

# การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทปฏิบัติการเพื่อใช้ในการเตรียมสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพและพัฒนาสูตรหัวเชื้อผงสำหรับควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคข้าว

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

ทนายาท ศรียามัย<sup>1</sup> กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์<sup>1</sup> อรินทม์ งามนิยม<sup>1</sup> และ พิชapak ศรียามัย<sup>2\*</sup>

Thayat Sriyapai<sup>1</sup>, Kun Silprasita<sup>1</sup>, Arin Ngamniyoma<sup>1</sup> and Pichapak Sriyapai<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

<sup>2</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

<sup>1</sup>Faculty of Environmental Culture and Ecotourism, Srinakharinwirot University

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Srinakharinwirot University

Received : 28 April 2017

Accepted : 16 October 2017

Published online : 20 October 2017

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิบัติการจากดินแปลงเกษตรในจังหวัดปทุมธานี และนครนายกเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) *Pyricularia oryzae* และ *Sclerotium* sp. ที่เป็นสาเหตุการก่อโรคขอบใบแห้ง โรคใบไหม้ และโรคกล้าต้นเน่าในข้าว ตามลำดับ เชื้อที่คัดแยกได้ถูกจัดจำแนกอยู่ในจีนัส *Streptomyces* และ *Micromonospora* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA *Streptomyces* จำนวน 9 สายพันธุ์มีศักยภาพสูงในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราเมื่อศึกษาบนอาหารแข็ง โดยพบว่า *Streptomyces hygrosopicus* 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  $8 \times 10^8$  CFU/g หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน เซลล์ที่อยู่รอดในหัวเชื้อผงยังคงให้ศักยภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าวและการผลิตสารสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืช

คำสำคัญ : แอคติโนมัยซีทปฏิบัติการ 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  $8 \times 10^8$  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. ก่อโรคเมล็ดดำ, *Sclerotium* sp. ก่อโรคลำต้นเน่า และแบคทีเรีย เช่น *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) ก่อโรคขอบใบแห้ง (Dai *et al.*, 2007) ปัจจุบันการควบคุมโรคพืชด้วยสารเคมีพบว่ายังไม่ให้ผลดีเท่าที่ควรและยังก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมที่ขาดการแก้ไขอย่างต่อเนื่องมาเป็นระยะเวลาหลายสิบปี ทั้งปัญหาการสะสมสารพิษในสิ่งแวดล้อมและความเสื่อมโทรมของดินอันเนื่องมาจากขาดการบำรุงดินอย่างถูกวิธี (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) อย่างไรก็ตามยังมีรายงานการวิจัยน้อยมากที่ทำการศึกษาคูแอกติโนมัยซีทที่ปฏิบัติที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชและยังมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ตลอดจนเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดินจากผลของฮอร์โมนหรือเอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้น ดังนั้นในการวิจัยนี้ได้คัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแอกติโนมัยซีทปฏิบัติที่มีคุณสมบัติที่ต้องการดังกล่าวจนสามารถจะนำมาพัฒนาเป็นสารสกัดและผลิตภัณฑ์หัวเชื้อผงเพื่อทดสอบผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคข้าวในห้องปฏิบัติการ

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การแยกเชื้อและศึกษาลักษณะแอกติโนมัยซีทปฏิบัติ

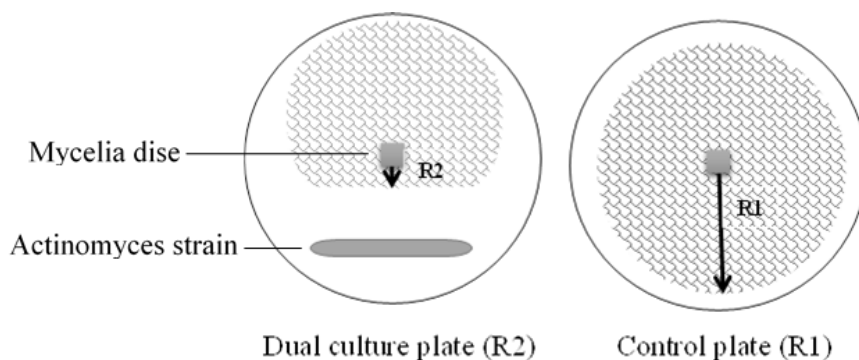
ทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทปฏิบัติจากตัวอย่างดินในบริเวณพื้นที่การเกษตร เช่น ดินในแปลงนาข้าวและดินกองปุ๋ยหมักในจังหวัดปทุมธานี และจังหวัดนครนายกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ Nutrient agar (NA), Trypticase soy agar (TSA) และ Starch-Casein agar (SCA) ประกอบด้วย soluble starch 10 g/L,  $\text{KNO}_3$  2 g/L, NaCl 2 g/L, casein 0.3 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g/L,  $\text{CaCO}_3$  0.02 g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  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 เชื้อแบคทีเรียไฮโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจะถูกนำมาทดสอบการยับยั้งแบบแอมโมเนียม สรจสอบรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 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,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g/L, NaCl 1 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L,  $\text{CaCO}_3$  2 g/L, trace salts solution 1 ml และ agar 20 g/L การเตรียม trace salts solution 100 ml ประกอบด้วย  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.1 g และ  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g และ glycerol asparagine agar (ISP-5) ประกอบด้วย L-asparagine 1 g/L, glycerol 10 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  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) โดยเลี้ยงแอกติโนมัยซีทปฏิบัติบนอาหาร ISP-2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์เพื่อให้เชื้อเจริญเต็มที่และสร้างสปอร์ที่สมบูรณ์

