

รายงานว่ เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท 28, 152 และ 157 ที่แยกได้จากดินเกษตรกรรม มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* และ *Fusarium solani* ตามลำดับ ถึงแม้ว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. บางสายพันธุ์ เช่น *S. fradiae*, *S. pristinaespiralis*, *S. natalensis* และ *S. coelicolor* จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้ เช่น *Xanthomonas campestris* และ *Rastonia solani* เป็นต้น (Bibb, 2005) แต่การทดลองในครั้งนี้เชื้อ *Streptomyces* spp. ทุกไอโซเลทไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ได้

5.1.2 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitinase ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

Streptomyces spp.

Chitinase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเอนไซม์ Chitinase จะทำหน้าที่ย่อยสลายไคตินที่ผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อราได้รับความเสียหายและเกิดการรั่วไหลของๆ เหลวภายในเซลล์ (Kyoung และคณะ, 2002) โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitinase ภายในเซลล์และปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) เมื่อเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นไปสัมผัสกับผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยตรงและก่อให้เกิดความเสียหายกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ (Hayat และคณะ, 2010) จากการศึกษาการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitinase ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าไอโซเลท J2 มีขนาดวงใสที่สร้างบนอาหาร Chitin selective agar กว้างที่สุด รองลงมาคือ ไอโซเลท K1, F2, F3 และ I14 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลท J2 มีการสร้างเอนไซม์ Chitinase ได้สูงกว่าไอโซเลทอื่น Choudhary และคณะ (2014) ทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitinase ของเชื้อ *Streptomyces exfoliatus* MT9 บนอาหารแข็งที่ผสม colloidal chitin พบว่า *Streptomyces exfoliatus* MT9 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitinase โดยการใช้ chitin เป็นแหล่งพลังงาน นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Baharlouei และคณะ (2011) พบว่าเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท 422 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitinase บนอาหารแข็ง minimal chitin- agar ได้เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามการทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ Chitinase ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. เป็นการทดสอบเบื้องต้นเพื่อดูว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ใช้ในการทดลองนี้ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitinase มากน้อยเพียงใด จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase เพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitinase และคัดเลือกไอโซเลทที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ Chitinase สูง เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

5.1.3 กิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp.

ปัจจุบันพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* หลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ Chitinase ได้ Gupta และคณะ (1995) รายงานว่า *Streptomyces viridificans*, *S. aureofaciens*, *S. coelicolor*, *S. glaucescens*, *S. kanamycitis*, *S. lividans*, *S. parvies* และ *S. venezuelae* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitinase โดยเฉพาะ *Streptomyces viridificans* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ Chitinase การผลิตเอนไซม์ Chitinase ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในกระบวนการหมัก ซึ่งออกซิเจนมีผลต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *Streptomyces* spp. (Bartholomew และคณะ, 1950) ชนิดของสายพันธุ์ และช่วงเวลาที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase สูงสุด ก็ต่างกัน เช่น *Streptomyces lydicus* WYEC108 และ *Streptomyces lividans* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase สูงที่ชั่วโมงที่ 100 และ ชั่วโมงที่ 72 ตามลำดับ (Mahadevan และ Crawford; 1997, Neugebauer และคณะ, 1991) Tang-um และ Niamsup (2012) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ Chitinase ของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* พบว่า *Streptomyces* strain P4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase สูงในช่วง 6 วันหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส Narayana และ Vijayalakshmi (2009) พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. ANU 6277 จะเริ่มผลิตเอนไซม์ Chitinase ในชั่วโมงที่ 24 และเพิ่มสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 60 ของการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ pH 6 นอกจากนี้ Hassan และคณะ (2014) ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ Chitinase โดยพบว่าเชื้อ *Streptomyces glauciniger* WICC-A03 มีการแสดงออกของยีนที่ผลิตเอนไซม์ Chitinase ในชั่วโมงที่ 114 ค่า pH เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ Chitinase จากการศึกษาของ Kim และคณะ (2003) พบว่าช่วง pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ Chitinase ที่เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. M20 ผลิตขึ้นจะอยู่ในช่วง pH 5.0-6.0 และจะคงตัวที่ pH 4.0-8.0 ในขณะที่ Gupta และคณะ (1995) รายงานว่าเอนไซม์ Chitinase ที่เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces viridificans* ผลิตขึ้นสามารถคงที่ได้ดีที่ pH 3-7.5 นอกจากนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมก็มีส่วนช่วยให้เอนไซม์ Chitinase คงประสิทธิภาพ โดยเอนไซม์ Chitinase จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และประสิทธิภาพจะค่อยๆ ลดลงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และจะไม่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Kim และคณะ, 2003) จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ที่เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ผลิตขึ้น พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase สูงในช่วงชั่วโมงที่ 16-24 ทำให้เห็นว่าสายพันธุ์ของเชื้อ *Streptomyces* sp. มีผลต่อช่วงเวลาในการผลิตเอนไซม์ Chitinase

