยวิธี agar diffusion method เริ่มจากเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ Xoo บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร potato peptone agar (PPA) ประกอบด้วย potato 300 g/L, $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ 0.33 g/L, $Na_2HPO_4.12H_2O$ 1.33 g/L, peptone 3.34 g/L, sucrose 13.34 g/L และ agar 20 g/L ไปเลี้ยงในอาหารเหลว potato peptone broth (PPB) ปริมาณ 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จนได้ปริมาณเซลล์ประมาณ 10^8 CFU/ml จากนั้นกระจายเชื้อลงบนอาหาร PPA และใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง antibiotic producing medium (APM) ประกอบด้วย soluble starch 10 g/L, glucose 10 g/L, soybean 10 g/L, $CaCO_3$ 3 g/L, peptone 10 g/L, tween 80 100 μl/L และ agar 20 g/L วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดความกว้างของ inhibition zone ของแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย Xoo คัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งทั้งเชื้อราและแบคทีเรียเพื่อจำแนกชนิดและทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารสกัดในอาหารเหลวเพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าวต่อไป

3. การจำแนกชนิดแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

เพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลว ISP-3 ปริมาตร 100 ml ในฟลาสก์ขนาด 250 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 3 - 5 วัน ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของเชื้อแต่ละไอโซเลท ทำตามวิธีการที่ประยุกต์มาจากวิธีของ

Kieser และคณะ (Kieser *et al.*, 2000) นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ และนำมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ universal primers คือ Forward 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') และ Reverse 1525r (5'-AAG GAG GTG WTC CAR CC-3') (Lane, 1991) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำบริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification test kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) และส่งไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ความคล้ายคลึงเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งอยู่บนเวบไซต์ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Blastn

4. การศึกษาศักยภาพในการผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

วิเคราะห์ความสามารถในการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) ตามวิธีของ Bharucha และคณะ (Bharucha *et al.*, 2013) เลี้ยงแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ในอาหาร ISP-3 ปริมาตร 100 ml ในฟลาสก์ขนาด 250 ml เป็นเวลา 7 วัน ทำการเจาะเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่ต้องการ (โดยเลือกบริเวณที่มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน) ลงในอาหาร ISP-3 ที่เติม tryptophan 1 g/L นำเชื้อที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาแยกส่วนสารละลายใสโดยการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนสารละลายใสไปวิเคราะห์หา IAA โดยปิเปตน้ำเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 ml เติม Ortho-phosphoric acid ปริมาตร 20 μl และ Salkowski's reagent (เตรียมสาร 50 ml ประกอบด้วย 35% (w/v) $HClO_4$ และ $FeCl_3$ 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 ml) ปริมาตร 4 ml บ่มในที่มืด 1 ชั่วโมง นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (DR/4000 U, Hach) คำนวณปริมาณ IAA ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร IAA บริสุทธิ์ (MW = 175.19) ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 50, 100, 150 μmol

ทดสอบการผลิต siderophore ของแอคติโนมัยซีท ด้วยวิธี Chrome Azurol Sulfonate (CAS) assay เชื้อที่สร้าง siderophore รอบๆ โคโลนีจะเปลี่ยนสีอาหาร CAS agar จากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง (Schwyn & Neilands, 1987)

ตรวจสอบความสามารถในผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส โดยเลี้ยงแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่แยกได้ในอาหารแข็ง actinomyces medium (Techapun *et al.*, 2001) ประกอบด้วย yeast extract 2 g/L, peptone 1 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1.4 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, tween 80 2 ml, trace element solution 1 ml (เตรียมปริมาตร 100 ml ประกอบด้วย $ZnSO_4.7H_2O$ 0.14 g, $MnSO_4.5H_2O$ 0.15 g, $FeSO_4.7H_2O$ 0.5 g และ $CoCl_2.6H_2O$ 0.2 g) และ agar 20 g/L เติมสับสเตรทสำหรับตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ 1%(w/v) carboxymenthyl cellulose (CMC) หรือ 1%(w/v) avicel หรือ 1%(w/v) laminarin และ สำหรับตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนส คือ 1%(w/v) oat spelts xylan บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นย้อมด้วยการเทสารละลาย Congo red 0.1 % (w/v)ให้ท่วมอาหารแข็งทิ้งไว้ 3 นาที และล้างด้วยสารละลาย NaCl 1 โมลลาร์ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสรอบโคโลนี (clear zone)

ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไคติน โดยนำแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่เจริญบนอาหาร ISP-2 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไคติน ด้วยวิธีการจุดเชื้อ (point inoculation) ลงบนอาหารแข็ง ISP-2 ที่เติม 5% (w/v) colloidal chitin จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-10 วัน สังเกต

ความสามารถในการย่อยสลายไคตินจากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและบริเวณใส

5. การผลิตและการสกัดสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โรคพืช

ศึกษาศักยภาพในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืชในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยนำแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified APM ที่ปรับปรุงจากสูตรของ APM (Hoa *et al.*, 2012) โดยการเพิ่มองค์ประกอบของ soy bean meal เป็น 5 เปอร์เซ็นต์ และ starch glucose yeast (SGY) medium ประกอบด้วย soluble starch 10 g/L, glucose 10 g/L, glycerol 10 g/L, corn flour 2.5 g/L, peptone 5 g/L, yeast extract 2 g/L และ $CaCO_3$ 3 g/L (Ismet *et al.*, 2004) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาสกัดโดยปั่นเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 100 ml มาทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเติมตัวทำละลายแต่ละชนิด เช่น *n*-butanol หรือ ethyl acetate ปริมาตร 100 ml ลงในกรวยแยกและเขย่าให้ตัวทำละลายสัมผัสกับตัวอย่างอย่างทั่วถึงและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนของตัวทำละลายเพื่อสกัดซ้ำจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำส่วนของตัวทำละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดัน (vacuum rotary evaporator) ละลายสารสกัดที่ได้ด้วย 100% (w/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นกรองด้วย millipore filter ขนาด 0.45 μm และนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชด้วยวิธี disc diffusion method และ agar dilution method ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ครั้งโดยในแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

6. การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

การทดสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Xoo ด้วยวิธี disc diffusion method โดยปิเปตสารสกัดทดสอบปริมาตร 10 μl ที่เตรียมในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 250, 500, 1,000 และ 2,000 μg/ml ด้วยตัวทำละลาย DMSO ใส่ลงในดิสยาเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ Xoo โดยปรับให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland Standard No. 0.5 เกลี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PPA โดยใช้ sterile cotton swab จากนั้นวางดิสยาที่มีสารสกัดแต่ละความเข้มข้นลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PPA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดขนาดของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นในหน่วย ml เปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร PPA ในชุดควบคุมที่ชุบด้วย DMSO อย่างเดียวในจานเพาะเลี้ยงเชื้อเดียวกัน โดยชุดควบคุมจะไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้ ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ครั้งโดยในแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

การทดสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งราก่อโรคข้าวด้วย agar dilution method โดยปิเปตสารสกัดทดสอบปริมาตร 10 μl ที่เตรียมในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 100 และ 200 μg/ml ด้วยตัวทำละลาย DMSO ผสมลงในอาหาร PDA จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อราก่อโรคพืชที่เจริญบน PDA วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัด บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน ตรวจวัดการเจริญของเชื้อราเปรียบเทียบกับเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ชุดควบคุมที่เติม DMSO อย่างเดียว ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ครั้งโดยในแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

7. การเตรียมหัวเชื้อผงของแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์

นำแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่ผ่านการยืนยันศักยภาพและจีนัสของเชื้อเรียบร้อยแล้วมาเตรียมเป็นหัวเชื้อผง องค์ประกอบของส่วนผสมที่ใช้เตรียมได้แก่ talcum, calcium carbonate, CMC และน้ำสกัดมันฝรั่ง ในอัตราส่วน 60:30:8:2

(Pupakdeepan & Prathuangwong, 2010) โดยที่ส่วนผสมผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้ทุกครั้ง จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ให้มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^8 CFU/ml ตรวจสอบได้จากการนับจำนวนเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 เก็บเซลล์ผสมกับองค์ประกอบของสารข้างต้นในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปอบที่ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำมาบรรจุถุง 1 กรัม/ถุง ทำการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน โดยใช้เทคนิค dilution spread plate บนอาหารแข็ง ISP-2 ตรวจนับจำนวนเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน

เชื้อที่มีชีวิตรอดจะถูกทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างสารกระตุ้นการเจริญของพืช ได้แก่ ความสามารถในการผลิต IAA การผลิต siderophore และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยใช้วิธีการที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น นอกจากนี้ยังมีการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่มีชีวิตรอดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคข้าว โดยนำผงของแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 2 mg/ml จากนั้นหยดเซลล์แขวนลอยของแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ปริมาตร 0.1 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บริเวณที่เป็นหลุมซึ่งถูกเจาะโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุม ซึ่งแต่ละหลุมมีระยะห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3–5 วัน จากนั้นเจาะเส้นใยของเชื้อราก่อโรคพืชที่เจริญบน PDA วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อที่มีแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์เจริญแล้ว และบ่มจานเพาะเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน ตรวจวัดการเจริญของเชื้อราเปรียบเทียบกับเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ชุดควบคุมที่เติมตัวทำละลาย DMSO อย่างเดียว

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียโรคข้าว

แยกแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ได้ทั้งหมดจำนวน 120 สายพันธุ์จากตัวอย่างดินในแปลงนาและกองปุ๋ยหมักเพื่อนำมาศึกษาศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในข้าว ผลการทดสอบการยับยั้งทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรคข้าว พบว่ามีเชื้อจำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ SWU-TH2-2, SWU-TH3-2, SWU-TH4, SWU-TH11, SWU-TH14-2, SWU-TH19, SWU-TH39, SWU-APL1 และ SWU-APL3 ที่มีศักยภาพในการยับยั้งสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ และเมื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ด้วยลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าเป็นเชื้อในจีนัส *Streptomyces* ทั้ง 9 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ เหล่านี้ แสดงค่าการยับยั้ง (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง) แบคทีเรีย Xoo อยู่ในช่วง 4.5-15.5 มิลลิเมตร (mm) นอกจากนี้ยังแสดงการยับยั้งรา *P. oryzae* และ *Sclerotium* sp. โดยพบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 44.5-99.6% และ 20.2-97.1% ตามลำดับ นอกจาก *Strptomyces* แล้วยังพบแอคติโนมัยซีทชนิดหายากซึ่งจำแนกได้เป็นจีนัส *Micromonospora* sp. จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ SWU-TH40 และ SWU-TH44 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย Xoo ได้ดี โดยแสดงค่าการยับยั้งอยู่ระหว่าง 10.4-11.5 มิลลิเมตร แต่ยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* ได้เพียง 35-41% และ *Micromonospora* ทั้ง 2 สายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sclerotium* sp. เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคข้าวทั้งแบคทีเรียและรา แอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ SWU-TH39 จัดจำแนกเป็น *Streptomyces hygroscopicus* มีศักยภาพในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์กับจุลินทรีย์ก่อโรคข้าวได้ดีที่สุด ซึ่งแสดงค่าการยับยั้งทั้งแบคทีเรีย Xoo (15.5 มิลลิเมตร) และรา *P. oryzae* และ *Sclerotium* เท่ากับ 99.6% และ 97.1% ตามลำดับ จึงได้นำแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์นี้ (*S. hygroscopicus* SWU-TH39) มาศึกษาคุณลักษณะในด้านต่าง ๆ ดังแสดงผลในตารางที่ 2 *Streptomyces*

hygroscopicus SWU-TH39 มีรูปร่างเป็นเกลียว สปอร์มีผิวเรียบ มีการสร้างสารสีต่างๆ ของสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2, ISP-3, ISP-4 และ ISP-5 มีการใช้น้ำตาล glucose, arabinose, xylose, fructose และ mannitol เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีในการเจริญ อุณหภูมิที่เจริญได้ตั้งแต่ 30-45 องศาเซลเซียส และทนความเค็มของ NaCl ได้ถึง 6%(w/v) *S. hygroscopicus* SWU-TH139 สามารถสร้างเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลาย xylan, avicel, CMC, starch, chitin และ skim milk ได้ดีเมื่อเทียบกับเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์อื่นๆ ที่คัดแยกได้และยังผลิตสารที่ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ IAA และ siderophores ดังนั้นเชื้อสายพันธุ์ SWU-TH39 ที่มีคุณสมบัติเด่นทั้งในด้านในการยับยั้งจุลินทรีย์ การผลิตเอนไซม์ และการสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบของพืช จึงถูกคัดเลือกมาใช้เพื่อผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคข้าวในอาหารเหลวต่อไป

