บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

ปทุมมา

ปทุมมาจัดเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับขิงและข่า ซึ่งอยู่ในสกุล *Curcuma* และมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Curcuma alismatifolia* Gagnep. มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบประเทศอินโดจีน พม่า และไทย สำหรับในประเทศไทยจะพบเห็นปทุมมาได้แทบทุกภาคของประเทศ ลักษณะทั่วไปเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งประกอบด้วยลำต้นเทียม (pseudostem) ที่เกิดจากกาบใบ (leaf) ห่อรวมตัวกันแน่น มีดอกจริง (flower) ขนาดเล็กแซมอยู่บนใบประดับ (bract) ที่มีสีสันสวยงาม และมีหัวพันธุ์หรือเหง้าใต้ดิน (rhizome) ทำหน้าที่สะสมอาหารและขยายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตทางลำต้น และให้ดอกในช่วงฤดูฝนราวเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน จากนั้นจะทิ้งใบจนหมด แล้วพักตัวอยู่ในดินตลอดช่วงฤดูหนาวราวเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ เมื่อถึงฤดูฝนก็จะเจริญเติบโต ออกดอกอีกครั้ง ไม้สกุลนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (อรวรรณ, 2548) คือ

1. กลุ่มปทุมมา หรือสกุลย่อย Paracurcuma ลักษณะเด่นสังเกตที่ดอกจริง ปากกลีบดอกจะมีสีขาวหรือสีม่วง และการออกดอก ช่อดอกที่เกิดจะเกิดจากตายอดของลำต้นเทียม เช่น ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่สีชมพู (ภาพที่ 1A) พลอยมยุรา แวววุบล ทับทิมสยาม และปทุมรัตน์ เป็นต้น

2. กลุ่มกระเจียว หรือสกุลย่อย Eucurcuma ลักษณะเด่นสังเกตที่ดอกจริง ปากกลีบดอกจะมีสีขาวหรือสีเหลือง และการออกดอก ช่อดอกที่เกิดจะเกิดจากเหง้าโดยตรง หรือช่อดอกเกิดจากตายอดของลำต้นเทียม เช่น กระเจียวส้ม (ภาพที่ 1B) พลอยทักษิณ (ภาพที่ 1C) และพลอยชมพู เป็นต้น

ภาพที่ 1 ลักษณะของปทุมมาสายพันธุ์ต่างๆ

A : ชียงใหม่สีชมพู ; B : กระเจียวส้ม ; C : พลอยทักษิณ

(ที่มา **:** http://www.arboretum.sfasu.edu, http://www.toptropicals.com/html, http://www.botanicalgrowers.net/ images/Ginger)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์ปทุมมาที่นิยมปลูกเป็นไม้ตัดดอกในปัจจุบัน ได้แก่ ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่สีชมพู (อรวรรณ, 2548) เชียงใหม่สีชมพูอ่อน เชียงใหม่สีชมพูเข้ม สโนว์ไวท์ ทรอปิคอลสโนว์ ส่วนพันธุ์ที่นิยมเป็นไม้กระถาง ได้แก่ พันธุ์ไข่มุกสยาม บัวสวรรค์ขาวเตี้ย บัวสวรรค์ชมพูเตี้ย ซึ่งพันธุ์ที่ได้นำมาศึกษาในครั้งนี้คือ ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่สีชมพูหรือพันธุ์เชียงใหม่พิงค์ เนื่องจากเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ปลูกเป็นจำนวนมาก

สำหรับปทุมมาในประเทศไทยนั้นพบว่า เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง สามารถส่งออกทำรายได้เข้าสู่ประเทศไทยถึง 15-30 ล้านบาทต่อปี ซึ่งส่วนมากจะทำการปลูกปทุมมาเพื่อการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ ในรูปของหัวพันธุ์ โดยผลิตหัวพันธุ์เพื่อการจำหน่ายปีละไม่ต่ำกว่า 2 ล้านหัวต่อปี แหล่งผลิตหัวพันธุ์ที่สำคัญอยู่ในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และพะเยา (อรวรรณ, 2548)

โรคที่สามารถพบในปทุมมา ได้แก่ โรคเหี่ยวหรือโรคหัวเน่าที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*, โรคจุด (Acremonium or Brown Spot) ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Acremonium* sp., โรคจุดหรือไหม้ (Phoma Spot or Blight) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Phoma betae*, โรครากเน่าและต้นเหี่ยว (Pythium Root Rot and Wilt) ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Pythium graminicola*, โรคใบจุด (Cercospora Leaf Spot) เกิดจากเชื้อรา *Cercospora curcumina* และโรคลำต้นเน่า (Stem Rot) ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ซึ่งโรคที่สำคัญและมีผลกระทบต่อการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมา คือ โรคเหี่ยวหรือโรคหัวเน่าที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* นอกจากมีผลกระทบต่อการส่งออกหัวพันธุ์แล้ว ยังเป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญในการป้องกันกำจัด เพราะเชื้อนี้สามารถพัฒนาพันธุ์ให้ต้านทานสารเคมีได้เร็ว มีพืชอาศัยหลายชนิดและยังสามารถพักตัวในดินได้นานนับปี (อรวรรณ, 2548)

โรคเหี่ยวหรือโรคหัวเน่า (Bacterial Wilt)

โรคเหี่ยวหรือโรคหัวเน่า มีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* โดยลักษณะอาการปทุมมาที่เป็นโรคจะแสดงอาการหลังจากที่ได้รับเชื้อแล้วไม่นาน ในระยะต้นกล้าอาการมักรุนแรงมากจนกระทั่งต้นกล้าตาย แต่ในระยะที่พืชโตเต็มที่แล้วอาการจะเริ่มจากใบเหี่ยวห้อยตกลง ต่อมาจะม้วนเป็นหลอดและมีสีเหลือง อาการจะค่อยๆ ลุกลามจากส่วนล่างขึ้นไปยังส่วนปลายยอด ในที่สุดใบจะม้วนเหลืองและแห้งตายทั้งต้น บริเวณโคนต้นและหน่อที่แตกออกมาใหม่มีลักษณะช้ำน้ำ หรืออาการเนื้อแก้ว ต่อมาจะเน่าเปื่อยหักหลุดออกจากหัวพันธุ์โดยง่าย บริเวณลำต้นมีสีคล้ำหรือสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวปทุมมาที่เป็นโรคในระยะแรกมีลักษณะช้ำฉ่ำน้ำ โดยเฉพาะหัวอ่อน ต่อมาเนื้อหัวจะมีสีคล้ำขึ้นและเปื่อยยุ่ย อาการเหล่านี้จะเป็นไปอย่างรวดเร็วในสภาพอากาศที่ร้อนชื้น เมื่อผ่าหัวที่เป็นโรคระยะแรกพบส่วนของท่อน้ำท่ออาหารมีสีคล้ำ และมีเมือกสีขาวข้นซึมออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มาตามรอยแผล สำหรับสาเหตุที่พืชแสดงอาการเหี่ยวหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียนั้น พบว่านอกจากจะเกิดจากการอุดตันของท่อน้ำเนื่องจากแบคทีเรียไปเพิ่มจำนวนจนเต็มท่อน้ำ ยังพบว่ามีสารประกอบจำพวก polysaccharides ที่มีส่วนในการอุดตันของท่อน้ำด้วยเช่นกัน เมื่อผ่าลำต้นดูจะพบของเหลวสีขาว ขุ่นไหลออกมาจากส่วนที่เป็นโรค ลักษณะนี้จะพบเฉพาะสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียเท่านั้น (ประเทือง, 2538) นอกจากนี้แบคทีเรียยังสร้างเอนไซม์ cellulase และ polygalacturonases มา ย่อยสลายองค์ประกอบของเซลล์ทำให้เซลล์อ่อนตัวและสลายตัวในที่สุด (Huang and Allen, 2000) สารที่ได้จากการสลายตัวของเซลล์นี้จะถูกส่งไปยังส่วนยอด โดยอาศัยแรงดึงจากการคายน้ำ เมื่อถึงส่วนปลายของท่อน้ำโดยเฉพาะพวก vessel จะเกิดการเกาะตัวกันจนมีลักษณะคล้ายวุ้น ทำให้เกิดการอุดตันของเซลล์ เมื่อผ่าตัดลำต้นหรือส่วนของพืชที่เป็นโรคมักพบสีน้ำตาลดำ เนื่องจากเกิด oxidation ของสารประกอบพวก phenol โดยเอนไซม์ phenoloxidase ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นจากกระบวนการนี้จะได้สารประกอบ quinones ซึ่งเกิดการจับตัวกันเป็นสารจำพวก melanin ในภายหลังสารนี้จะแพร่ไปตามเซลล์และเกาะติดกับเซลล์ต่างๆ ได้ ง่ายทำให้เซลล์กลายเป็นสีน้ำตาล (ประสาทพร, 2527)

การแพร่กระจายของโรคเกิดจากหัวพันธุ์ที่ติดเชื้อ เศษซากพืชที่เป็นโรค ดินและน้ำที่มีเชื้อ โดยเชื้อโรคจะเข้าทำลายพืชทางบาดแผล หรือช่องเปิดธรรมชาติ เชื้อแบคทีเรียจะทำความเสียหายเมื่อดินมีสภาพเป็นกรด pH 6.8 และจะลดความเสียหายเมื่อดินมี pH 4.3 โรคนี้จะระบาดในช่วงฤดูฝน อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ซึ่งดินมีความชื้นสูง

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum หรือชื่อเดิมคือ *Pseudomonas solanacearum* เชื้อนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีขนาดประมาณ 0.5 x 1.5 ไมโครเมตร รูปร่างเป็นแบบแท่ง มีแฟลกเจลลา (flagella) ได้ตั้งแต่ 1 ถึงหลายเส้นที่ใช้ในการเคลื่อนไหว ภายในเซลล์จะมีสาร poly-β-hydroxybutyrate ซึ่งจะติดสีน้ำเงินหรือดำ เมื่อนำมาย้อมด้วย Sudan Black B ต้องการออกซิเจนในการเจริญ อุณหภูมิที่เหมาะกับการเจริญอยู่ระหว่าง 30 – 37 องศาเซลเซียส ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีแคปซูล (ประสาทพร, 2527) สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase สามารถเปลี่ยนไนเตรท (NO_3-) เป็นไนไตรท์ (NO_2-) แต่ไม่สามารถย่อยแป้งได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสาร intracellular refractile sudanophilic ที่ประกอบด้วย polyhydroxybutyric acid และเชื้อนี้สามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ได้ เช่น glucose, sucrose, galactose, mannose และ ribose (Holt *et al*., 1994) ในสาย-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์ก่อโรคสามารถสร้างเอนไซม์ polygalacturonase ย่อยผนังเซลล์ของมันฝรั่ง ทำให้เข้าไปในเนื้อเยื่อ เพิ่มจำนวนและก่อโรคในพืชได้ (Huang and Allen, 2000) ลักษณะของแบคทีเรียชนิดนี้เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งโคโลนีมีขนาดค่อนข้างเล็ก กลม ผิวหน้าเรียบ เมื่ออายุน้อยมีสีขาวขุ่นและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่ออายุมากขึ้น เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร Tetrazolium Chloride Medium (TZC) จะสามารถระบุความรุนแรงได้ กล่าวคือสายพันธุ์ก่อโรคมีลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม ขอบของโคโลนีเป็นเมือกสีขาวขุ่น ตรงกลางมีสีแดงหรือชมพู ส่วนสายพันธุ์ที่สูญเสียความสามารถในการก่อโรค มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สร้างรงควัตถุสีแดงที่ไม่มีเมือกสีขาวล้อมรอบ (Olson, 2005)

การจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (กาญจนา, 2542)