### 2. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียโรคพืชด้วยแอกติโนมัยซีทปฏิบัติ

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

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

$$\% \text{ การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยแอคติโนมัยซีทปฏิบัติ} = (R1-R2)/R1 \times 100$$



ภาพที่ 1 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยแอคติโนมัยซีทปฏิบัติ

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Xoo สายพันธุ์ที่ก่อโรคได้รุนแรงด้วยแอคติโนมัยซีทปฏิบัติ โดยวิธี agar diffusion method เริ่มจากเชื้อโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ Xoo บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร potato peptone agar (PPA) ประกอบด้วย potato 300 g/L,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.33 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  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 เจาะเส้นใยสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิบัติที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง antibiotic producing medium (APM) ประกอบด้วย soluble starch 10 g/L, glucose 10 g/L, soybean 10 g/L,  $\text{CaCO}_3$  3 g/L, peptone 10 g/L, tween 80 100  $\mu\text{L}$  และ agar 20 g/L วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดความกว้างของ inhibition zone ของแอคติโนมัยซีทปฏิบัติที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย Xoo คัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งทั้งเชื้อราและแบคทีเรียเพื่อจำแนกชนิดและทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารสกัดในอาหารเหลวเพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคข้าวต่อไป

### 3. การจำแนกชนิดแอคติโนมัยซีทปฏิบัติโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 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 ซึ่งอยู่บนเว็บไซต์ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Blastn

#### 4. การศึกษาศักยภาพในการผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

วิเคราะห์ความสามารถในการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) ตามวิธีของ Bharucha และคณะ (Bharucha *et al.*, 2013) เลี้ยงแอคติโนมัยซีทที่ปฏิบัติในอาหาร ISP-3 ปริมาตร 100 ml ในพลาสติกขนาด 250 ml เป็นเวลา 7 วัน ทำการเจาะเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ปฏิบัติที่ต้องการ (โดยเลือกบริเวณที่มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน) ลงในอาหาร ISP-3 ที่เติม tryptophan 1 g/L นำเชื้อที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาแยกส่วนสารละลายโดยการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนสารละลายไปวิเคราะห์หา IAA โดยปิเปตน้ำเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 ml เติม Ortho-phosphoric acid ปริมาตร 20  $\mu$ l และ Salkowski's reagent (เตรียมสาร 50 ml ประกอบด้วย 35% (w/v)  $\text{HClO}_4$  และ  $\text{FeCl}_3$  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  $\mu$ mol

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

ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส โดยเลี้ยงแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ในอาหารแข็ง actinomycetes medium (Techapun *et al.*, 2001) ประกอบด้วย yeast extract 2 g/L, peptone 1 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.4 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/L, tween 80 2 ml, trace element solution 1 ml (เตรียมปริมาตร 100 ml ประกอบด้วย  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.14 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.15 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g และ  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.2 g) และ agar 20 g/L เติมสับสเตรทสำหรับตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ 1%(w/v) carboxymethyl cellulose (CMC) หรือ 1%(w/v) avicel หรือ 1%(w/v) laminarin และ สำหรับตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนส คือ 1%(w/v) oat speltis xylan บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นย่อยด้วยการละลาย Congo red 0.1 % (w/v) ให้ท่วมอาหารแข็งทิ้งไว้ 3 นาที และล้างด้วยสารละลาย NaCl 1 โมลาร์ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสรอบโคโลนี (clear zone)

ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไคติน โดยนำแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหาร 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 บนที่กษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและบริเวณใส

### 5. การผลิตและการสกัดสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

ศึกษาศักยภาพในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืชในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยนำแอสคิโนมายซีที่ปฏิบัตินำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 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  $\text{CaCO}_3$  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 ลงในกรวยแยกและเขย่าให้ตัวทำละลายผสมกับตัวอย่างอย่างทั่วถึงและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนของตัวทำละลายเพื่อสกัดซ้ำจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำส่วนของตัวทำละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดัน (vacuum rotary evaporator) ละลายสารสกัดที่ได้ด้วย 100% (w/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นกรองด้วย millipore filter ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  และนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชด้วยวิธี disc diffusion method และ agar dilution method ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ครั้งโดยในแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

### 6. การทดสอบความสามารถของสารสกัดยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

การทดสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Xoo ด้วยวิธี disc diffusion method โดยปิเปตสารสกัดทดสอบปริมาตร 10  $\mu\text{l}$  ที่เตรียมในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 250, 500, 1,000 และ 2,000  $\mu\text{g/ml}$  ด้วยตัวทำละลาย DMSO ใส่ลงในดิสก้าเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ Xoo โดยปรับให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland Standard No. 0.5 เกลี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PPA โดยใช้ sterile cotton swab จากนั้นวางดิสก้าที่มีสารสกัดแต่ละความเข้มข้นลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 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  $\mu\text{l}$  ที่เตรียมในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 100 และ 200  $\mu\text{g/ml}$  ด้วยตัวทำละลาย DMSO ผสมลงในอาหาร PDA จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อราก่อโรคพืชที่เจริญบน PDA วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัด บ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน ตรวจวัดการเจริญของเชื้อราเปรียบเทียบกับเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ชุดควบคุมที่เติม DMSO อย่างเดียว ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ครั้งโดยในแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

### 7. การเตรียมหัวเชื้อผงของแอสคิโนมายซีปฏิบัตินำ

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

(Pupakdepan & Prathuangwong, 2010) โดยที่ส่วนผสมผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้ทุกครั้ง จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิตินิมัยที่ทาบปฏิบัติให้มีปริมาณเซลล์ประมาณ  $10^8$  CFU/ml ตรวจจอบได้จาก การนับจำนวนเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 เก็บเซลล์ผสมกับองค์ประกอบของสารข้างต้นในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 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 โดยนำผงของแอสคิตินิมัยที่ทาบปฏิบัติในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 2 mg/ml จากนั้นหยดเซลล์แขวนลอยของแอสคิตินิมัยที่ทาบปฏิบัติปริมาตร 0.1 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บริเวณที่เป็นหลุมซึ่งถูกเจาะโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุม ซึ่งแต่ละหลุมมีระยะห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงแอสคิตินิมัยที่ทาบปฏิบัติที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นเจาะเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบน PDA วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อที่มีแอสคิตินิมัยที่ทาบปฏิบัติเจริญแล้ว และปมจานเพาะเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน ตรวจวัดการเจริญของเชื้อราเปรียบเทียบกับเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ชุดควบคุมที่เติมตัวทำละลาย DMSO อย่างเดียว

## ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

### 1. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียโรคข้าว

แยกแอสคิตินิมัยที่ทาบปฏิบัติได้ทั้งหมดจำนวน 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 และเมื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอสคิตินิมัยที่ทาบปฏิบัติด้วยลำดับเบสของยีน 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 นอกจากนี้ *Streptomyces* แล้วยังพบแอสคิตินิมัยชนิดหายากซึ่งจำแนกได้เป็นจีนัส *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 แอสคิตินิมัยที่ทาบปฏิบัติสายพันธุ์ SWU-TH39 จัดจำแนกเป็น *Streptomyces hygrosopicus* มีศักยภาพในการเป็นแบคทีเรียที่ทาบปฏิบัติกับจุลินทรีย์ก่อโรคข้าวได้ดีที่สุด ซึ่งแสดงค่าการยับยั้งทั้งแบคทีเรีย *Xoo* (15.5 มิลลิเมตร) และรา *P. oryzae* และ *Sclerotium* เท่ากับ 99.6% และ 97.1% ตามลำดับ จึงได้นำแอสคิตินิมัยที่ทาบปฏิบัติสายพันธุ์นี้ (*S. hygrosopicus* 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 และการสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช จึงถูกคัดเลือกมาใช้เพื่อผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคข้าวในอาหารเหลวต่อไป

