

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas*

เป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในกลุ่มโปรคาริโอต (Prokaryote) มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ดังนี้ (Garrrity and Holt, 2001)

Domain:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Class:	Gammaproteobacteria
Order:	Pseudomonadales
Family:	Pseudomonadaceae
Genus:	<i>Pseudomonas</i>

จากหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 2 ปีพ.ศ. 2001 จัดสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโปรคาริโอต(prokaryote) เป็น 2 โดเมน (domains) ได้แก่ Archaea และ Bacteria จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA เชื้อ *Pseudomonas* จัดอยู่ใน โดเมนแบคทีเรีย การจัดกลุ่ม (classification) และการจัดจำแนกชนิด (identification) ของแบคทีเรียต้องอาศัยคุณสมบัติหลายอย่างเช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่รูปร่าง รูปแบบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การติดสีย้อมแกรม เป็นต้น ลักษณะทางสรีรวิทยา ได้แก่โครงสร้างทางเคมีของเซลล์ ความต้องการอาหาร กระบวนการเมตาโบลิซึมภายในเซลล์ (ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน เป็นต้น) ความต้องการทางกายภาพ (ความต้องการออกซิเจน อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง) และคุณสมบัติของดีเอ็นเอ (ได้แก่ การหาปริมาณของกัวนีน (guanine: G) (cytosine: C) ขนาดของจีโนม (genome) ความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในการจับคู่กันใหม่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและไม่เหมาะสม ตลอดจนความสามารถในการทนต่อความร้อน เป็นต้น ซึ่งการใช้คุณสมบัติของดีเอ็นเอสามารถจำแนกแบคทีเรียได้ถึงระดับชนิด (species) (นันทนา, 2537)

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* มีลักษณะเป็น รูปท่อนตรง หรือ โค้งเล็กน้อย (ไม่มีลักษณะเป็นเกลียว) มีขนาด 0.5 – 1.0 x 1.5 – 5.0 ไมโครเมตร ติดสีกรัมลบ (gram negative bacilli) ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ (polar flagella) ซึ่งมีอย่างน้อยที่สุด 1 เส้น บางสายพันธุ์เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลาด้านข้าง (lateral flagella) ไม่สร้างสปอร์(non – spore forming) มีค่าโมลเปอร์เซ็นต์ G + C ของ DNA เท่ากับ 58-68 เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นทั้งแหล่งพลังงานและแหล่งของอิเล็กตรอน (chemoorganotrophs) สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่ไวต่อยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน (penicillin sensitivity) ต้องการอากาศ (strictly aerobes) ใช้ออกซิเจนเป็น

ตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) ในกระบวนการเมตาโบลิซึม สร้างพลังงานแบบออกซิเดทีฟ ฟอสโฟไรเลชัน (oxidative phosphorylation) จึงให้ผลบวกกับการทดสอบเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส (cytochrome oxidase test) และในสถานะที่ไม่มีอากาศจะไม่สามารถหมัก (fermentation) น้ำตาลกลูโคส ดังนั้นเมื่อทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคสแบบออกซิเดทีฟ หรือเฟอร์เมนเททีฟ (oxidative-fermentative test หรือ O-F test) จึงให้ผลเป็นแบบออกซิเดทีฟ (oxidative) แบคทีเรียกลุ่มอื่นที่เป็น แกรมลบ ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสมีหลายสกุลได้แก่ *Alcaligenes* (*Achromobacter*), *Acinetobacter*, *Agrobacterium* และ *Moraxella* เป็นต้น (นันทนา, 2537) ซึ่งแบคทีเรียสกุลเหล่านี้มีลักษณะบางอย่างที่เหมือนกันและบางอย่างก็แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ ในกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลกลูโคส

Test	<i>Agrobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Alcaligenes</i>
shape	rod	rod	coccus	rod / coccus	rod / coccus
O-F glucose	oxidizer	oxidizer	oxidizer	nonoxidizer	nonoxidizer
Fluorescence diffusible pigment	-	V	-	-	-
Motility in hanging drop	+	+	-	-	+
Polar flagellar	-	+	-	- 	-
Penicillin sensitivity	-	-	-	+	-
Oxidase test	+	+	-	+	+