ตารางที่ 1 การศึกษาแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว

สายพันธุ์	การจำแนกด้วยยีน 16S rRNA	แหล่งดิน	การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว		
			Xoo (mm)*	*P. oryzae* (%)**	*Sclerotium* sp. (%)**
SWU-TH2-2	*S. phaeochromogenes*	นาข้าว	7.5 ± 0.3	64.2 ± 2.9	33.4 ± 3.5
SWU-TH3-2	*S. althioticus*	นาข้าว	9.3 ± 0.5	63.8 ± 2.4	20.2 ± 3.0
SWU-TH4	*S. hygroscopicus*	นาข้าว	12.5 ± 0.4	78.1 ± 3.1	73.6 ± 4.1
SWU-TH11	*S. gancidicus*	นาข้าว	9.1 ± 0.6	57.5 ± 2.5	30.3 ± 1.7
SWU-TH14-2	*S. levis*	นาข้าว	5.9 ± 0.3	60.1 ± 5.4	54.7 ± 3.3
SWU-TH19	*S. humidus*	นาข้าว	9.9 ± 0.7	44.5 ± 1.7	30.0 ± 1.7
SWU-TH39	*S. hygroscopicus*	นาข้าว	15.5 ± 0.6	99.6 ± 1.0	97.1 ± 2.5
SWU-TH40	*Micromonospora* sp.	นาข้าว	10.4 ± 0.3	40.5 ± 2.0	0.0 ± 0.0
SWU-TH44	*Micromonospora* sp.	นาข้าว	11.5 ± 1.2	34.5 ± 2.1	0.0 ± 0.0
SWU-APL1	*S. antibioticus*	ปุ๋ยหมัก	6.8 ± 0.5	63.7 ± 0.6	49.0 ± 3.6
SWU-APL3	*S. antibioticus*	ปุ๋ยหมัก	4.5 ± 0.5	59.5 ± 2.0	44.9± 2.1
Control (non-inoculated)			0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

หมายเหตุ

*ทดสอบความสามารถของแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Xoo สายพันธุ์ที่ก่อโรคข้าวได้รุนแรงบนอาหาร PPA โดยวิธี agar diffusion method ข้อมูลที่แสดงเป็นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของโซนยับยั้งจากการทดลอง 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

**ทดสอบความสามารถของแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคข้าวโดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2. การผลิตและการสกัดสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคข้าว

หลังจากนำ *S. hygroscopicus* SWU-TH39 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร modified-APM ที่เติม 2% (w/v) ถั่วเหลืองป่นเป็นแหล่งอาหาร และอาหาร modified-SGY ที่เติม 1% (w/v) แป้งข้าวโพด พบว่าหลังจากนำน้ำเลี้ยงเชื้อ modified-APM และ modified-SGY มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ *n*-butanol และ ethyl acetate พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลาย *n*-butanol ที่สกัดจากอาหาร APM สามารถยับยั้ง Xoo ได้ดีกว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีระหว่างความเข้มข้น 500- 2,000 µg/ml และความเข้มข้นสุดท้าย 2,000 µg/ml สามารถยับยั้ง Xoo ได้มากที่สุดดังแสดงในตารางที่ 3 และสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* และ *Sclerotium* sp. ไม่ให้เจริญได้ถึง 100 % ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของ *S. hygroscopicus* SWU-TH39

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Morphological characteristics		Carbon source utilization (1% w/v)*	
-Gram staining	Positive	-D-glucose	+++
-Sporophore morphology	Spirally	-L-arabinose	+++
-Spore surface	Smooth	-Sucrose	-
Color of aerial mycelium		-D-xylose	+++
-ISP2	White/Yellow	-Fructose	+++
-ISP3	Dark grey	-Maltose	+
-ISP4	Dark grey	-Mannitol	+++
-ISP5	Grey	-I-Inositol	++
Color of substrate mycelium		-Rhamnose	-
-ISP2	Yellow/brown	-Raffinose	++
-ISP3	Yellow/brown	Decomposition	Xylan, Avicel, CMC, Laminarin, Starch, Chitin, Skim milk
-ISP4	Yellow/brown		
-ISP5	Yellow/brown		
Growth conditions		Plant promoting factor	
- Temperature (^{o}C)	30-45	- IAA production	26.7 µg/ml
- pH	6.0-8.0	- Siderophores	+**
- NaCl (%,w/v)	0-6.0		