R. solanacearum เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้เกิดความแตกต่างในทางคุณสมบัติหลายประการ เช่น พืชอาศัย (host range) ลักษณะทางสรีรวิทยา (physiology) ความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) และการแพร่กระจาย ดังนั้นจึงมีการจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียชนิดนี้ไว้หลายแบบด้วยกัน เช่น อาศัยความสามารถในการเข้าทำลายพืชที่แตกต่างกันเป็นตัวจัดจำแนกกลุ่ม โดยให้ชื่อว่า “ race ” ซึ่งสามารถจัดจำแนกออกเป็น 5 races ด้วยกัน ดังนี้

race 1 สามารถเข้าทำลายพืชตระกูล Solanaceae ซึ่งมีพืชอาศัยกว้าง การแพร่กระจายพบในเขตร้อนและเขตอบอุ่น

race 2 สามารถเข้าทำลายกล้วยและพืชในพืชสกุล *Heliconia* พบทางตอนเหนือของทวีปอเมริกาและในทวีปเอเชีย

race 3 สามารถเข้าทำลายมันฝรั่งและพืชอีกหลายชนิด พบในเขตร้อนและเขตอบอุ่น

race 4 สามารถเข้าทำลายขิง พบในทวีปเอเชีย

race 5 สามารถเข้าทำลายหม่อน พบในทวีปเอเชีย

นอกจากการจัดจำแนกแบคทีเรียออกเป็น race แล้วยังสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียชนิดนี้ออกเป็น biovars โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีคือ ความสามารถในการ oxidize hexose alcohol และ disaccharide หลายชนิด แบ่งออกเป็น 5 biovars ด้วยกัน คือ

biovar 1 ไม่สร้างกรดในน้ำตาล hexose alcohol (mannitol, sorbitol และ dulcitol) และในน้ำตาล disaccharide (maltose, lactose และ cellobiose) ซึ่งพบแบคทีเรียชนิดนี้ในทวีปอเมริกาแต่ไม่พบในทวีปเอเชีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

biovar 2 ไม่สร้างกรดในน้ำตาล hexose alcohol แต่สร้างกรดในน้ำตาล disaccharide พบในทวีปเอเชีย

biovar 3 สร้างกรดในน้ำตาล hexose alcohol และในน้ำตาล disaccharide พบในประเทศออสเตรเลีย อินโดนีเซีย ปาปัวนิวกีนี ศรีลังกา จีนและไทย

biovar 4 สร้างกรดในน้ำตาล hexose alcohol แต่ไม่สร้างกรดในน้ำตาล disaccharide พบในประเทศออสเตรเลียและทวีปเอเชีย

biovar 5 ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อย่างแน่นอน พบแพร่ระบาดในประเทศจีน

นอกจากนี้ยังสามารถแยก biovars ต่างๆ โดยการใช้ DNA probe หรือการใช้เทคนิคทาง RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) ซึ่งอาศัยคุณสมบัติของ protein membrane เป็นตัวจัดจำแนก สำหรับประเทศไทยแบคทีเรีย *R. solanacearum* เกือบทั้งหมด จัดอยู่ใน biovar 3 ยกเว้นแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวในขิง ที่จัดอยู่ใน biovar 4

กระบวนการเกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพืชจำพวกปทุมมา มันฝรั่ง มะเขือเทศ ยาสูบ พริก กล้วย และขิง เป็นต้น การเข้าทำลายของแบคทีเรียมักเข้าทางบาดแผล ไม่ว่าจะเป็นส่วนราก ลำต้น หรือก้านใบ หลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ต้นพืชแล้วจะเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นในท่อน้ำ (xylem) ระยะหนึ่ง แล้วจึงแพร่ไปยังส่วนต่าง ๆ โดยใช้เอนไซม์สลายโครงสร้างพืช เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เพิ่มจำนวนในท่อน้ำจึงทำให้เกิดการอุดตันของท่อน้ำอยู่เสมอ เป็นอุปสรรคต่อการลำเลียงน้ำ และแร่-ธาตุต่าง ๆ ของพืช ซึ่งส่งผลให้เกิดอาการเหี่ยว (ประเทือง, 2538) (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 ลักษณะอาการใบม้วนที่เกิดจากโรคเหี่ยวของปทุมมา

(ที่มา: http://www.giswebr12.ldd.go.th/lddweb/knowledge/agrilib/plant/lotus/image/wither1.jpg)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมา เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมีในการกำจัด แต่เนื่องจากเชื้อโรคนี้สามารถพัฒนาพันธุ์ให้ต้านทานสารเคมีได้เร็ว ทำให้วิธีการใช้สารเคมีมักไม่ได้ผล จึงมีการศึกษาการควบคุมโรคโดยชีววิธีเพื่อเป็นแนวทางในการลดใช้สารเคมีต่อไปในอนาคต

การควบคุมโรคโดยชีววิธี (เกษม, 2532)

หมายถึง การควบคุมโรคโดยเชื้อจุลินทรีย์ หรือสิ่งที่มีชีวิตชนิดอื่นช่วยลดจำนวนประชากรของเชื้อโรค ลดการเกิดโรค หรือความเสียหายของพืชที่เกิดจากเชื้อโรค ซึ่งอาจรวมถึงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ พันธุกรรม หรือผลผลิตจากพันธุกรรมด้วย ยกเว้นการกระทำโดยตรงของมนุษย์ต่อเชื้อโรคเท่านั้น การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีนี้เป็นวิธีค่อนข้างใหม่สำหรับประเทศไทย แต่ในปัจจุบันเกษตรกรจำนวนมากและนักวิชาการเกษตรสมัยใหม่เริ่มเห็นความสำคัญและนำมาควบคุมโรคแทนการใช้สารเคมีซึ่งมีผลต่อสภาพแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตมากขึ้น

กลไกในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อ (เกษม, 2532)

เชื้อปฏิปักษ์ไม่ว่าจะเกิดเองในธรรมชาติหรือที่นักวิชาการนำมาเลี้ยงและขยายให้ผลิตเป็นการค้าได้มีวิธีการทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายแบบ แต่ละรูปแบบก็มีผลแตกต่างกันออกไป ดังนี้

การเป็นปรสิต (parasite) โดยตรง หมายถึง การที่เชื้อปฏิปักษ์เข้าทำลายส่วนต่างๆ ภายในของเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยตรง

1. การเป็นตัวห้ำ (predator) เป็นวิธีการที่คล้ายกับการเป็นปรสิตแตกต่างกันที่วิธีการกินหรือการทำลาย กล่าวคือตัวห้ำเป็นการกินทั้งตัว เช่น ไส้เดือนฝอย *Ditylenchus myceliophagus* กินเชื้อราหรือเส้นใย *Mononchus* spp. กินไส้เดือยฝอยด้วยกันเป็นอาหาร เป็นต้น

2. การแข่งขันกันเอง คือการที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งเข้าไปยึดพื้นที่หรืองอกเจริญเติบโตก่อนที่เชื้อสาเหตุโรคพืชจะสามารถเข้าทำลายพืชได้ เช่น การพ่นสปอร์ของเชื้อรา *Peniophora gigantea* ลงบนตอที่ต้นทำให้ลดการทำลายของเชื้อราที่ทำให้เกิดรากเน่า *Heterobasidion annosum* ลงได้มาก เนื่องจากเชื้อรา *P. gigantea* สามารถยึดครองผิวหน้าของตอไม้สนและเป็นการป้องกันไม่ให้เชื้อรา *H. annosum* เข้าทำลายและลุกลามต่อไปยังระบบรากจนทำให้รากเน่าได้

3. การสร้างสารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราในดิน และแอคติโนมัยซีส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การสร้างภูมิต้านทาน หมายถึง การใช้สายพันธุ์ของเชื้อโรคที่อ่อนแอหรือจุลินทรีย์ต่างกลุ่ม และไม่เกี่ยวข้องกันพ่นไปยังต้นพืชเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสายพันธุ์ที่รุนแรงกว่า

สำหรับการศึกษาด้านการควบคุมโรคโดยชีววิธีนั้น มีการค้นคว้าวิจัยในเรื่องการใช้เชื้อราและแบคทีเรียหลายชนิดในการควบคุมโรคเหี่ยวของพืช ดังเช่นผลงานของ Abd-Allah (2001) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีส *Streptomyces plicatus* ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช โดยทำการแยกเชื้อจากดินจำนวน 372 ไอโซเลท จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส พบว่า *S. plicatus* เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารเหลวที่มีสารไคติน ซูโครส และแคลเซียม ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ การยืดตัวของ germ tube และการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Alternaria alternate* และ *Verticillium albo-atrum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว stem canker และโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Verticillium* sp. ของมะเขือเทศได้ ในปีต่อมา Getha และ Vikineswary (2002) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *Streptomyces violaceusniger* strain G10 ในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 จากการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการโดยวิธี Dual Method พบการสร้าง clear zone บริเวณที่เส้นใยของเชื้อราที่เจริญแผ่ออกมาระหว่างเชื้อทั้งสองชนิดนั้น เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเส้นใยของเชื้อราถูกย่อยสลาย จากนั้นทำการเลี้ยง *S. violaceusniger* strain G10 ในอาหารเหลวร่วมกับเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 พบว่าเส้นใยของเชื้อราดังกล่าว แสดงอาการผิดปกติไม่มีการเจริญ จากการทดลองสรุปผลได้ว่า *S. violaceusniger* strain G10 มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดรวมทั้งเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยได้ ในปี 2005 Akköprü และ Demir ได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณรากของมะเขือเทศ และยาสูบ คือเชื้อ *Arbuscular mycorhizal* (AMF), *Glomus intraradices, Pseudomonas fluorescens* และ *Enterobacter cloacea* เพื่อคัดเลือกหาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พบว่าเชื้อ *Glomus intraradices* สามารถยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ 8.6 ถึง 58.6 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้น Suarez-Estrell*a et al*. (2007) ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากกองปุ๋ยหมัก เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และเชื้อแอคติโนมัยซีสจากกากพริก และเปลือกอัลมอนด์ เพื่อนำมาควบคุมโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตง ที่เกิดจากเชื้อ *F. oxysorum* f.sp. *melonis* พบว่า เชื้อปฏิปักษ์ในกลุ่มของเชื้อรา *Aspergillus* sp. สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ดีราชนิดเดียวกันแต่ต่างไอโซเลทกัน ไอโซเลทหนึ่งอาจแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคที่เกิดจากราอีกไอโซเลทหนึ่งได้ ดังผลงานของ Jaroszuk-Scisel *et al*. (2008) ได้ทำการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แยกเชื้อ *F. oxysporum* isolates DEMFc2 และ DEMFc5 ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรคกับข้าว Rye (*Secale cereale*) จากบริเวณเนื้อเยื่อชั้น epidermis และ cortex โดยนำมาใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวของข้าว Rye ที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* isolates DEMFc37 ผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่า *F. oxysporum* isolates DEMFc2 สามารถยับยั้งการเจริญโรคเหี่ยวของข้าวสาลีได้ถึง 86 เปอร์เซ็นต์ สำหรับรายงานการศึกษาด้านการควบคุมโรคโดยชีววิธีในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก ได้แก่ ผลการศึกษาของกัญญา (2545) โดยนำดินในจังหวัดเชียงใหม่มาทำการแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีสด้วยอาหาร GSA ได้ไอโซเลททั้งหมด 122 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ โดยเลี้ยงในอาหารเหลว GSM เป็นเวลา 5 วัน ใช้ส่วนของน้ำเลี้ยงมาทดสอบด้วยวิธี disc diffusion กับเชื้อมาตรฐาน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 พบว่า *Streptomyces* ไอโซเลท HC1-8 ให้ผลยับยั้งได้ดีที่สุดทั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ และ *Streptomyces* ไอโซเลท PY6-3 ให้ผลยับยั้งยีสต์ได้ดีที่สุด

วิธีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (นิพนธ์, 2538)

การศึกษานำเอาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปใช้ประโยชน์ควบคุมโรคพืช นิยมนำไปใช้กับโรคพืชที่เกิดบริเวณผิวราก หรือบริเวณผิวพืชที่อยู่เหนือดิน ซึ่งการใช้เชื้อปฏิปักษ์ควบคุมโรคที่บริเวณทั้งสองจะมีกรรมวิธีการใช้แตกต่างกัน

1. บริเวณผิวราก จะมีวิธีการนำเชื้อปฏิปักษ์มาใช้เพื่อควบคุมโรคได้หลายแบบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสะดวกในการปฏิบัติของผู้ใช้ ซึ่งแต่ละวิธีอาจให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้ไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างตั้งแต่คุณสมบัติของพืชเอง ตลอดจนลักษณะของผลิตภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ที่มีหลายรูปแบบ ดังนี้

1.1 การคลุกเมล็ด (Seed treatment) นิยมใช้กับพืชที่ใช้เมล็ดเพาะปลูกโดยเมล็ดจะต้องมีขนาดไม่ใหญ่โตมากนักช่วยให้ปฏิบัติได้ง่ายและไม่สิ้นเปลืองผงเชื้อ หรือสารแขวนลอยเชื้อ มักนิยมนำมาคลุกเมล็ดก่อนปลูก

1.2 การราดดิน (Soil drench) เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ปฏิบัติกันมาก แต่ไม่สะดวกหากนำไปใช้ในสภาพไร่ของเกษตรกรที่มีน้ำสะอาดไม่เพียงพอ หรือขาดแคลนน้ำ และถ้าปลูกพืชเป็นปริมาณมากจะทำให้เกิดปัญหาความไม่สะดวกในการปฏิบัติยิ่งขึ้น

1.3 การคลุกดิน (Soil amendment) เป็นวิธีการนำเอาผงเชื้อหรือสารละลายเชื้อปฏิปักษ์ใส่ไปในดินและคลุกเคล้าผสมกันให้ทั่วก่อนปลูกพืช การใส่ในรูปของผงเชื้อสะดวกกว่าในรูปของสารละลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 การจุ่มราก (Root dipping) เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้กับพืชที่ต้องเพาะเมล็ดแล้วย้ายต้นกล้าไปปลูก เช่น มะเขือเทศ พริก หรือพืชที่มีเมล็ดพันธุ์ราคาแพง โดยจะต้องทำให้ดินบริเวณรากหลุดออกให้หมดก่อนจากนั้นนำรากไปจุ่มในสารละลายเชื้อที่เข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิเมตร แล้วจึงนำไปปลูกในแปลงต่อไป วิธีนี้จะทำให้เชื้อปฏิปักษ์ควบคุมโรคได้ดี เพราะรากสัมผัสกับเชื้อได้หมดทุกส่วน

2. บริเวณผิวพืชอยู่เหนือดิน การใช้มีรูปแบบที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก และมีวิธีใช้ที่นิยมเพียง 2 วิธี คือ

2.1 การทา (Paste painting) เป็นวิธีที่นิยมใช้กับพืชยืนต้นที่ถูกทำลายมีแผลปรากฏให้เห็นชัดเจนบนส่วนของต้น หรือกิ่ง เป็นบริเวณที่สามารถนำเอาเชื้อปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้โดยให้มีความเข้มข้นและเหนียวไปทา เพื่อให้ยึดติดกับผิวพืชได้คงทน สามารถป้องกันและรักษาพืชให้พืชคืนเป็นปกติ ถ้าหากเป็นพืชยืนต้นสูง ๆ หรือพืชล้มลุกจะไม่สะดวกในการปฏิบัติ

2.2 การพ่น (Spraying) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากกับพืชที่ปลูกเป็นปริมาณมาก หรือมีลำต้นสูง ซึ่งมีหลักการปฏิบัติเช่นเดียวกับการพ่นสารเคมีกำจัดโรคพืช โดยมากแล้วนิยมใช้เชื้อที่เลี้ยงบนสารอาหารมาทำเป็นสารละลายแล้วจึงนำไปพ่นลงบนพืช เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคที่แพร่ระบาดโดยปลิวไปกับลม ฝน เป็นต้น

ปัญหาการใช้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (นิพนธ์, 2538)

ในปัจจุบันมักพบปัญหาและอุปสรรคในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีหลายประการ ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ความน่าเชื่อถือ (Reliability) เนื่องจากผลิตภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ที่ใช้เป็นสิ่งมีชีวิต มีความผันแปรได้ง่าย ถ้าหากไม่มีการควบคุมคุณภาพในการผลิตให้ดีแล้วจะทำให้มีผลการควบคุมโรคแตกต่างกัน ก่อให้เกิดความไม่น่าเชื่อถือขึ้น และหลังจากการใช้ผลิตภัณฑ์เชื้อไปแล้วจะต้องมีความเอาใจใส่ดูแลตามวิธีที่แนะนำไว้อย่างเคร่งครัด มิฉะนั้นจะทำให้ผลการควบคุมโรคไม่ให้ผลดีสม่ำเสมอทุกครั้งที่ใช้ เป็นสาเหตุให้ลดความน่าเชื่อถือลง

2. ประสิทธิภาพ (Efficacy) การผลิตเชื้อปฏิปักษ์แต่ละชนิดจะมีการใช้เชื้อแบคทีเรียต่างชนิดต่างสายพันธุ์กัน จะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชได้แตกต่างกัน และหากทำการคัดเลือกโดยไม่ระมัดระวังแล้วจะทำให้ได้เชื้อไม่มีคุณภาพและประสิทธิภาพ หรือเชื้อไม่ทนทานต่อสภาพแวดล้อม ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์เสื่อมประสิทธิภาพเร็วตามไปด้วย มีผลทำให้ควบคุมโรคไม่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ขอบเขตในการควบคุมโรค (Spectrum of activity) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้รับการคัดเลือกนำมาใช้โดยทั่วไปมักจะมีคุณสมบัติในการควบคุมโรคได้เฉพาะโรค หรือเฉพาะเชื้อสาเหตุโรคใดโรคหนึ่งเท่านั้น

การปรับปรุงเชื้อปฏิปักษ์ (Manipulation of Biocontrol Agent) (นิพนธ์, 2538)

การปรับปรุงเชื้อปฏิปักษ์ให้มีคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อโรคได้ดี และมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นนั้น โดยส่วนใหญ่แล้วจะเน้นการปรับปรุงให้ความอยู่รอดของเชื้อในธรรมชาติได้กว้างขวางทุกๆ สภาพพื้นที่ หรือพืชอาศัยหลายชนิด ซึ่งมีการศึกษาในหัวข้อต่อไปนี้

1. การอยู่รอดในธรรมชาติ (Survival) เชื้อปฏิปักษ์ที่ดีควรมีคุณสมบัติเจริญเติบโตดีทุกสภาวะแวดล้อม ตลอดจนทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ได้ดี จึงมักจะต้องหาเชื้อจากแหล่งที่มีความผันแปรของสิ่งแวดล้อมสูง หรือค่อนข้างแห้งแล้ง เป็นต้น จึงจะทำให้เชื้อปฏิปักษ์เมื่อนำไปใช้แล้วสามารถอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่เลวร้าย (adverse condition) ได้เป็นอย่างดี ทำให้สามารถให้ความคุ้มครองพืชอาศัยได้ตลอดเวลา

2. การเจริญครอบครอง (Colonization) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต้องมีความสามารถในการเจริญครอบครองพื้นที่อยู่อาศัยเพื่อหาอาหาร และเจริญเติบโต ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถหาอาหารหรือครอบครองพื้นที่ได้ การเจริญเติบโตไม่ดี อ่อนแอ และตายไปในที่สุด ถ้าเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อยู่ในดินต้องเจริญครอบครองผิวรากได้อย่างทั่วถึง จะช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อพวกที่อยู่ในดิน (soil-borne) ถ้าเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อยู่เหนือดินส่วนใหญ่จะเน้นครอบครองผิวใบได้ดี เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของโรคที่ทำให้เกิดกับใบเป็นส่วนใหญ่ เช่น พวกใบจุด ใบไหม้ เป็นต้น

3. ประสิทธิภาพ (Effectiveness) การเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคของเชื้อปฏิปักษ์มักจะทำให้มีความสามารถทำลายเชื้อโรคได้มากขึ้น และเชื้อหลายชนิดยิ่งขึ้น ในขณะเดียวกันจะต้องมีความจำเพาะในการทำลายเฉพาะเชื้อโรคพืชเป้าหมายเท่านั้น แต่จะไม่ทำลายจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ไม่ใช่เป้าหมาย

4. การเข้ากันได้กับวิธีอื่น (Compatibility) เชื้อปฏิปักษ์ถ้าหากมีคุณสมบัติหลายอย่างในตัวเองจะได้เปรียบกว่าพวกมีคุณสมบัติอย่างใดอย่างหนึ่ง เช่น เป็นเชื้อที่ทนทานต่อสารเคมี และความร้อนสูง ซึ่งอาจนำเอาการใช้สารเคมีหรือความร้อนมาใช้ร่วมกับการใช้เชื้อปฏิปักษ์จะทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมสูงกว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์อย่างเดียว นั่นคือการควบคุมโรคโดยวิธีผสมผสาน (integrated control) หรืออาจใช้เชื้อปฏิปักษ์ร่วมกับพันธุ์ต้านทานอาจทำให้ได้ผลควบคุมโรคได้ดี และใช้ได้นานยิ่งขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การพัฒนาชีวภัณฑ์ (Development of Biocontrol Products) (นิพนธ์, 2538)

เชื้อปฏิปักษ์ที่ได้ทำการคัดเลือกทดสอบว่ามีความสามารถควบคุมโรคได้ดีในห้องปฏิบัติการและในสภาพไร่แล้วจำเป็นจะต้องมีการศึกษาพัฒนาเป็นชีวผลิตภัณฑ์ เพื่อนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในเชิงการค้าต่อไป ซึ่งต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. มีมาตรฐานที่เชื่อถือได้ (Acceptable standard) เชื้อปฏิปักษ์ที่พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จะต้องมีปริมาณของเชื้อที่ใช้ใกล้เคียงได้มาตรฐานทุกๆ ครั้งที่ผลิต ไม่มีเชื้ออื่นปะปน และคุณภาพการควบคุมโรคคงที่สม่ำเสมอ

2. มีอายุเก็บรักษานาน (Acceptable shelf-life) ชีวภัณฑ์ที่ดีจะต้องสามารถเก็บรักษาในบรรยากาศที่ร้อนของประเทศไทยไว้ได้นานในสภาพที่ไม่ต้องดูแลรักษามากนัก ทั้งในขณะที่จำหน่ายอยู่ในร้านค้า หรือที่เกษตรกรเก็บไว้ใช้

3. มีความปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม (Environmental safety) ชีวภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นจะต้องไม่มีโทษต่อสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ และสิ่งแวดล้อม คือไม่ทำให้เกิดผลกระทบต่อชีวิตของสิ่งมีชีวิตอื่น และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทำความเสียหายกับสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ

4. มีการใช้ร่วมกัน (Combination use) ชีวภัณฑ์หากสามารถนำไปใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ ได้แล้วจะทำให้มีประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้ดียิ่งขึ้น และยังเป็นการประหยัดทั้งทุนทรัพย์ตลอดจนความสะดวกสบายในการปฏิบัติที่ไม่ต้องเสียเวลามาก