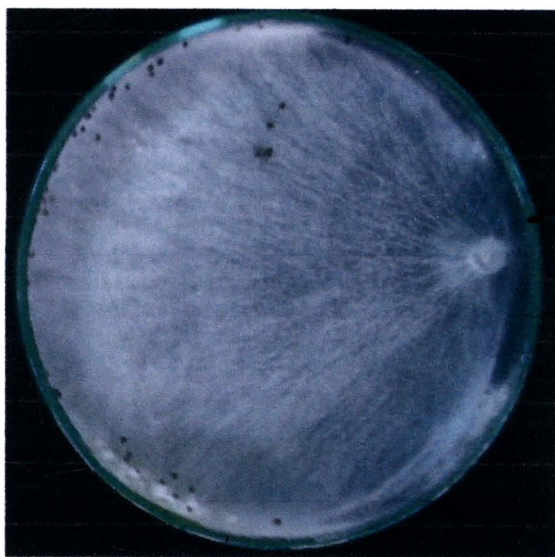
นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* ยังมีความใกล้ชิดกับแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonad ได้แก่ *Xanthomonas* และ *Zoogloea* เป็นต้น กล่าวคือ เป็นรูปท่อนตรง หรือโค้ง คีด สีแกรมลบ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ (polar flagella) ซึ่งมีอย่างน้อยที่สุด 1 เส้น ไม่สร้างสปอร์

แบคทีเรียใน Family Pseudomonadaceae บางชนิดสามารถก่อโรคในคนได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียใน Family Enterobacteriaceae แต่มีข้อแตกต่างกันคือ Family Pseudomonadaceae เป็น

แบคทีเรียที่ไม่หมักย่อยน้ำตาลกลูโคส ให้ผลบวกกับการทดสอบเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส ซึ่งให้ผลตรงข้ามกับ Family Enterobacteriaceae ที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส และให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส

2.2 เชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

สาเหตุของโรคโคนและลำต้นเน่าของมะเขือเทศ (collar rot and stem rot disease of tomato) จัดอยู่ใน Phylum Deuteromycota Class Deuteromycetes Form – class Agonomycetes เชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในชิ้นส่วนพืชหรือในอาหารสังเคราะห์ เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะเส้นใยจะเป็นสีขาวคล้ายเส้นไหม การเจริญของเส้นใยในพืชหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะเหมือนกันคือเส้นใยจะเจริญแผ่ออกไปคล้ายพัด (รูปที่ 2.1) *S. rolfsii* เป็นเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์สามารถอยู่ข้ามฤดูได้ในดินในรูปของสเคลอโรเตีย (sclerotia) ซึ่งเป็นเส้นใยที่มีชีวิตอัดกันแน่นจนเป็นเม็ดแข็งขนาดเท่าเม็ดผักกาด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง อยู่ระหว่าง 0.5-2.0 มม. เชื้อราจะสร้างเม็ด สเคลอโรเตีย หลังจากเส้นใยเจริญได้ประมาณ 4-7 วัน และจะถูกเปลี่ยนเป็นสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มเกือบดำอย่างรวดเร็ว สเคลอโรเตียอาจอยู่อย่างอิสระที่ผิวดิน หรืออยู่บนซากพืช อาจถูกฝังลึกลงไปใต้ดินทำให้อยู่ข้ามฤดูได้ประมาณ 1 ปี ดังนั้นการไถพรวนดินจนลึกเป็นกลวิธีหนึ่งที่จะควบคุมการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ได้ สเคลอโรเตียที่พบใช้เป็นลักษณะ(sign) ในการจำแนกโรคนี้ออกจากโรคลำต้นเน่า และโรคเหี่ยวที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อชนิดอื่นๆได้