หมายเหตุ

*บันทึกการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง ISP-2 ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ เปรียบเทียบกับการเจริญบนน้ำตาลกลูโคส โดยมีระดับการเจริญดังนี้ (+++) เจริญดีที่สุด; (++) เจริญปานกลาง และ(+) เจริญน้อย และ (-) ไม่เจริญ

**(+) สามารถผลิต siderophores โดยพบการปรากฏของ yellow halo รอบโคโลนีเมื่อทดสอบโดยวิธี Chrome Azurol Sulfonate (CAS) assay

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Xoo* ด้วยสารสกัดจาก *S. hygroscopicus* SWU-TH39

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความเข้มข้นของสารสกัด (μg/ml)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อ *Xoo* (mm)*	
		n-Butanol	Ethyl acetate
Modified-APM	250	1.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
	500	4.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1
	1,000	12.1 ± 1.1	5.1 ± 0.2
	2,000	17.2 ± 0.7	10.1 ± 0.2
Modified-SGY	250	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	500	1.0 ± 0.2	0.0 ± 0.0
	1,000	5.1 ± 0.7	3.0 ± 0.2
	2,000	10.2 ± 0.5	8.1 ± 0.1
Control (DMSO)	-	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

หมายเหตุ

*ทดสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Xoo* ด้วยวิธี disc diffusion method

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. oryzae* และ *Sclerotium* sp. ด้วยสารสกัดจาก *S. hygroscopicus* SWU-TH39

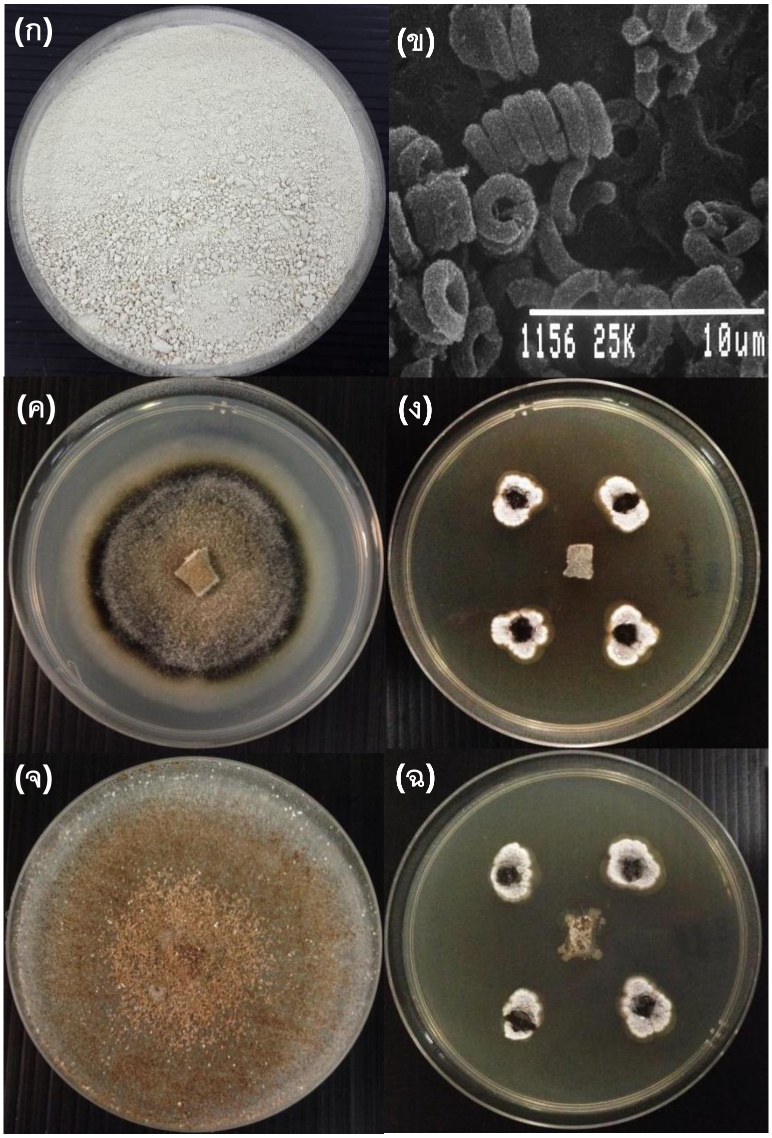
อาหารเลี้ยงเชื้อ	[สารสกัด] (μg/ml)	ขนาดรัศมี *P. oryzae* (mm)*		ขนาดรัศมี *Sclerotium* sp. (mm)*	
		n-Butanol	Ethyl acetate	*n*-Butanol	Ethyl acetate
Modified-APM	100	1.5 ± 0.07	1.0 ± 0.09	2.0 ± 0.09	2.5 ± 0.07
	200	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.06
Modified-SGY	100	2.0 ± 0.11	1.5 ± 0.07	2.5 ± 0.07	2.0 ± 0.06
	200	0.5 ± 0.06	0.5 ± 0.09	1.5 ± 0.07	1.9 ± 0.07
Control (DMSO)	-	3.5 ± 0.2		4.1 ± 0.1	