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาวิธีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีมาไม่ต่ำกว่า 20 ปี แต่ผลที่ได้ยังไม่ค่อยได้ผลดีเท่าที่ควร จนกระทั่งเมื่อ 10 กว่าปีที่มีรายงานการใช้แบคทีเรียควบคุมโรคปุ่มปมสำเร็จจึงทำให้มีการสนใจศึกษากันมากและได้ผลดียิ่งขึ้น โดยมีการศึกษาควบคุมโรคที่สำคัญ ดังนี้

1. โรคที่เกิดจากเชื้อรา (Fungal disease) มีการนำเอาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ซึ่งก็มีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ส่วนใหญ่เป็นพวก *Bacillus* เช่น *B. subtilis* ซึ่งพบว่าทำให้แผลเน่าแห้งไม่เกิดยางไหล หลังเอาเชื้อข้นๆ ทาไปบริเวณแผล (มณจันทร์และชัยวัฒน์, 2537) นอกจากนี้ยังมีการควบคุมโรคกาบใบไหม้ของข้าว (shealth blight of rice) เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (มานะ และคณะ, 2536)

2. โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial disease) การนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย มีการศึกษาได้ผลดีคือ การนำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CH_4 ควบคุมโรคเน่าเละของมันฝรั่ง (soft rot) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (ปริญญา และคณะ, 2533) ซึ่งได้พัฒนาเป็นผงชีวภัณฑ์ ที่สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง (ช่อทิพย์, 2538) นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* โดยพบว่า *B. subtilis* และเชื้อ *P. fluorescens* สามารถใช้ควบคุมเชื้อโรคได้ดี อีกทั้งยังพบว่าถ้าใช้ร่วมกับพันธุ์ต้านทานจะให้ผลควบคุมโรคดียิ่งขึ้น (อุรัจฉทา และคณะ, 2535; สุภกิจ, 2536)

การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในดินโดยชีววิธีเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการเลิกใช้สารเคมีเพื่อลดปัญหาสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม ดังนั้นจึงมีการนำเอาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรคกันอย่างแพร่หลาย และหนึ่งในเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์นั้นก็คือเชื้อแอคติโนมัยซีส ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

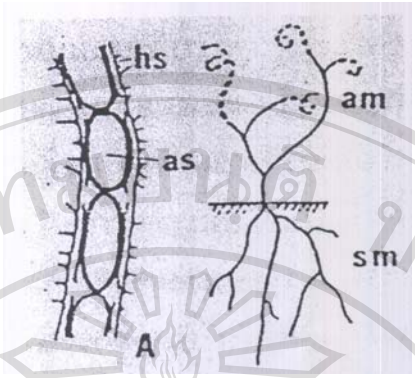
แอคติโนมัยซีส (Actinomycetes)

แอคติโนมัยซีส จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเส้นใยของเชื้อรา สามารถเจริญบนอาหารสังเคราะห์ชนิดแข็ง โดยสร้างเส้นใยที่เรียกว่า เส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) โดยเส้นใยใต้ผิวอาหารจะเจริญบนผิวหน้าอาหารก่อน และแทงเส้นใยเข้าไปในอาหารเพื่อนำสารอาหารไปใช้ได้อย่างเต็มที่ เมื่อโคโลนีเจริญขึ้น เส้นใยเหนือผิวอาหารจะเกิดขึ้นมาภายหลัง และยื่นไปในอากาศเพื่อทำหน้าที่หลักคือการสืบพันธุ์ ระหว่างที่โคโลนีเจริญ เส้นใยเหนือผิวอาหารจะสร้างเพิ่มขึ้นในสภาวะพิเศษ เช่น ขาดน้ำ ขาดอาหาร หรือมีการสะสมของ inhibition compound ดังนั้นเส้นใยเหนือผิวอาหารจึงต้องมี hydrophobic sheath เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ (Waksman, 1967)

เส้นใยใต้ผิวอาหารจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.8 ไมโครเมตร สีของเส้นใยมีตั้งแต่สีขาว ใส ไม่มีสี สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน แดง ชมพู ส้ม เขียว หรือสีดำ สามารถสร้างรงควัตถุได้ทั้งชนิดที่ละลาย และไม่ละลายน้ำ โดยส่วนเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1.0-1.4 ไมโครเมตร สามารถสร้างรงควัตถุได้หลายสี เช่น สีขาว เทา เหลือง ส้ม แดง ม่วง ฟ้า และเขียว โดยที่สีของรงควัตถุอาจเปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเจริญเติบโต และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Mendez *et al.*,1985)

ในปี ค.ศ. 1976 Kalakoutskii และ Agre ได้รายงานว่าแอคติโนมัยซีสสร้างผนังกั้นเส้นใยแบบต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของแอคติโนมัยซีส การแตกแขนงของเส้นใยส่วนใหญ่เป็นแบบ monopodial ซึ่งพบในสกุล *Streptomyces* การแตกแขนงแบบ dichotomous พบใน *Actinobifida* การแตกแขนงแบบ verticillate พบใน *Streptoverticillium* แอคติโนมัยซีสส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใย 2 ชนิด คือ primary (substrate) mycelium และ secondary (aerial) mycelium ดังภาพที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Streptomycetes* sp.

การสร้างเส้นใยของ *Streptomycetes* sp. มีการสร้าง arthrospore (as) ที่มี hydrophobic sheath (hs) หุ้ม ลักษณะสปอร์ต่อเป็นสายโซ่บน aerial mycelium (am) ซึ่งไม่พบใน substrate mycelium (sm) (ที่มา: Williams *et al*., 1989)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของแอคติโนมัยซีสโดยทั่วไปพบได้ 2 แบบคือแบบ mycelium fragmentation และแบบ sporulation ในพวก *Streptomyces* spp. จะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษตามความยาวของ aerial mycelium โดยเซลล์ขยายใหญ่ และมีผนังหนาขึ้น เรียกว่า chlamydospore หรือ arthrospore มักพบเดี่ยวๆ (single spore) หรือต่อกันเป็นสายโซ่ (chain) ในพวก *Actonoplane armenicus* สามารถสร้างสปอร์ได้ 2 แบบ คือ สปอร์แบบมี flagella เรียกว่า zoospore ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ และสร้างสปอร์แบบ arthrospore บน aerial mycelium ในการสร้างสปอร์แบบใดนั้นมักขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เชื้อเจริญอยู่ (Agrios, 1997)

แอคติโนมัยซีสเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และเป็น chemoheterotrophic แต่บางชนิดมีคุณสมบัติเป็น anaerobe ซึ่งต่างจากเชื้อราและยีสต์ที่ไม่มีคุณสมบัตินี้ เมื่อเจริญในอาหารเหลวจะเจริญเป็นกลุ่มเป็นก้อน ไม่กระจัดกระจายเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะใส การเพิ่มจำนวนจะคล้ายกับเชื้อราเป็นแบบ apically ซึ่งต่างจากแบคทีเรียที่มีการเพิ่มจำนวนเป็นแบบ exponential อัตราการเจริญของแอคติโนมัยซีสจะช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อรามาก โดยจะใช้เวลาประมาณ 7-14 วัน โคโลนีที่สมบูรณ์มีทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหารและเส้นใยเหนือผิวอาหารปรากฏให้เห็น สำหรับชนิดที่มีการเจริญช้าและสร้างเส้นใยทั้ง 2 แบบ อาจใช้ระยะเวลาถึง 1 เดือน แอคติโนมัยซีสมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีการ fission ของเส้นใยแล้วจึงพัฒนาไปเป็นสปอร์ที่เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) ที่มีลักษณะคล้ายกับสปอร์ของเชื้อรา คือมีการแตกหักของเส้นใย ซึ่งสปอร์ดังกล่าวมีหลายลักษณะ เช่น เป็นสปอร์เดี่ยวๆ ที่ไม่เคลื่อนที่ หรือเคลื่อนที่ได้ หรือสปอร์คู่โดยสปอร์จะเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ หรือบิดเป็นเกลียวคล้าย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สปริง หรือเป็นถุงขนาดใหญ่ภายในบรรจุสปอร์ที่เรียกว่า สปอร์แรงเจีย (sporangia) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบแอคติโนมัยซีสกับแบคทีเรีย พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงทั้งขนาดและรูปร่าง โดยลักษณะสำคัญที่จัดให้แอคติโนมัยซีสเป็นแบคทีเรียที่แท้จริง คือ มีเซลล์เป็นแบบ prokaryote และผนังเซลล์ประกอบด้วย peptidoglycan ไม่มีไคติน และเซลลูโลส แยกความแตกต่างของสกุลได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบของผนังเซลล์ นอกจากนี้ที่ผนังเซลล์ยังมีบริเวณที่จำเพาะสำหรับการเกาะติดของ bacteriophage ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้เฉพาะในแบคทีเรียเท่านั้น แต่ไม่พบในเชื้อรา แอคติโนมัยซีสส่วนใหญ่เป็นพวก aerobe บางสกุลเป็น facultative anaerobe หรือ obligate anaerobe บางสกุลเป็นเชื้อสาเหตุก่อโรคในมนุษย์ สัตว์ และพืชบางสกุล บางชนิดเป็น obligate symbiotic ในปมรากพืชและตรึงไนโตรเจนได้ เช่น สกุล *Frankia* แอคติโนมัยซีสเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลากหลาย ได้อาหารจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ (saprophytic) และชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) (Porter, 1971)

แอคติโนมัยซีสพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ อากาศ อาหาร และในพืช แหล่งที่พบมากได้แก่บริเวณที่มีการสะสมสารอินทรีย์ เช่น ดินที่เพาะปลูก วัตถุเน่าเปื่อย โคลน ตะกอนใต้แม่น้ำ ใต้ทะเล ดินบริเวณน้ำพุร้อน หรือป่าชายเลน โดยจะพบแอคติโนมัยซีสจำนวนมากบริเวณดินชั้นบนและจะลดจำนวนลงในดินที่ลึกลงไป โดยทั่วไปสามารถพบแอคติโนมัยซีสได้มากกว่า 100 สกุล ในดินที่ค่อนข้างเป็นกลาง หรือความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 6.5-8.0 นอกจากนี้ยังพบมากในดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแอคติโนมัยซีสกลุ่มของ *Streptomyces* และ *Nocardia* ในชิ้นส่วนของต้นพืช (endophytic actinomycetes) สามารถพบแอคติโนมัยซีสได้อีกหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Holt *et al*., 1994)

การจำแนกประเภทของแอคติโนมัยซีส (Classification of Actinomycete) (Holt *et al*., 1994)

Bergey's Manual of Sytematic Bacteriology เล่ม 4 ได้จำแนกแอคติโนมัยซีสออกเป็นกลุ่ม โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ โดยแบ่งเป็น 8 กลุ่ม (กลุ่มที่ 26-33) ซึ่งประกอบด้วย Nocardioform, Multilocular sporangia, Actinoplanete, Streptomycete, Maduromycete, Thermomonospora, Thermoactinomycete และกลุ่มอื่นๆ ที่ยังไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มต่างๆ ดังข้างต้นได้ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Group 26 Nocardioform Actinomycetes

เป็นกลุ่มที่มีลักษณะการสร้างเส้นใยสั้นๆ บางสกุลสร้าง aerial mycelium และอาจสร้างสปอร์เป็นสายโซ่ แยกความแตกต่างของแต่ละสกุลโดยใช้องค์ประกอบของผนังเซลล์ และสารกรด

มายคอลิก (mycolic acid) ที่พบภายในเซลล์ และลักษณะทางเคมีอื่นๆ ประกอบ กลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อยคือ

subgroup 1 Mycolic-containing bacteria

subgroup 2 *Pseudonocardia* และ related genera

subgroup 3 *Nocardioides* และ *Terrabacter*

subgroup 4 *Promicromonospora* และ related genera

Group 27 Genera with multilocular sporagia

แอคติโนมัยซีสกุลนี้สร้างเส้นใยที่มีผนังกั้นตามขวาง สปอร์มีลักษณะทรงกลม อาจเคลื่อนที่ได้ เช่น *Dermatophilus* และ *Geodermatophilus* หรือไม่เคลื่อนที่เช่น *Frankia*