รูปที่ 2.1 ลักษณะการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar

เชื้อรา *S. rolfii* จะเข้าทำลายพืชบริเวณโคนต้นระดับดินหรือใต้ผิวดินเล็กน้อย พืชจะแสดงอาการแผลแห้งตายรอบลำต้น บริเวณที่เชื้อเข้าทำลายจะพบเส้นใยของเชื้อราเป็นขุยหยาบสีขาวขึ้นคลุมแผล รอบโคนต้นระดับดินจะคอดและอาจพบเม็ดแข็งของสเคลอโรเตียขนาดเท่าเม็ดผักกาดขึ้นติดอยู่กับขุยสีขาวนี้ ถ้าเชื้อเข้าทำลายพืชระยะต้นกล้าหรือระยะต้นอ่อน ลำต้นจะคอดกึ่งและหักพับแล้วพืชจะแห้งตายในเวลาต่อมาเหมือนกับอาการโรค damping off ในกรณีที่เป็นพืชที่มีผลที่อยู่ชิดดินเช่น มะเขือเทศและพืชตระกูลแตง เมื่อถูกเชื้อชนิดนี้เข้าทำลายจะเกิดแผลยุบตัวลง ขอบแผลสีเหลืองผลจะเน่าอย่างรวดเร็ว มักพบเส้นใยและเม็ดสเคลอโรเตียขึ้นคลุมเต็มแผล การควบคุมเชื้อราชนิดนี้ทำได้โดยใช้สารเคมี การอบดินด้วยพลังแสงอาทิตย์ การควบคุมโดยชีววิธี (วีระศักดิ์, 2544) ตลอดจนการใช้สารเคมีผสมประสานกับเชื้อราปฏิปักษ์

มีรายงานการใช้เชื้อ *Pseudomonas* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช ดังนี้

Sela และคณะ, 2007 แยกเชื้อแบคทีเรีย จากวัว แพะ และแกะ ที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ จากนั้นทำการพิสูจน์ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* โดยนำโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร *Pseudomonas*-isolation-agar ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การคิดสีแกรมจากนั้นนำมาจัดจำแนกชนิดโดยใช้ ID 20 NE Kit (API; Bio Merieux SA, France), the BBL Crystal Identification System; Enteric ID Kit (BD BBL CRYSTAL; Becton Dickinson, Baltimore MD, USA). และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ oxidase test (Oxidase Identification Stick), carbohydrate fermentation (lactose, glucose and sucrose), indol test, urease test และ reduction of NH_3 to NH_2

Kwon และคณะ, 2003 แยกเชื้อ *Pseudomonas* strains จาก Korean agricultural soils และสร้าง Phylogenetic tree ของ Genus *Pseudomonas* โดยวิธี 16S rDNA sequence analysis นอกจากนี้ยังศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมี โดยการทดสอบ gram reaction, oxidase reaction, arginine dihydrolase, nitrate reduction, levan formation, hydrolysis of gelatin, starch, Tween 80, aesculin, catalase test, fluorescent pigment production, temperature tolerance, tolerance of salinity, utilization of carbon sources และ API 20 NE test kit

Ashorpoura และคณะ, 2008 แยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค canker ของต้นโอลีฟ (olives) ที่ทดสอบการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test) โดย Guilan province, Iran จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) สรีรวิทยา (physiology) และชีวเคมี (biochemistry) เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *P. syringae* pv. *syringae* โดยการทดสอบ Gram reaction, oxidative/fermentative test, production of fluorescent pigment, hypersensitive reaction (HR), oxidase test, levan formation, catalase, urease, gelatin liquefaction, litmus milk, salt tolerance (5%), and gas formation from glucose, arginine dehydrolase test hydrogen sulphide production, reducing substances from sucrose,

tyrosinase casein hydrolase, nitrate reduction, indole production, 2-keto gluconate oxidation lecitinase, starch hydrolysis, phenylalanine deaminase, esculin and Tween 80 hydrolysis, and optimal growth temperature, carbohydrate utilization และศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุล โดยวิธี PCR analysis