หมายเหตุ

*ทดสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งราก่อโรคข้าวด้วย agar dilution method โดยวัดรัศมีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA

3. การอยู่รอดและศักยภาพของหัวเชื้อผงแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์

เมื่อนำ *S. hygroscopicus* SWU-TH39 มาเตรียมเป็นผงเชื้อสูตรสำเร็จซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาว (ภาพที่ 2) จากนั้นนำผงเชื้อสูตรสำเร็จที่ได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Xoo และเส้นใยของเชื้อรา *P. oryzae* และ *Sclerotium* sp. พบว่าผงเชื้อสูตรสำเร็จสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้งสองชนิดได้ดีเมื่อแขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณเซลล์ 1.6×10^4 CFU/g โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 100 % การตรวจนับปริมาณเซลล์ในผงเชื้อพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 5×10^7 CFU/g และหลังจากเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน จำนวนเซลล์ยังคงมีชีวิตเหลือ 8×10^6 CFU/g โดยที่เซลล์ที่มีชีวิตยังคงแสดงสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โรคข้าวที่ใช้ในการทดสอบและการสร้างสารที่กระตุ้นการเจริญเติบโต



ภาพที่ 2 ผงเชื้อสำเร็จรูป และการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวด้วยผงเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* SWU-TH39 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน
(ก) ผงเชื้อสูตรสำเร็จรูปสายพันธุ์ SWU-TH39 ที่มีปริมาณเชื้อ 5×10^7 CFU/g
(ข) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
(ค และง) ผลการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* ที่ไม่เติม (ชุดควบคุม) และเติมผงเชื้อแขวนลอยในน้ำซึ่งมีปริมาณเชื้อ 1.6×10^4 CFU/ml และ
(จ และฉ) ผลการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium* sp. ที่ไม่เติม (ชุดควบคุม) และเติมผงเชื้อแขวนลอยในน้ำซึ่งมีปริมาณเชื้อ 1.6×10^4 CFU/ml