Group 28 Actinoplanate

สร้างเส้นใยที่คงทน (stable filament) อาจมี aerial mycelium น้อยถึงไม่มีเลย สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้อยู่ภายในสปอร์แรงเจีย เช่น ในสกุล *Actinoplanes, Ampullariella, Dactylosporaniun* และ *Pilimelia* หรืออาจสร้างสปอร์เดี่ยวๆ ไม่เคลื่อนที่เช่น *Micromonospora* หรือในบางกรณีที่สร้างสปอร์ที่เป็นสายโซ่สั้นๆ เช่น *Catellatospora* ผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีสกลุ่มนี้ประกอบด้วยสาร diamino-pimelic acid แบบ meso-DAP และ glycine เมื่อวิเคราะห์น้ำตาลพบว่าเป็นน้ำตาลพวก arabinose และ xylose

Group 29 Streptomycetes and related genera

เป็นกลุ่มที่มีลักษณะแตกต่างกัน มีผนังเซลล์ที่ประกอบไปด้วยสาร aminopimelic acid เป็นแบบ L-DAP และ glycine โดย aerial mycelium สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายโซ่ เช่น ในสกุล *Streptomyces* และ *Streptoverticillium* ส่วนสกุลอื่นๆ เช่น *Intrasporangium*, *Kineosporia* และ *Sporichthya* สร้าง aerial mycelium น้อย หรือไม่สร้างเลย และสปอร์มีหลายรูปแบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Group 30 Madolomycetes

กลุ่มนี้มีการสร้างเส้นใยที่คงทนและสร้างสปอร์แบบไม่เคลื่อนที่ เช่น สกุล *Microbispora* (สร้าง 2 spore/chain) *Microtetraspora* (สร้าง 4 spore/chain) และ *Actinomadura* (สร้างมากกว่า 4 spore/chain) ส่วนสกุลอื่นๆ สร้างสปอร์ในสปอร์แรงเจียพบใน *Streptosporangium* ผนังเซลล์ของ

แอคติโนมัยซีสในกลุ่มนี้ประกอบด้วยสาร meso-DAP แอคติโนมัยซีสกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

subgroup 1 *Streptosporangium* และ related genera

subgroup 2 *Actinomadura*

Group 31 Thermomonospor*a* and related genera

มี aerial mycelium เป็นเส้นใยแบบคงทน สร้างสปอร์เป็นคู่ซึ่งอยู่เดี่ยวๆ ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี เช่น แอคติโนมัยซีสในกลุ่ม *Thermomonospora* เป็นกลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสายโซ่ ซึ่งพบใน *Actinosynnema* และ *Nocardiopsis* โดยในบางกลุ่มสร้างโครงสร้างที่คล้ายสปอร์แรงเจียพบใน *Streptoalloteichus* ผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีสในกลุ่มนี้ประกอบด้วย meso-DAP แต่ไม่พบสาร amino acid หรือ น้ำตาลชนิดอื่นๆ

Group 32 Thermoactinomycetes

สร้างเส้นใยที่คงทน และสปอร์แบบเดี่ยวๆ บน aerial mycelium และ substrate filament ซึ่งแอคติโนมัยซีสในกลุ่มนี้พบเพียงจีนัสเดียว คือ *Thermoactinomyces* ทุกสปีชีส์เจริญได้ในที่อุณหภูมิสูง (thermophilic) ผนังเซลล์ประกอบด้วยสาร aminopomillic acid แบบ meso-DAP แต่ไม่พบสาร amino acid หรือน้ำตาลชนิดอื่นๆ

Group 33 other genera

แอคติโนมัยซีสในกลุ่มนี้มี 3 สกุล ซึ่งมีลักษณะไม่เหมือนแอคติโนมัยซีสในกลุ่มอื่นๆ สร้าง aerial mycelium ที่มีสปอร์เป็นสายโซ่ไม่พบสาร mycolic acid ในเซลล์ ได้แก่ *Glycomyces*, *Kitasatosporia* และ *Saccharotrix*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีส

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีส (Lechevalier *et al*., 1968) ที่ใช้ในการศึกษามีดังต่อไปนี้

1. เส้นใย (mycelium) แบ่งออกเป็นเส้นใยแบบคงสภาพและเส้นใยที่สามารถแตกหักย่อยสลายได้ ถ้ามีเส้นใยที่มีการแตกหัก และมีอวัยวะที่ใช้ในการเคลื่อนที่จัดเป็น *Oerskovia* spp. หรือมีการสร้างทั้ง substrate mycelium และ aerial mycelium ซึ่งพบได้ทั่วไป อาจมีการสร้างเส้นใยแต่เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง ในบางสกุลอาจมีการสร้าง vesicle ภายในเส้นใย ซึ่งไม่ใช่สปอร์บนเส้นใย

2. โคนิเดีย (conidia) คือสปอร์ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แต่ไม่ใช่ chlamydospore หรือ sporangiospore โดยสามารถแบ่งออกเป็น

a) การสร้างโคนิเดียเดี่ยวๆ พบในหลาย genus เช่นใน *Thermoactinomyces* ซึ่งสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง พบใน genus *Saccharorionospora*

b) การสร้างโคนิเดียต่อกันเป็นคู่ๆ พบใน genus *Microbispora* จะสร้างโคนิเดียเฉพาะบน aerial mycelium เท่านั้น ใน *Faenia* spp. อาจมีการสร้างโคนิเดียทั้งบน aerial และ substrate mycelium

c) สร้างโคนิเดียเป็นสายสั้นๆ ต่อกันเป็นสาย ไม่เกิน 20 สปอร์ต่อสาย สามารถพบได้ในสกุล ต่อไปนี้ *Nocardia, Pseudonocardia, Faenia, Saccharorionospora, Streptoverticillium, Sporich*, *Actinomadura, Microtetraspora, Streptoalloteichus* และ *Glycomyces*

d) สร้างโคนิเดียเป็นสายยาว แอคติโนมัยซีสกลุ่มนี้พบได้ในสกุล *Nocardia, Nocardioidddes, Pseudonocardia, Saccharorionospora, Actinopolyspora, Streptomyces, Streptoverticillium, Actinosynnema, Nacardiopsis, Streptoalloteichus, Kibdelosporangium, Kitasatosporia, Glycomyces, Sccharothrix* และ *Amycolatopsis*

3. สปอร์แรงเจีย (sporangia) ภายในบรรจุสปอร์ที่เกิดจากการพัฒนาของผนังเซลล์ใน aerial mycelium พบได้ในสกุล *Actinoplanes, Ampulariella, Pilimelia, Dactylosporangium*, *Planobispora, Plamomonospora, Spirillospola* และ *Streptosporangium*

4. โครงสร้างอื่นๆ ที่แอคติโนมัยซีสสร้างขึ้น ในบางสกุลอาจสร้าง synnemata และสร้างสปอร์อยู่ภายในพบในสกุล *Actinosynnema* การสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า multilocular sporangia ซึ่งมีสายของสปอร์ขดเป็นวงม้วนอยู่ภายใน พบใน *Kibdelosporangium* ส่วน *Streptomyces* มีการสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า sclerotia คล้ายกับในเชื้อรา

การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีมีความจำเป็นในการใช้แยกความแตกต่างของแอคติโนมัยซีสที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกัน หรือในกรณีที่ไม่มีการสร้างสปอร์ ความแตกต่างกันขององค์ประกอบผนังเซลล์ (cell wall type) และ whole cell sugar patter สามารถตรวจสอบได้โดย thin layer chromatography การวิเคราะห์สาร menaquinone โดยวิธี gas chromatography และการวิเคราะห์ phospholipid composition พบว่ามี 5 แบบคือ

PI ไม่มี nitrogenous phospholipid

PII มี phosphatidyle ethanolamine

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

PIII มี phosphatidylcholine

PIV มี phosphatidylethanolamine และ glucosamine containing phospholipid

PV มี glucosamine containing phospholipids

การแยกเชื้อบริสุทธิ์และการจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีส

การแยกแอคติโนมัยซีสบนอาหารที่จำเพาะผสมร่วมกับสารปฏิชีวนะ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และแบคทีเรียบางกลุ่มที่ไม่ต้องการ เพื่อให้แอคติโนมัยซีสที่เจริญเติบโตช้ากว่าที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญออกมา การจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีสโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้แก่ ลักษณะโคโลนี โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจดูลักษณะการสร้างสปอร์ สามารถจำแนกแอคติโนมัยซีสในระดับสกุลได้

ส่วนการจำแนกในระดับสปีชีส์ พบว่าต้องอาศัยการตรวจสอบหลายๆ ด้านประกอบกัน ได้แก่ ลักษณะกรดอะมิโนภายในผนังเซลล์ ลักษณะของน้ำตาลใน whole cell hydrolysate และการตรวจในระดับโมเลกุลเป็นต้น (Lechevalier *et al*., 1968)