**ตารางที่ 1** การศึกษาแอกติโนมัยซีทที่ปฏิบัติที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว

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

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

\*\*ทดสอบความสามารถของแอกติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคข้าวโดยวิธี 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) ถั่วเหลืองป่น เป็นแหล่งอาหาร 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 ได้ดีกว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อได้ระหว่างความเข้มข้น 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
<b>Morphological characteristics</b>		<b>Carbon source utilization (1% w/v)*</b>	
-Gram staining	Positive	-D-glucose	+++
-Sporophore morphology	Spirally	-L-arabinose	+++
-Spore surface	Smooth	-Sucrose	-
<b>Color of aerial mycelium</b>		-D-xylose	+++
-ISP2	White/Yellow	-Fructose	+++
-ISP3	Dark grey	-Maltose	+
-ISP4	Dark grey	-Mannitol	+++
-ISP5	Grey	-l-Inositol	++
<b>Color of substrate mycelium</b>		-Rhamnose	-
-ISP2	Yellow/brown	-Raffinose	++
-ISP3	Yellow/brown	<b>Decomposition</b>	Xylan, Avicel,
-ISP4	Yellow/brown		CMC, Laminarin,
-ISP5	Yellow/brown		Starch, Chitin,
			Skim milk
<b>Growth conditions</b>		<b>Plant promoting factor</b>	
- Temperature (°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	ความเข้มข้นของ สารสกัด ( $\mu\text{g/ml}$ )	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อ <i>Xoo</i> (mm)*	
		<i>n</i> -Butanol	Ethyl acetate
Modified-APM	250	$1.1 \pm 0.1$	$0.0 \pm 0.0$
	500	$4.0 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.1$
	1,000	$12.1 \pm 1.1$	$5.1 \pm 0.2$
	2,000	$17.2 \pm 0.7$	$10.1 \pm 0.2$
Modified-SGY	250	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$
	500	$1.0 \pm 0.2$	$0.0 \pm 0.0$
	1,000	$5.1 \pm 0.7$	$3.0 \pm 0.2$
	2,000	$10.2 \pm 0.5$	$8.1 \pm 0.1$
Control (DMSO)	-	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$

หมายเหตุ

\*ทดสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Xoo* ด้วยวิธี disc diffusion method

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

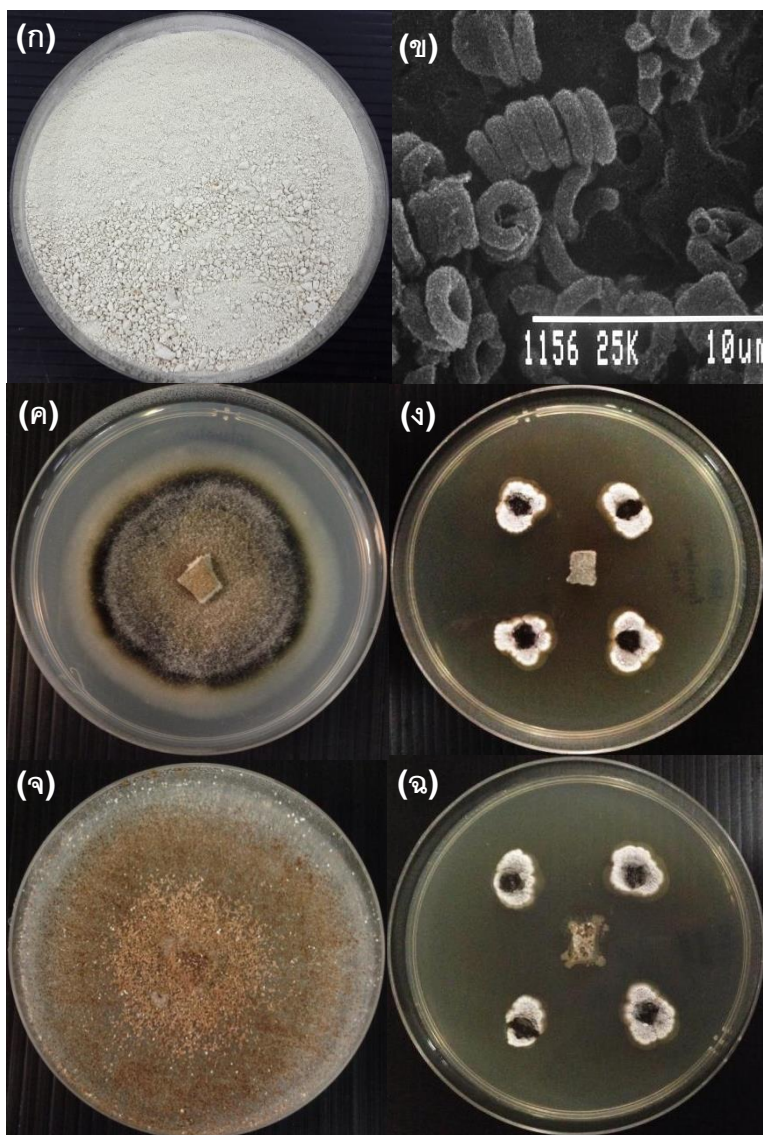
อาหารเลี้ยงเชื้อ	[สารสกัด] ( $\mu\text{g/ml}$ )	ขนาดรัศมี <i>P. oryzae</i> (mm)*		ขนาดรัศมี <i>Sclerotium</i> sp. (mm)*	
		<i>n</i> -Butanol	Ethyl acetate	<i>n</i> -Butanol	Ethyl acetate
Modified-APM	100	$1.5 \pm 0.07$	$1.0 \pm 0.09$	$2.0 \pm 0.09$	$2.5 \pm 0.07$
	200	$0.0 \pm 0.00$	$0.0 \pm 0.00$	$0.0 \pm 0.0$	$0.5 \pm 0.06$
Modified-SGY	100	$2.0 \pm 0.11$	$1.5 \pm 0.07$	$2.5 \pm 0.07$	$2.0 \pm 0.06$
	200	$0.5 \pm 0.06$	$0.5 \pm 0.09$	$1.5 \pm 0.07$	$1.9 \pm 0.07$
Control (DMSO)	-	$3.5 \pm 0.2$		$4.1 \pm 0.1$	