วิจารณ์ผล

Streptomyces ที่แยกได้จากการศึกษานี้จำนวน 9 สายพันธุ์สามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อรา *P. oryzae*, *Sclerotium* sp. และแบคทีเรีย Xoo ที่เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกจากต้นข้าวที่พบอาการของโรครุนแรง ทั้งนี้พบว่ามีเพียง 1 สายพันธุ์ที่จัดจำแนกเป็น *S. hygroscopicus* ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าวทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด ขณะที่เชื้อ *Micromonospora* sp. จำนวน 2 สายพันธุ์ยับยั้งได้ดีกับเชื้อแบคทีเรีย Xoo เท่านั้น ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า ในจีนัส *Streptomyces* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Xoo (Park *et al.*, 2011) และ *P. oryzae* (Choi *et al.*, 2009) จากการผลิตเอนไซม์ทั้งในกลุ่ม chitinase และ β-1,3-/exo-1,4-glucanase ร่วมกับการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ (secondary metabolites) ของ *Streptomyces* ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา และแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืชในระดับห้องปฏิบัติการและแปลงทดลอง (Souza *et al.*, 2008; Harikrishnan *et al.*, 2014) *S. hygroscopicus* SWU-TH39 ที่คัดเลือกได้จากการศึกษานี้ นอกจากจะสามารถผลิตเอนไซม์ทั้งกลุ่ม chitinase และ β-1,3-/exo-1,4-glucanase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรคพืช ยังมีคุณสมบัติในการผลิตสารที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ การผลิต IAA และการผลิตสาร siderophores ซึ่งได้มีรายงานการศึกษามาก่อนหน้านี้ในสายพันธุ์ของ *Streptomyces* ที่สามารถผลิตสารกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น phytohormone, antibiotics, siderophores, phosphate solubility และ systemic disease resistance (Loqman *et al.*, 2009) แอคติโนมัยซีทจึงมีความสัมพันธ์กับพืชในระบบนิเวศตามธรรมชาติ ในการศึกษานี้สามารถคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) และนำไปใช้ประโยชน์ทางเกษตรกรรมทั้งในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตและการควบคุมโรคในพืชได้ ในการศึกษานี้ได้รายงานคุณสมบัติที่ดีในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียสำหรับการควบคุมโรคข้าวร่วมกับการสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบของพืชโดยใช้ *S. hygroscopicus* SWU-TH39 ที่คัดแยกได้จากดินแปลงนาในจังหวัดนครนายกเพื่อนำมาใช้ในการผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวและเตรียมเป็นหัวเชื้อผงสำหรับประยุกต์ใช้ในแปลงเกษตรกรรม สารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ดีที่สุดคือ สารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร modified-APM และถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย *n*-butanol ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hoa และคณะ (Hoa *et al.*, 2012) ได้รายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ APM ที่มีองค์ประกอบของ soy bean meal และ tofu waste ช่วยเพิ่มการสร้างสารยับยั้งเชื้อ Xoo ในน้ำเลี้ยงเชื้อ และใช้ตัวทำละลาย *n*-butanol สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ดังกล่าวออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ APM ได้ดีที่สุดซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Veronica และคณะ (Veronica *et al.*, 2014) ได้รายงานว่าตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก *Streptomyces* sp. คือ 1-butanol โดยคุณสมบัติตัวทำละลายที่มีขั้วสูงจะสกัดสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี เมื่อนำเชื้อมาเตรียมเป็นหัวเชื้อผงสำเร็จรูปโดยใช้องค์ประกอบของส่วนผสม talcum, calcium carbonate, CMC และน้ำสกัดมันฝรั่ง ในอัตราส่วน 60:30:8:2 พบว่าเชื้อมีอัตราการอยู่รอดได้ดีหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน และยังคงคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าวที่ใช้ในการทดสอบได้ 100% ในระดับความเข้มข้นของผงเชื้อที่ใช้ 2 mg/ml จากการศึกษาก่อนหน้านี้องค์ประกอบส่วนผสมของสูตรผงสำเร็จนี้มีประสิทธิภาพดีในการนำมาใช้เพื่อเก็บรักษาเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 และควบคุมการก่อโรคของ Xoo ในแปลงทดลอง (Pupakdeepan & Prathuangwong, 2010) ดังนั้นสูตรผงเชื้อสำเร็จรูปที่นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาที่มีส่วนประกอบของ talcum และ CMC ที่เป็นสารเสริมประสิทธิภาพในการช่วยปกป้องและรักษาเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ให้มีทนทานต่อสภาพแวดล้อม ซึ่งเหมาะสมในการนำมาเก็บรักษาสายพันธุ์แอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ให้ยังคงมีจำนวนและคุณสมบัติที่ดีสำหรับนำไปใช้ในแปลงทดสอบ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการรายงานการคัดเลือกแอคติโนโตมัยซีทปฏิปักษ์จากดินในแปลงนาที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวทั้งในกลุ่มรา ได้แก่ *P. oryzae* และ *Sclerotium* sp. และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จากการศึกษาพบ *S. hygroscopicus* SWU-TH39 มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งหมดที่ทดสอบและเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชร่วมด้วย สารสกัดและหัวเชื้อผงที่ได้จาก *S. hygroscopicus* SWU-TH39 มีศักยภาพสูงในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว อย่างไรก็ตามยังต้องนำสารสกัดและหัวเชื้อผงไปทดสอบประสิทธิภาพในแปลงนาทดลองต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2558 ตลอดจนขอขอบคุณ คุณดวงกมล บุญช่วย นักวิชาการเกษตรชำนาญการ ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท จังหวัดชัยนาท ที่สนับสนุนสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวสำหรับใช้ทดสอบในผลงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

Bharucha, U., Patel, K. & Trivedi, U. B. (2013). Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural research, 2,* 215-221.

Bressan, W. (2003). Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. *BioControl, 48,* 233-240.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E.A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology, 71,* 4951-4959.

Dai, L.Y., Liu, X.L., Xiao, Y.H., & Wang, G.L. (2007). Recent advances in cloning and characterization of disease resistance genes in rice. *Journal of Integrative Plant Biology, 49,* 112-119.

Harikrishnan, H., Shanmugaiah, V., Balasubramanian, N., Sharma, M. P., & Kotchoni, S.O. (2014). Antagonistic potential of native strain *Streptomyces aurantiogriseus* VSMGT1014 against sheath blight of rice disease. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30,* 3149–3161.

Hastuti, R.D., Lestari, Y., Saraswati, R., Suwanto, A., & Chaerani (2012). Capability of Streptomyces spp. in controlling bacterial leaf blight diseases in rice plants. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 7,* 217-223.

Hoa, P. T. P., Quang, N. D., Sakiyama, Y., Hop, D.V., Hang, D. T., Ha, T. H., Van, N. T., Quy, N. T. K., & Dao, N. T. A. (2012). Screening for Actinomyces isolated from soil with the ability to inhibit *Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae* causing rice bacterial blight disease in Vietnam. *African Journal of Biotechnology, 11,* 14586–14594.

Ismet, A., Vikineswary, S., Paramaswari, S., Wong, W.H., Ward, A., Seki, T., Fiedler, H. P., & Goodfellow, M. (2004). Production and chemical characterization of antifungal metabolites from *Micromonospora* sp. M39 isolated from mangrove rhizosphere soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20,* 523-528.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., & Hopwood, D.A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: The John Innes Foundation.

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt, & M. Goodfellow. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. (pp. 115-175). New York: John Wiley & Sons.

Loqman, S., Barka, E. A., Clement, C., & Ouhdouch, Y. (2009). Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25,* 81-91.

Park, S.B., Lee, I.A., Joo, W.S., Jeong, G.K., & Lee, H.W. (2011). Screening and identification of antimicrobial compounds from *Streptomyces bottropensis* suppressing rice bacterial blight. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 21,* 1236-1242.

Pupakdeepan, W., & Prathuangwong, S. (2010). Formulation development of new bacterial antagonist and control efficacy against bacterial leaf blight of rice. In *Proceedings of 48th Kasetsart University Annual Conference*: *Plants*. (pp. 207-214). Bangkok: Kasetsart University.

Schwyn, B., & Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry, 160,* 47-56.

Souza, R.F., Coelho, R.R.R., Macrae, A., Soares, R.M.A., Nery, D.C.M., Semêdo, L.T.A.S., Alviano, C.S. & Gomes, R.C. (2008). *Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58*, 2774-2778.

Techapun, C., Sinsuwongwat, S., Poosaran, N., Watanabe, M., & Sasaki, K. (2001). Production of a cellulase-free xylanase from agricultural waste materials by a thermotolerant *Streptomyces* sp. *Biotechnology Letter, 23,* 1685-1689.

Veronica, Lay, B.W., & Magdalena, S. (2014). Isolation and characterization of new antibiotics from Indonesian coastal marine bacteria. *Microbiology Indonesia, 8*, 87-93.

Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A. & Sackin, M.J. (1983). Numerical classification of Streptomyces and related genera. *Journal of general microbiology, 129,* 1743-1813.

Yu, J., Liu, Q., Liu, Q., Liu, X., Sun, Q., Yan, J., Qi, X., & Fan, S. (2008). Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresource Technology, 99,* 2087-2091.

Zaitlin, B., Turkington, K., Parkinson, D., & Clayton, G. (2004). Effects of tillage and inorganic fertilizers on culturable soil actinomycete communities and inhibition of fungi by specific actinomycetes. *Applied Soil Ecology, 26,* 53-62.