แอคติโนมัยซีสสามารถแยกออกมาได้จากส่วนต่างๆ ของพืช ซึ่งพบว่ามีผู้รายงานไว้ดังนี้ Mirza *et al.* (1991) สามารถแยก *Frankia* sp. จากบริเวณปมรากพืชหลายชนิด จำแนกโดยการศึกษา whole cell fatty aci1d ใน *Frankia* ที่แยกได้จาก *Coriaria nepalensis* และ *Datisca cannabina* พบว่าลักษณะ fatty acid เท่ากับ 15:0, 15:1, 16:0 และ 17:1 เหมือนกับใน Frankia ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ คือ alnus, casauriana, comptonia, elaeagnus และ hippophae ในปีต่อมา Sardi *et al.* (1992) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากรากพืชจำนวน 28 ชนิด บนอาหาร Starch Casein Medium ที่ผสมด้วยสารปฏิชีวนะ nystatin และ cycloheximide พบว่า เป็น *Streptomyces* มากที่สุด จำนวน 482 ไอโซเลท รองลงมาคือ *Nocardia*, *Strepverticillum* และ *Streptosporangium* จำนวน 4, 2 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ หลังจากนั้น Takao *et al.* (1995) ทำการแยกแอคติโนมัยซีสจากใบของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 8 ชนิด บนอาหาร Salt Agar Medium ที่ผสม yeast โดยผมกับสารปฏิชีวนะ ได้แก่ nystatin และ cycloheximide พบว่าแอคโนมัยซีสที่สามารถแยกได้ คือ *Streptomyces, Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*, *Actinoplanes* และ *Thermomonoepora* จากนั้นอีก 3 ปี Kudo *et al.* (1998) ได้ทำการแยกแอคติโนมัยซีสจากตัวอย่างพืช และจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่วนประกอบในผนังเซลล์ และรูปแบบของน้ำตาลใน whole cell และได้ยืนยันผลการจำแนกชนิดโดย phylogenetic analysis ในส่วน 10s RNA และ DNA – hybridization โดยพบว่าแอคติโนมัยซีสที่จำแนกได้เป็นสปีชีส์ใหม่ คือจัดอยู่ในสกุล *Kineospitia* ได้แก่ *K. mukuniensis* sp.nov., *K. rhizophila* sp. nov. และ *K. rhamnosa* sp. nov. ต่อจากนั้น Shimizu *et al.*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(2000) ได้แยกแอคติโนมัยซีสจากราก ต้น และใบของต้น Rhododendron บนอาหาร IMA-2 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ ได้แก่ amphotericin B, riphampin – viccillin solution และ heritage หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ พบแอคติโนมัยซีส จำนวน 10 ไอโซเลท จากนั้นทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคของ Rhododendron พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora cinnamomi* และ *Pestalotiopsis sydowiana* ได้ ในปีเดียวกัน Jonete *et al.* (2000) ทำการแยกแอคติโนมัยซีสจากใบและรากของข้าวโพด พบแอคติโนมัยซีส จำนวน 31 ไอโซเลท จากใบ และ 22 ไอโซเลท จากราก เมื่อทำการจัดจำแนกพบว่าสามารถจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และ *Streptosporangium* ซึ่งจากจำนวนไอโซเลททั้งหมด พบว่ามีแอคติโนมัยซีส ประมาณ 43.4 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อทั้งหมดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ที่ใช้ทดสอบได้ Berg *et al.* (2000) ได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณรากของสตรอเบอรี่ 2 พันธุ์ คือ *Fragaria viridis* และ *F. xananassa* บนอาหาร King'B Medium และ Glycerol-Arginine Agar เพื่อคัดเลือกหาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Verticillium dahliae* พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีกลไกการยับยั้งเชื้อ *V. dahliae* ได้ จำนวน 300 ไอโซเลท ซึ่งแยกจาก *F. xananassa* และ 20 ไอโซเลท จาก *F. viridis* เมื่อทำการจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ Ribosomal DNA Restriction Analysis (RDRA) พบว่าเป็น *Streptomyces albidoflavus* S1 และ *Pseudomonas fluorescens* P6 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคเหี่ยว *Verticillium* ในเรือนเพาะชำ และในปีเดียวกัน Caruso *et al.* (2000) สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์และแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ จากเนื้อเยื่อภายในกิ่ง ราก และใบของพืชในสกุล Taxus 22 ชนิด สามารถพบเชื้อราจำนวน 150 ไอโซเลท และแอคติโนมัยซีส 71 ไอโซเลท ต่อมาทำการคัดเลือกความสามารถในการผลิตสาร taxane จากเชื้อเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมดในอาหารเหลว และตรวจสอบการผลิตสารดังกล่าวโดยวิธี Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay (CIEIA) พบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อราที่สามารถผลิตสาร taxane ได้ 15 ไอโซเลท และแอคติโนมัยซีส 10 ไอโซเลท สองปีต่อมา Chris (2002) ได้ทำการแยกแอคติโนมัยซีสจากพืชในประเทศออสเตรเลีย ทำให้พบแอคติโนมัยซีสจากพืชที่นำมาทดสอบจำนวนมาก ต่อมาได้ศึกษาความสามารถในการสร้างสาร metabolite พบว่ามีแอคติโนมัยซีสที่แยกได้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ของแอคติโนมัยซีสทั้งหมด และ 9 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญ และสร้างเสริมความแข็งแรงให้กับต้นพืช

นอกจากนี้แอคติโนมัยซีสยังสามารถแยกได้จากดิน ดังเช่น Wu และ Chen (1995) ได้จัดจำแนกและบ่งบอกชนิดของแอคติโนมัยซีสซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไต้หวัน โดยทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการเลี้ยงแอคติโนมัยซีสที่แยกได้บนอาหาร Czapek-Dox

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Agar, Nutrient Agar, Sabouraud Agar และ ISP Medium เมื่อแอคติโนมัยซีสเจริญเติบโตได้ 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ โดยทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microcope; SEM) และได้ศึกษาลักษณะทางชีวเคมี การใช้คาร์โบไฮเดรตโดยนำแอคติโนมัยซีสมาเลี้ยงในอาหาร Carbon Nutrient Medium การตรวจสอบสารประกอบในผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีส และการศึกษา DNA-DNA Homology วิธีดังกล่าวช่วยให้สามารถจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีสได้ดี ซึ่งแอคติโนมัยซีสที่จำแนกได้คือ *Streptomyces toxytricin* ในปีต่อมา Wang *et al.* (2001) ได้ทำการแยกแอคติโนมัยซีสจากดินในประเทศสิงคโปร์ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีแอคติโนมัยซีสสปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จำนวน 1 สายพันธุ์ สามารถทนต่อความเป็นด่าง และเจริญได้ดีในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางเคมีพบว่าผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีสเป็นแบบ LL-diaminopimelic acid, menaquinnone แบบ type PI, phospholipid และ MK-9 (H6) จากนั้นทำการวิเคราะห์ 16s rDNA sequence พบว่าสามารถจำแนกแอคติโนมัยซีสได้ชนิดที่อยู่ในตระกูล (family) Nacardioidaceae สกุล *Actinopolymorpha singaporensis* ซึ่งในปีเดียวกัน Otogura *et al.* (2001) สามารถแยก *Actinokineospora* spp. จากดินและตัวอย่างพืช โดยนำตัวอย่างดินและพืชไปรมด้วยสารแคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อเพิ่มปริมาณของ *Actinokineospora* spp. จากนั้นผึ่งให้แห้งแล้วแช่ในฟอตเฟตบัพเฟอร์เพื่อแยกเอา zoospore ของเชื้อออกมา นำ suspension ที่ได้เลี้ยงบนอาหาร Humic Acid Vitamin Agar ที่ผสมสารปฏิชีวนะคือ fradiomycin, kanamycin, nalidixic acid และ trimethoprim พบว่าสามารถแยก *Actinokineospora* spp. ได้จำนวนทั้งสิ้น 17 ไอโซเลท และในปีเดียวกันนี้ Stamford *et al.* (2001) ทำการแยกแอคติโนมัยซีสจากมันแกว และได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จากนั้นศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์และลำดับเบสของ 16s rDNA เมื่อตรวจจำแนกพบว่าเป็น *Nocardiopsis* sp. ซึ่งเป็นสกุลเดียวกับแอคติโนมัยซีสที่พบในพืช *Taxus baccata*

จากที่กล่าวมานั้น จะเห็นได้ว่ามีนำเอาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกมาได้มากมายหลายชนิด ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ โดยหนึ่งในเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สำคัญได้แก่ แอคติโนมัยซีส เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีรายงานว่าสามารถสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ สำหรับการศึกษาแอคติโนมัยซีสมีรายงานการศึกษาดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสำคัญของแอคติโนมัยซีส

แอคติโนมัยซีสเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และเภสัชกรรม เนื่องจากสามารถผลิตสารเมตาโบไลท์ได้หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะที่มีความสำคัญทางการเกษตร และ

อุตสาหกรรม อีกทั้งยังมีความสำคัญทางระบบนิเวศวิทยาอีกด้วย จึงมีผู้ทำการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ดังเช่น Walter และ Crawford (1995) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของ *Sterptomyces lydicus* WYEC 108 เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและเมล็ดเน่าของข้าวโพด ซึ่งผลการศึกษา พบว่า *S. lydicus* WYEC 108 มีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด โดยสามารถสร้างสาร extracellular antifungal metabolite และเมื่อทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่า *S. lydicus* WYEC108 สามารถยับยั้งการงอกของ oospore ของเชื้อรา *Pythium ultimum* นอกจากนี้ยังสามารถทำลายผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราได้ ดังนั้นแอคติโนมัยซีสชนิดนี้จึงสามารถใช้ในการควบคุมโรคเมล็ดเน่าและโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *P. ultimum* ได้ ในปีต่อมา Cecilia และ Deborah (1996) ศึกษาการควบคุมโรครากเน่าคอดินในต้นกล้าถั่วโดยใช้ *Streptomyces* strain 93 เป็นเชื้อปฏิปักษ์ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเมล็ดเน่าและโรคเน่าคอดินของต้นกล้าได้ในสภาพห้องปฏิบัติการ และไม่มีผลต่อการเจริญของ *Rhizobium meliloti* ที่อาศัยภายในปมรากถั่ว ในการศึกษาได้แบ่งการทดลองเป็นคลุกเมล็ดด้วย *Streptomyces* เพียงอย่างเดียว และคลุกเมล็ดด้วย *Streptomyces* ร่วมกับสารฆ่าเชื้อรา จากการทดลองพบว่า การอยู่รอดของต้นกล้าและความสมบูรณ์ของต้นกล้าในวิธีที่มีการคลุกเมล็ดด้วย *Streptomyces* ร่วมกับสารฆ่าเชื้อราสูงกว่าในกรรมวิธีที่มีการคลุกเมล็ดด้วย *Streptomyces* เพียงอย่างเดียว ต่อมา Gomes *et al.* (2000) ได้ทำการสกัดเอนไซม์ที่สร้างจากแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินในเมือง Cerra พบว่า *Streptomyces* ที่แยกได้สามารถสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ endochitinolytic activity โดยมี *Streptomyces* 3 สายพันธุ์ สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีผลยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช และสามารถพัฒนาใช้เป็น biocontrol agent ที่มีประสิทธิภาพได้ และสองปีถัดมา Bordoloi *et al*. (2002) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสาร antibiotic (2- methyl heptylisonicotinate) ซึ่งสกัดได้จาก *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวสาเหตุจากเชื้อ *Fusarium* ในพืชตระกูลกะหล่ำ โดยสามารถที่จะยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช ซึ่งได้แก่ *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. semitectum*, *F. solami* และ *Rhizoctonia solani* ได้

ในปีเดียวกัน Nishimura *et al.* (2002) แยกแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์จาก ใบ ต้น และรากของพืช mountain laurel (*Kalmia latifolia* L) ได้จำนวน 73 ไอโซเลท และคัดเลือกเชื้อที่สามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ซึ่งได้แก่ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท AOK-30 ทั้งนี้เนื่องมาจาก

1. เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในตระกูล Ericaceae ได้หลายชนิด
2. สามารถเจริญได้ดีบนอาหารกระตุ้นการเกิดรากที่เลี้ยงร่วมกับเนื้อเยื่อพืช mountain laurel (*Kalmia latifolia* L)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ต้นกล้าของพืชที่มี *Streptomyces* sp. ไอโซเลท AOK-30 สามารถต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ *Pestalotia* sp. ได้โดยไม่เกิดอาการรูปร่างผิดปกติ แคระแกร็น ใบด่าง และใบร่วง

ผลงานการศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีสในประเทศไทย ได้แก่ กัญญา (2545) นำดินในจังหวัดเชียงใหม่มาเพื่อแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีสด้วยอาหาร GSA ได้ไอโซเลททั้งหมด 122 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ โดยเลี้ยงในอาหารเหลว GSM เป็นเวลา 5 วัน ใช้ส่วนของน้ำเลี้ยงมาทำการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion กับเชื้อมาตรฐาน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 90028 พบว่า *Streptomyces* ไอโซเลท HC1-8 ให้ผลยับยั้งได้ดีที่สุดทั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ และ *Streptomyces* ไอโซเลท PY6-3 ให้ผลยับยั้งยีสต์ได้ดีที่สุด และปีต่อมา วันวิสาข์ (2546) ทำการแยกแอคติโนมัยซีสเอนโด-ไฟท์จากต้นข้าวบนอาหาร IMA-2 พบว่าสามารถแยกได้ 16 ไอโซเลท โดยนำแอคติโนมัยซีสมาทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้แก่ *Pyricularia oryzae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* และ *Rhizoctonia solani* พบว่า *Streptomyces* ไอโซเลท MN2 มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราที่นำมาใช้ทดสอบได้ดีที่สุด และจากการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าวระยะต้นกล้า พบว่า *Streptomyces* ไอโซเลท MN2 สามารถยับยั้งโรคใบไหม้ของข้าวได้โดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบถูกทำลายน้อยกว่าต้นกล้าข้าวชุดควบคุม