หมายเหตุ

\*ทดสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งราก่อโรคข้าวด้วย agar dilution method โดยวัดรัศมีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA

### 3. การอยู่รอดและศักยภาพของหัวเชื้อผงแอสคิตโนมายซีทปฏิบัติ

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



ภาพที่ 2 ผงเชื้อสำเร็จรูป และการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวด้วยผงเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* SWU-TH39 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน

(ก) ผงเชื้อสูตรสำเร็จรูปสายพันธุ์ SWU-TH39 ที่มีปริมาณเชื้อ  $5 \times 10^7$  CFU/g

(ข) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

(ค และง) ผลการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* ที่ไม่เต็ม (ชุดควบคุม) และเต็มผงเชื้อแขวนลอยในน้ำซึ่งมีปริมาณเชื้อ  $1.6 \times 10^4$  CFU/ml และ (จ และฉ) ผลการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium* sp. ที่ไม่เต็ม (ชุดควบคุม) และเต็มผงเชื้อแขวนลอยในน้ำซึ่งมีปริมาณเชื้อ  $1.6 \times 10^4$  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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 ในการศึกษานี้ได้รายงานคุณสมบัติที่ดีในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียสำหรับการควบคุมโรคข้าวร่วมกับการสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยใช้ *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 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ขององค์ประกอบส่วนผสมของสูตรผงสำเร็จรูปมีประสิทธิภาพดีในการนำมาใช้เพื่อเก็บรักษาเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 และควบคุมการก่อโรคของ Xoo ในแปลงทดลอง (Pupakdeepan & Prathuangwong, 2010) ดังนั้นสูตรผงเชื้อสำเร็จรูปที่นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาที่มีส่วนผสมของ talcum และ CMC ที่เป็นสารเสริมประสิทธิภาพในการช่วยปกป้องและรักษาเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิบัติให้มีมีหนาทันต่อสภาพแวดล้อม ซึ่งเหมาะสมในการนำมาเก็บรักษาสายพันธุ์แอคติโนมัยซีทปฏิบัติให้ยังคงมีจำนวนและคุณสมบัติที่ดีสำหรับนำไปใช้ในแปลงทดลอง

## สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการรายงานการคัดเลือกแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์จากดินในแปลงนาที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวทั้งในกลุ่มราก ได้แก่ *P. oryzae* และ *Sclerotium* sp. และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* จากการศึกษาค้นพบ *S. hygroscopicus* SWU-TH39 มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งหมดที่ทดสอบและเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชร่วมด้วย 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 48<sup>th</sup> 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.