5.1.4 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. (culture filtrate) ในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตระกูลกะหล่ำ

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitinase และปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ดังนั้นเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. พบว่าไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ได้ อาจเป็นเพราะปริมาณเอนไซม์ที่เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ผลิตขึ้นมีความเข้มข้นน้อย หรือเกิดจากเอนไซม์เกิดการแพร่จากกระดวยกรองลงสู่แผ่นวุ้นในจานอาหาร ทำให้ความเข้มข้นลดลงจนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ได้ นอกจากนี้ระยะเวลาในการบ่มก็มีส่วนสำคัญเนื่องจากประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราของน้ำเลี้ยงเซลล์ *Streptomyces* spp. จะลดลงเมื่อใช้เวลาในการบ่มจานอาหารที่ใช้ทดสอบเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Prapagdee และคณะ, 2008)

5.2 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรคเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ในพืชตระกูลกะหล่ำในระดับโรงเรือน (Greenhouse)

กลไกในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. คือความสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ต่างๆ ได้ เช่น การผลิตสาร antibiotic การผลิตเอนไซม์ (Chitinase และ β -1,3-Glucanase) เพื่อออกมาย่อยผนังเซลล์เชื้อราสาเหตุโรคพืช และสารยับยั้งการเจริญเชื้อราอื่นๆ เช่น Nikomycin, Polyoxin และ Miltiomycin เป็นต้น ปัจจุบันเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ถูกนำมาผลิตขึ้นเพื่อนำมาใช้ควบคุมโรคเน่าคอดินโดยมีชื่อทางการค้าแตกต่างกันออกไป เช่น Mycostop® ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces griseoviridis* K61 และ Actinovate® ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC108 (Goudjal และคณะ, 2014) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าอาจจะมีเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. อีกหลายสายพันธุ์ที่สามารถนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืชในรูปทางการค้าได้ ซึ่งต้องใช้เวลาในการพัฒนาต่อไป

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท F3 ในการควบคุมโรคเน่าคอดินสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ของต้นกวางตุ้งที่ปลูกด้วยระบบการปลูกแบบใช้ดิน เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท F3 สามารถควบคุมโรคเน่าคอดินและลดความรุนแรงของโรคเน่าคอดินได้ เมื่อใส่เชื้อ *Streptomyces* sp. ก่อนหรือหลังการปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. จึงสามารถ

กล่าวได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท F3 มีความสามารถในการควบคุมโรคเน่าคอดินได้ในขณะที่ยังไม่เกิดโรคหรือเกิดโรคไปแล้ว โดยกลไกของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรคเกิดจากการแย่งแย่งสารอาหารกับเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. การผลิตเอนไซม์ Chitinase และ Glucanase ออกมาเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. นอกจากนี้ ปัจจัยที่ส่งเสริมให้กระบวนการควบคุมโรคเน่าคอดินเป็นไปได้ด้วยดีคือ สภาพแวดล้อม ค่าความเป็นกรด-ด่าง ภายใต้อุณหภูมิภายในดิน ลักษณะของดิน ปริมาณน้ำ และสารอาหารภายในดิน เป็นต้น (Goudjal และคณะ, 2014) ซึ่งสอดคล้องกับ Sabaratnam และคณะ (2002) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรคเน่าคอดินสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในดินมะเขือเทศ โดยพบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท Di-944 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าคอดินได้ใน 10 วัน เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase, β -1,3-Glucanase และ Phenylalanine ammonia lyase ในผักกวางตุ้งที่ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. เพียงอย่างเดียวพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้มีค่าสูงกว่าต้นกวางตุ้งที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. มีความสามารถในการกระตุ้นเอนไซม์ PAL, Chitinase และ β -1,3-Glucanase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค Kurth และคณะ (2014) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* sp. AcH 505 ต่อการควบคุมโรคราแป้งในต้นโหระพา พบว่า *Streptomyces* sp. AcH 505 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราแป้งและสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ได้อีกด้วย แต่ยังไม่มียารายงานถึงกลไกของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ต่อการกระตุ้นเอนไซม์ Chitinase และ β -1,3-Glucanase ในพืช

เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท F3 มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคเน่าคอดินในผักกวางตุ้งที่ปลูกด้วยระบบไฮโดรโปนิคส์ แต่ความรุนแรงของการเกิดโรคที่ลดลงนี้ไม่เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค (Chitinase, β -1,3-Glucanase และ Phenylalanine ammonia lyase) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการลดลงของโรค อาจเป็นผลเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดอื่นๆ เช่น peroxidase, superoxide dismutase เป็นต้น นอกจากนี้พบว่าต้นกวางตุ้งที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรค มีกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งโดยปกติแล้วเมื่อพืชถูกเชื้อราสาเหตุโรคพืชจะเข้าทำลาย พืชจะมีกลไกการป้องกันตัวเองด้วยการชักนำโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานของพืช (Pathogenesis-related proteins, PR proteins) เช่น การผลิตเอนไซม์ Chitinase และ β -1,3-Glucanase โดยกลไกการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชของเอนไซม์ Chitinase จะทำงานร่วมกับเอนไซม์ β -1,3-Glucanase ไปย่อยสลายไคตินและกลูแคน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราที่บริเวณ hyphal tip ทำให้ได้สาร oligomer ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น signal molecule ส่งสัญญาณให้พืชเกิดความต้านทานทั้งระบบ (Induced Systemic Resistance, ISR) (Fernando และ Linderman,

1994; van Loon และ van Strien, 1999; Collinge และคณะ, 1993) ซึ่งโครงสร้างของผนังเซลล์เชื้อรา ส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วย Chitin, β -1,3-Glucan, β -1,6-Glucan, Mannan, Protein และ ส่วนประกอบอื่นๆ โดยเอนไซม์ Chitinase จะไปย่อยบริเวณปลายของสาย β -1,4-linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) และเอนไซม์ β -1,3-Glucanase จะไปตัดที่สาย 1,3 β -D-Glucocidic ในสาย β -1,3-Glucan (Collinge และคณะ, 1993; Adam, 2004) เอนไซม์ PAL เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ กลไกการป้องกันตัวของพืช โดยเป็นกุญแจในการควบคุมการสังเคราะห์ Phenolic (Cheng และ Breen, 1991) และกระตุ้นการผลิตสาร Phytoalexins ภายในพืช ซึ่งสาร Phytoalexins มีส่วนสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายพืช (Kuniga, 2004) นอกจากนี้เมื่อพืชถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อราสาเหตุโรคพืช พืชจะผลิตสารประกอบ Phenolic ออกมาอย่างรวดเร็วและเกิดการ Polymerization ที่บริเวณผนังเซลล์ที่ถูกเชื้อราสาเหตุโรคพืชเข้าทำลาย (Matern และ Kneusel, 1988) นอกจากนี้ Mauch และคณะ (1988) รายงานว่าเมื่อทำการปลูกเชื้อ *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* ให้กับต้นถั่วพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase และ β -1,3-Glucanase มีค่าสูงขึ้นหลังจากการปลูกเชื้อ ในขณะที่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยในชุดควบคุม Xue และคณะ (1998) ทำการทดสอบความสามารถในการกระตุ้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทาน คือ β -1,3-Glucanase และ Chitinase ด้วย Nonpathogenic Binucleate *Rhizoctonia* (BNR) เปรียบเทียบกับต้นถั่วที่ปลูกเชื้อราก่อโรค *Rhizoctonia solani* Kühn พบว่าต้นถั่วที่ปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-Glucanase และ Chitinase สูงกว่าต้นถั่วที่ปลูกด้วย BNR นอกจากนี้ Chen และคณะ (2000) ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugate* 13 และ *Pseudomonas aureofaciens* 63-28 ต่อการควบคุมโรคโคนเน่าสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* พบกิจกรรมของเอนไซม์ PAL มีค่าสูงขึ้นหลังจากการปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* ไปแล้ว 11 วัน