หน้าที่และความสำคัญของแอคติโนมัยซีส

ในการศึกษาหน้าที่ของแอคติโนมัยซีสที่สำคัญมักเกิดจากแอคติโนมัยซีสที่อยู่ในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากเป็นกลุ่มที่เจริญเติบโตได้รวดเร็ว และพบว่ามีปริมาณมากในธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตาม แอคติโนมัยซีสที่หายากก็ยังเป็นกลุ่มที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีความสามารถหลากหลายบทบาทของแอคติโนมัยซีสได้แก่

1. การย่อยสลายอินทรียวัตถุ

แอคติโนมัยซีสในธรรมชาติซึ่งส่วนใหญ่มีถิ่นที่อยู่ในดิน มีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของอินทรียวัตถุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนประกอบของพืช และสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลาย ในช่วงที่มีอินทรียวัตถุในดินมากจะมีพวกแบคทีเรียและเชื้อราเจริญอยู่มากส่วนแอคติโนมัยซีสจะเจริญตามมาในภายหลัง เพราะแอคติโนมัยซีสเจริญเติบโตได้ช้าจะเจริญได้ดีต่อเมื่อจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งได้ลดปริมาณลงแล้ว โดยจะช่วยกันย่อยสลายสารพวกกรดอินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำตาลชนิดต่าง ๆ แป้ง ไขมัน และโปรตีน แอคติโนมัยซีสที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส และ เฮมิ-เซลลูโลส พบว่าเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* มากที่สุด และเป็นแอคติโนมัยซีสสกุลอื่นๆ ได้แก่ *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Nocardia* และ *Microbispora* (Alexander, 1977) นอกจากนี้ยังมีแอคติโนมัยซีสที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่อุณหภูมิสูง คือแอคติโนมัยซีสในสกุล *Thermomonospora* และ *Streptomyces* ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิสูง (Peczynska-Czoch and Mordarski, 1988)

สำหรับการย่อยสลายลิกนินในธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็นกิจกรรมของเชื้อราโดยเฉพาะเห็ดชนิดต่างๆ แต่ก็มีแอคติโนมัยซีสบางชนิดเท่านั้นที่สามารถย่อยสลายได้ คือสกุล *Streptomyces* และ *Micromonospora* ส่วนในกรณีไคตินพบว่า 90 เปอร์เซ็นต์ จะถูกย่อยสลายโดยแอคติโนมัยซีสในสกุล *Streptomyces* และ *Micromonospora* เช่นกัน แอคติโนมัยซีสส่วนใหญ่สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน และโปรตีนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยแอคติโนมัยซีสที่พบว่าสามารถย่อยสลายแป้ง และโปรตีนได้ดี เช่น *Streptomyces*, *Nocardia* และ *Micromonospora* เป็นต้น ส่วนการย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ พาราฟิน (paraffin) ฟีนอล (phenol) สเตอรอยส์ (steroid) และไพริมีดีน (pyrimidine) พบว่าเป็นกิจกรรมของแอคติโนมัยซีสในสกุล *Nocardia* มากกว่าสกุลอื่น ส่วนเชื้อในสกุล*Micromonospora* มีบทบาทในการย่อยสลาย ไคติน (chitin) เซลลูโลส (cellulose) กลูโคไซด์ (glucoside) เพนโตแซน (pentosane) และ ลิกนิน (lignin) (Alexander, 1977)

2. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม

แอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลขนาดใหญ่ ได้เข้ามามีความสำคัญทางอุตสาหกรรม แอคติโนมัยซีสที่สร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลน ที่ใช้ในอุตสาหกรรมที่สำคัญ คือ *Thermomonospora* และ *Streptomyces* ส่วนแอคติโนมัยซีสที่สร้างเอนไซม์ย่อยสลายไคตินที่สำคัญ ได้แก่ *S. griseus*, *S. antibioticus* และ *Amycolatopsis orientalis* (Peczynska-Czoch and Mordarski, 1988) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการผลิต thermostable glucoamylase โดย *Streptosporangium* sp. (Stamford *et al*., 2001) และผลิต thermostable α-amylase โดย *Nocardiopsis* sp. (Stamford *et al*., 2001) เพื่อนำไปใช้ในการย่อยแป้งในอุตสาหกรรมเอนไซม์ที่ได้สามารถทำงานได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ70 องศาเซลเซียส

นอกจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมแล้ว แอคติโนมัยซีสยังมีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษชนิดต่างๆ เช่น การย่อยสลาย aliphatic-aromatic copolyester โดย *Thermomonospora fusca* (Witt *et al*., 2001) และย่อยสลาย 1,4-dioxane โดย *Amycolata* sp. CB1190 (Kelley *et al*., 2001) เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตในรูปที่พืชนำไปใช้ได้

แอคติโนมัยซีสบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ เช่น สกุล *Nocardia* และยังมีแอคติโนมัยซีสที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ คือ *Frankia* (Alexander, 1977) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความสามารถของ *Streptosporangium* ที่แยกได้จากดินที่เป็นกรด ในการละลายหินฟอสเฟสให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ แอคติโนมัยซีสในกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดโดยการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งสามารถละลายหินฟอสเฟตได้ (Caroline, 1997)

4. ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ

แอคติโนมัยซีสเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และเภสัช-กรรม นอกจากนี้ยังผลิตสารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช รวมไปถึงสารต้านมะเร็ง และสารกดระบบภูมิคุ้มกัน (Waksman and Lechevalier, 1962; Goodfellow *et al*., 1988 และ Lazzarini *et al*.,2000) จากข้อมูลของ Antibiotic Literature Database พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างโดยจุลินทรีย์ทั้งหมด 23,000 ชนิด มาจากเชื้อรา 42 เปอร์เซ็นต์ *Streptomyces* 32.1 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียอื่นๆ 10.8 เปอร์เซ็นต์ และแอคติโนมัยซีสที่หายาก 15.1 เปอร์เซ็นต์ ถ้าพิจารณาเฉพาะสารต่อต้านจุลชีพที่มีอยู่ประมาณ 8,000 ชนิด พบว่ามีการผลิตมาจาก *Streptomyces* 45.6 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา 21.5 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรีย 16.9 เปอร์เซ็นต์ และแอคติโนมัยซีสที่หายาก 16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็น Micromonosporaceae 38.1 เปอร์เซ็นต์, Pseudonocardiaceae 15 เปอร์เซ็นต์, Thermomonosporaceae 14 เปอร์เซ็นต์, Nocardia 11 เปอร์เซ็นต์, Streptosporangiaceae 6 เปอร์เซ็นต์, Nocardioides 2.6 เปอร์เซ็นต์ และอื่นๆ อีก 13.3 เปอร์เซ็นต์ (Lazzarini *et al*., 2000)

สารปฏิชีวนะที่พบส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยซีสในสกุล *Streptomyces* หลายชนิด ซึ่งได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น ampicillin และ penicillin-N โดยมีโครงสร้างเป็นวงเบตา-แลคแทม (β-lactam) ที่มีสมบัติยับยั้งการสร้างเพปทิโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่า *S. clavuligerus* สามารถผลิต Clavams (Muller *et al*., 1983) ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบตาแลคแทมเมส (β-lactamase) ที่ผลิตโดย Staphylococci และแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน streptomycin ที่ผลิตโดย *S. griseus* (Herzog, 1964) และ neomycin ที่ผลิตโดย *S. fradiae* (Sasarman *et al*., 1964) ซึ่งออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบชนิดแท่ง และกลมบางชนิด รวมถึงแบคทีเรียแกรมบวกชนิดกลมบางประเภท และยังมีผลต่อ *Mycobacterium tuberculosis* ด้วย สารที่มีสมบัติต่อต้านเชื้อรา ได้แก่ nystatin, polyoxin และ anthracycline สำหรับ anthracycline นอกจากเป็นสารต่อต้านเชื้อราแล้วยังเป็นสารต่อต้านมะเร็งได้ด้วย โดยจะไปยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองดีเอ็นเอได้ (Goodfellow *et al*., 1988) สารต่อต้านเชื้อรา และยีสต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่พบใน *Streptomyces* ส่วนใหญ่เป็นสารพวก polyene (Ball *et al*., 1957) มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อรา และยีสต์ แต่มักไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Norman *et al*., 1972) ซึ่งมีกลไกในการเข้าทำลายเชื้อรา และยีสต์ได้โดยเข้าจับกับ sterol ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ มีผลทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ เซลล์จึงไม่สามารถดำรงชีพอยู่ได้ (Hamilton-Miller, 1973) โดยสารต่อต้านเชื้อราที่พบได้ใน *Streptomyces* มีหลายชนิด เช่น blasticidin S ซึ่งผลิตโดย *S. griseochromogens* (Takeuchi *et al*., 1958) kasugamycin ผลิตโดย *S. kasugaensis* (Sato, 1983) และ polyoxin D ผลิตโดย *S. cacaoi* var. *asoensis* (Isono and Suzuki, 1979) เป็นต้น

5. ความสามารถในการนำไปควบคุมศัตรูพืช

มีการใช้แอคติโนมัยซีสมาใช้ควบคุมเชื้อที่ทำให้เกิดโรคกับพืช เช่น *Streptomyces lydicus* WYEC108 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่มีสมบัติในการต่อต้านเชื้อราจึงมีการนำมาใช้ควบคุมเชื้อราโรคพืชอย่างกว้างขวาง นอกจากเอนไซม์ไคติเนสแล้ว แอคติโนมัยซีสชนิดนี้ยังสามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อรา และสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ ดังนั้นจึงมีการใช้ แอคติโนมัยซีสชนิดนี้ในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับราก และเมล็ดของพืช (Mahadevan and Crawford, 1997) จากการศึกษา *Streptomyces* sp. ที่อาศัยอยู่กับรากพืชในกลุ่ม alfalfa สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ป้องกันการเกิดโรคใบจุดของพืชในกลุ่มนี้ ดังนั้นจึงได้นำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชอื่นๆ ที่เกี่ยวกับระบบราก (Samac *et al*., 2003) และนอกจากนี้ยังมีการศึกษา *Streptoverticillium albireticculi* ซึ่งมีสมบัติในการต่อต้านเชื้อราก่อโรคที่อยู่ในดิน เช่น *Rhizoctonia solani*, *Phytopthora cinnamomi* และ *Fusarium oxysporum* เป็นต้น ซึ่งมีการศึกษาเพื่อนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชต่อไป (Park *et al*., 2002) ในขณะที่ วชิร (2544) ได้ทำการคัดแยกแอคติโนมัยซีสที่สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อ *Colletotrichum* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรค anthracnose ในพืชพบแอคติโนมัยซีสที่มีสมบัติดังกล่าว 9 สายพันธุ์ โดยเป็น *Streptomyces* ทุกสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีการใช้ fungichomin ที่ผลิตโดย *Streptomyces padanus* ในการควบคุมโรคเน่าคอดินในกะหล่ำปลีซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (Shih *et al*., 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะ หมายถึง สารประกอบที่ผลิตหรือสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งอาจเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา หรือ แอคติโนมัยซีส สารที่ผลิตได้นี้สามารถยับยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตของจุลชีพกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งหรือมีฤทธิ์ไปทำลายจุลชีพกลุ่มนั้นๆ ได้ (มาลิน, 2540)

สารปฏิชีวนะเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์

ยับยั้งการเจริญเติบโต หรือฆ่าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น *Penicillium notatum* ผลิต penicillin, *Cephalosporium acremonium* ผลิต cephalosporin และ *Streptomyces griseus* ผลิต streptomycin ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะสังเคราะห์สารชนิดต่างๆ ขึ้น ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ primary metabolite และ secondary metabolite สาร primary metabolite ถูกสร้างขึ้นในช่วง primary metabolism เป็นช่วงที่มีการสังเคราะห์สารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต เช่น deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, protein, lipid และ polysaccharides ปฏิกิริยาต่างๆ ของ primary metabolism มีความสมดุลและไม่มีการสะสม สำหรับสาร secondary metabolite เป็นสารที่ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญ ส่วนใหญ่จะสร้างในช่วง late log phase จนถึงช่วง stationary phase ของการเจริญ โดยสารที่สร้างขึ้นนี้ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ สารปฏิชีวนะถูกผลิตขึ้นในช่วงนี้จะมีประโยชน์ เพราะยับยั้งการสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่บางชนิดในเซลล์ได้ จึงช่วยรักษาพลังงานส่วนหนึ่งไว้ นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์อื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นนี้จะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดได้ จึงช่วยให้จุลินทรีย์ที่ผลิตสามารถแข่งขันเพื่อมีชีวิตรอดอยู่ได้ในธรรมชาติ (มาลิน, 2540) จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น สารปฏิชีวนะเป็นหนึ่งในsecondary metabolite ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ดังนั้นจึงพบว่ามีเชื้อเพียงบางกลุ่มเท่านั่นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมี 2 ชนิด คือ

1. ชนิดที่เป็นพิษเฉพาะต่อเชื้ออื่น (xenotoxic antibiotic) สารปฏิชีวนะพวกนี้จะต้านเชื้อกลุ่มอื่นเท่านั้น เช่น cycloheximide ที่ผลิตจากเชื้อแบทีเรีย *B. griseus* ไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย แต่มีฤทธิ์ต่อเซลล์ eukaryotic เช่น เชื้อรา โปรโตซัว และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ขณะที่ penicillin G ซึ่งผลิตจากเชื้อรา *P. chrysogenum* จะมีฤทธิ์เฉพาะต่อเชื้อเชื้อแบคทีเรีย

2. ชนิดที่เป็นพิษต่อตัวเอง (autotoxic antibiotic) โดยสารปฏิชีวนะพวกนี้สามารถเป็นพิษต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้นได้เช่นเดียวกับที่มีพิษต่อเชื้อชนิดอื่น เช่น streptomycin ซึ่งผลิตจาก *Streptomyces griseus* เชื้อที่ผลิตนี้ไวต่อ streptomycin แต่ความไวนี้เกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาหนึ่งของการเจริญ ดังนั้น จุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะลักษณะนี้จึงต้องหลีกเลี่ยงการทำลายตัวเองโดยสร้างกลไกการต่อต้านขึ้นในช่วงขณะผลิตสาร

สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นเป็นสารเมทาบอไลต์ขั้นที่สอง (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารเมทาบอไลต์ที่ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญ ส่วนใหญ่จะสร้างในช่วง idiophase (ภาพที่ 4) ของการเจริญ จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นจึงพบว่ามีเชื้อเพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้างสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่มักเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ในระยะแรกเชื้อมีการปรับตัวและมีการแบ่งเซลล์อย่างช้าๆ (lap

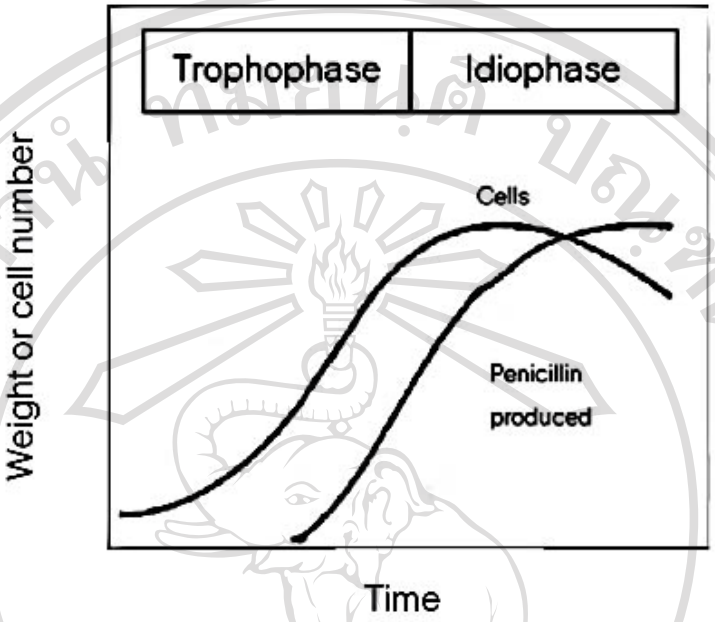
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

phase) ต่อมาเชื้อจะมี metabolism และอัตราการเจริญสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (acceleration phase) จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดของการเจริญ (exponential phase) อาหารถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ปริมาณอาหารที่ลดลงเป็นผลให้เกิดการสะสม biochemical intermediate บางชนิด ทำให้อัตราการเจริญถูกจำกัด (deceleration phase) เชื้อเริ่มมีการเปลี่ยน biochemical pathway ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารปฏิชีวนะออกมา (Isaac and Jennings, 1995) สารปฏิชีวนะที่ถูกผลิตขึ้นในช่วงนี้มีประโยชน์เพราะสามารถยับยั้งการสร้างสารโมเลกุลใหญ่บางชนิดในเซลล์ได้ อันจะช่วยรักษาพลังงานส่วนหนึ่งไว้ นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นจะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดลงไปได้ จึงช่วยยืดชีวิตของจุลินทรีย์ให้อยู่นานยิ่งขึ้น สารปฏิชีวนะที่แอคติโนมัยซีสสร้างขึ้นนี้มีการสะสมอยู่ที่บริเวณ mycelium หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรืออาจพบได้ทั้งสองแห่ง สารนี้มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถละลายน้ำได้ (water soluble antibiotic) และที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ (water insoluble antibiotic) เช่น สารปฏิชีวนะในกลุ่ม polyene จัดเป็นสารปฏิชีวนะที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ โดยมักพบในรูปของผลึกสะสมที่บริเวณผิวของเซลล์หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ คุณสมบัติที่ปรากฏมักจะขึ้นอยู่กับชนิดของแอคติโนมัยซีสและสภาพแวดล้อมที่แอคติโนมัยซีสเจริญ สำหรับบทบาทหน้าที่ที่แท้จริงของสารปฏิชีวนะยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัด (ชนิกานต์, 2544) มีข้อเสนอแนะมากมายเกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ของปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้น ซึ่งได้แก่

1. สารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นเป็นวิวัฒนาการอันหนึ่งของเชื้อในการดำรงชีพ
2. เป็นของเสียที่เชื้อปล่อยออกมาในขบวนการ metabolism
3. เป็นแหล่งที่เชื้อใช้สำหรับเก็บอาหารหรือเป็นสารที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มสปอร์ของเชื้อ
4. เป็นผลิตผลที่ได้จากการแตกย่อยของสารประกอบที่มีโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์
5. สารปฏิชีวนะมีบทบาทในการฆ่า หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ในธรรมชาติ อันเป็นการแก่งแย่งเพื่อความอยู่รอดของเชื้อ
6. การที่เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะ ถือเป็นกลวิธีหนึ่งที่จะรักษากลไกการทำงานของเซลล์ให้เป็นไปอย่างเดิมในระหว่างที่เชื้อไม่สามารถจะเจริญต่อไปได้เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม
7. การผลิตสารปฏิชีวนะเป็นวิธีการหนึ่งที่จะหลีกเลี่ยงมิให้เซลล์ของเชื้อตายอันเนื่องมาจากความไม่สมดุลย์ของการเจริญเติบโต
8. เป็นกลไกในการกำจัดสารพิษของเชื้อ
9. ช่วยในการขนส่งพวกโลหะเข้าสู่เซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. ระงับการงอกของสปอร์ของตัวเชื้อเอง



ภาพที่ 4 การสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบ batch culture (Tortora *et al.,* 1992)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ดรุณี, 2541)

1. แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อเชื้อในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน อัตราการเมตาบอไลซ์อาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน มักจะมีอิทธิพลต่อการสร้างมวลเซลล์หรือผลผลิตทั้งสาร primary metabolite และ secondary metabolite ในการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อ พบว่าถ้าให้แหล่งคาร์บอนที่เชื้อสามารถเมตาบอไลซ์ได้อย่างรวดเร็วในปริมาณที่สูงจะทำให้เชื้อเจริญได้อย่างรวดเร็ว แต่อัตราการสร้างสารปฏิชีวนะจะต่ำ (สมใจ, 2537) ในการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้างสารปฏิชีวนะนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและชนิดของสารปฏิชีวนะที่เชื้อสามารถสร้างได้

2. แหล่งไนโตรเจน

เชื้อแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจนได้แตกต่างกัน ในการใช้แหล่งไนโตรเจนในขบวนการหมักเพื่อการสร้างสารปฏิชีวนะ ถ้าใช้สารประกอบไนโตรเจนที่เชื้อสามารถเมตาบอไลซ์ได้อย่างรวดเร็ว อาจทำให้มีการสร้างสารปฏิชีวนะได้น้อย โดยทั่วไปจึง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นิยมใช้แหล่งไนโตรเจนที่เชื้อเมตาบอไลซ์ได้อย่างช้า ๆ เช่น การสร้างสาร polyene มักนิยมใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากมีโปรตีนซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อย่อยสลายและดูดซึมได้ช้า นอกจากนี้ปริมาณของไนโตรเจนที่นำมาใช้จะต้องได้ส่วนกับคาร์บอน คือ ต้องศึกษาหาค่าของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมด้วย

3. อนินทรีย์ฟอสเฟต

ถ้ามีปริมาณสูงทำให้เชื้อเจริญดี แต่การสร้างสารปฏิชีวนะจะลดลง จึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะ

4. เกลืออนินทรีย์

เกลืออนินทรีย์ที่นิยมใช้เพื่อให้เชื้อมีการสร้างสารปฏิชีวนะได้ในปริมาณที่สูง ได้แก่ NaCl แต่ก็ต้องขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและความเข้มข้นที่ใช้ด้วย ถ้าใช้ในปริมาณที่สูงบางครั้งอาจไปมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

5. โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย

โลหะมีความจำเป็นเนื่องจากเป็น activator ของเอนไซม์ในการสร้างสารปฏิชีวนะ ได้แก่ Mn, Fe และ Zn

6. สารตั้งต้น

การเติมสารตั้งต้นลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้เชื้อสร้างสารปฏิชีวนะได้เพิ่มขึ้น

7. ตัวยับยั้ง

ส่วนใหญ่ของการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ จะถูกยับยั้งด้วยสารปฏิชีวะที่เชื้อนั้นๆ สร้างขึ้นมา เรียกว่าเป็น feedback ของ end product ซึ่งอาจทำการหลีกเลี่ยงได้โดยการทำลายพันธุ์ที่เป็น feedback resistant mutants

8. สารชักนำ

เป็นสารที่ช่วยให้มีการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อ เช่น การผลิต streptomycin จาก *Streptomyces griseus* พบว่าสายพันธุ์ที่ผลิต streptomycin ได้ดี จะผลิต A-factor ที่มีบทบาทในการกระตุ้นการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะของเชื้อ

9. ปัจจัยอื่น ๆ

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ membrane permeability ซึ่งอาจทำให้การผลิตเพิ่มหรือลดได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ (ดวงพร, 2537)

1. ความเป็นกรดด่างของอาหารมีผลต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อ ดังนั้นจะต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ เช่น $CaCO_3$, K_2HPO_4 หรือ $NaHCO_3$

2. อุณหภูมิ เป็นสิ่งที่มีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อ เพราะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้ออาจจะไม่ใช่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ

3. ออกซิเจน การสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อทุกชนิดมีความต้องการออกซิเจน แต่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำพบว่ามีปริมาณต่ำ จึงจำเป็นต้องมีการให้อากาศในอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้างสารปฏิชีวนะ

4. ปัจจัยอื่นๆ เช่น ความดันภายในถังหมัก ค่า redox และ แสง เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved