บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

มะม่วงเป็นไม้ผลที่ได้รับความสนใจจากเกษตรกรอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน เพราะเป็นพืชที่ปลูกง่าย สามารถขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิด ประกอบกับผลมีรสชาติดี สามารถรับประทานได้ทั้งผลดิบ ผลสุก กวน แช่อิ่ม ดอง ยำ หรือนำมาจิ้มน้ำพริกก็ได้ สามารถเก็บไว้รับประทานนอกฤดูกาลได้ (เฉลิมชัย, 2539) ซึ่งในปัจจุบันนี้ความต้องการผลสดของมะม่วงทั้งภายในและต่างประเทศต่างก็มีปริมาณสูงขึ้นเป็นอย่างมาก และมีแนวโน้มว่าจะมีการส่งออกมากขึ้นด้วย (มณฑาทิพย์, 2545) จากข้อมูลการส่งออกมะม่วงไปยังประเทศต่างๆ พบว่า ในแต่ละปีมีการส่งออกมะม่วงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และในปี 2550 มีการส่งออกมะม่วงถึง 10,265 ตัน คิดเป็นมูลค่า 249.49 ล้านบาท (สำนักบริหาร-การนำเข้าส่งออกสินค้าทั่วไป, 2550) ทำให้มะม่วงกลายเป็นไม้ผลเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง ดังนั้นจึงควรส่งเสริมให้มีการปลูกมะม่วงให้แพร่หลายยิ่งขึ้น เพื่อให้เพียงพอกับการบริโภคภายในประเทศและส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศ (สมรลักษณ์ และมาลินี, ไม่ระบุปีที่พิมพ์)

การปลูกมะม่วงในปัจจุบัน ไม่ว่าจะปลูกเพื่อขายในประเทศ หรือเพื่อส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ ปัญหาที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่งในการปลูกมะม่วงนอกเหนือจากการปฏิบัติดูแลรักษาในระยะต่างๆ ให้มะม่วงให้ผลผลิตมีคุณภาพและคุ้มค่าการลงทุนแล้ว คือ ปัญหาในการควบคุมและการป้องกันกำจัดโรคมะม่วง (สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย, 2545) ซึ่งโรคเหล่านี้สามารถเข้าทำลายในส่วนต่างๆ ตั้งแต่ราก ลำต้น กิ่ง ใบ ช่อดอก ผลอ่อน ผลสุก เมล็ด และต้นพันธุ์ โรคที่มักพบเป็นประจำในการปลูกมะม่วงของประเทศไทย มีหลายโรคด้วยกัน เช่น โรคแอนแทรคโนส โรคราแป้ง โรคราดำ โรคจุดสนิม โรคราสีชมพู โรคผลเน่า และโรคยางไหล เป็นต้น โดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงนี้นับเป็นโรคที่พบมากที่สุด และเป็นโรคที่สำคัญที่สุดเข้าทำลายในส่วนต่างๆ ของมะม่วง สามารถเกิดขึ้นได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของมะม่วง เกิดขึ้นได้กับมะม่วงทุกพันธุ์ ทำให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากมะม่วงที่เป็นโรคนี้จะมีผิวเปลือกที่ไม่สวยงาม ผลเน่าเสีย และยากต่อการควบคุม (ทรงกลด, ไม่ระบุปีที่พิมพ์)

สำหรับโรคแอนแทรคโนสของนี้ มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จัดเป็นโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง เนื่องจากทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เพราะเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Colletotrichum spp. สามารถเข้าทำลายพืชหลายชนิด ทั้งพืชตระกูลถั่ว หญ้า ผัก ธัญพืช ไม้ผล และไม้ประดับ เป็นต้น (Bailey and Jeger, 1992) และสามารถเข้าทำลายพืชได้แทบทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะกล้า แทงช่อดอก ติดผล และระยะหลังการเก็บเกี่ยว (นิพนธ์, 2535) การเข้าทำลายของเชื้ออาจเป็นได้ทั้งแบบมีเชื้อหลายสปีชีส์เข้าทำลายพืชชนิดเดียว หรือเชื้อสปีชีส์เดียวเข้าทำลายพืชหลายชนิดก็ได้ ส่วนใหญ่การเกิดโรคมักเกิดกับส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน แต่ในบางครั้งส่วนที่อยู่ใต้ดิน เช่น ราก หรือ หัว ก็มีโอกาสได้รับผลกระทบจากโรคนี้เช่นกัน (Freeman *et al*., 1998) โรคแอนแทรคโนสพบได้ทั้งในช่วงการเจริญของผล และผลสุก (Bailey and Jeger, 1992) ผลกระทบจากการเข้าทำลายของดังกล่าวมี 2 ลักษณะ คือ หากการเข้าทำลายเกิดขึ้นในแปลงปลูกจะส่งผลต่อการเจริญของผล (ระยะก่อนเก็บเกี่ยว) แต่หากการเข้าทำลายเกิดขึ้น ในระยะเก็บรักษาผลผลิต เชื้อราจะเข้าทำลายผลโดยตรง (ระยะหลังการเก็บเกี่ยว) ก่อให้เกิดความเสียหายทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ มีผลทำให้ผลผลิตเน่าเสีย อายุการเก็บรักษาสั้น ไม่สามารถขนส่งระยะไกลได้ ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค และไม่สามารถส่งออก ผลผลิตได้ (สมศิริ และคณะ, 2539) โรคนี้พบกระจายอยู่ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศในเขตอบอุ่นจนถึงเขตร้อน ในประเทศไทยพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มากกว่าในประเทศแถบอื่นๆ ของโลก (นิพนธ์, 2535) โดยมีรายงายพืชอาศัยที่เป็นโรคแอนแทรคโนสในประเทศไทยมากถึง 111 ชนิด เข้าทำลายทั้งไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับ พืชสมุนไพร และอื่นๆ (พัฒนา และคณะ, 2537) อาการโดยทั่วไปของโรคแอนแทรคโนสจะเกิดเป็นแผลฉ่ำน้ำสีน้ำตาลเข้ม และมีการสร้างกลุ่มของโคนิเดียเป็นหยดสีส้มบริเวณแผล (Freeman *et al*., 1998)

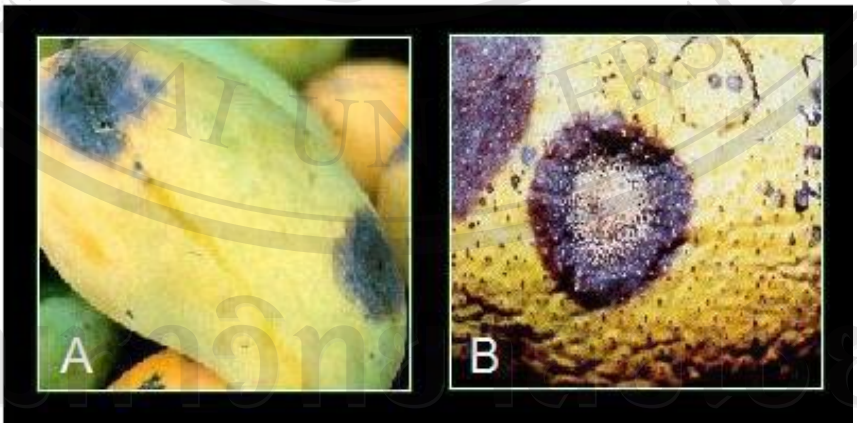
ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนส

มีรายงานหลายฉบับในต่างประเทศที่กล่าวถึงความเสียหายจากโรคแอนแทรคโนสในพืชอาศัยหลายชนิด ซึ่งบางแห่งเกิดความสูญเสียของผลผลิตมากถึง 50 เปอร์เซนต์ (Freeman *et al*., 1998) พืชที่พบโรคแอนแทรคโนสเข้าทำลาย เช่น กล้วย ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ ส้ม

สำหรับลักษณะอาการโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง พบว่ามีรายงานการเข้าทำลายของโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงตั้งแต่ปี 1893 ในรัฐฟลอริดา ประเทศอเมริกา และมีรายงานการเกิดโรคต่อมาในหลายประเทศ ดังนี้ คิวบา ฮาวาย อินเดีย ฟิลิปปินส์ เปอร์โตริโก และทรินิแดด เป็นต้น (Bose *et al*., 1973) โดยโรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่สำคัญมากของมะม่วง พบการแพร่กระจายของโรคในทุกพื้นที่ที่มีการปลูก ยกเว้นในพื้นที่ที่มีความชื้นต่ำ หรือแห้งแล้ง (Dodd *et al*., 1997; Ploetz and Prakash, 2000) โรคดังกล่าวเป็นปัญหาหลักทั้งก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โรคที่เกิดกับผล ทำให้ผลผลิตไม่เป็นที่ต้องการของตลาด นอกจากนี้โรคแอนแทรคโนสยังสามารถเข้าทำลายใบได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีความชื้นสูง ส่งผลกระทบต่อการเพาะต้นกล้าในเนิสเซอรีอีกด้วย (Bose *et al*., 1973) อาการที่พบบนใบอ่อนจะพบมากในช่วงฤดูฝน ซึ่งเป็นช่วงที่มะม่วงอ่อนแอต่อการเข้าทำลายมากที่สุด (Fitzell and Peak, 1984) แผลบนใบจะเริ่มจากเกิดเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็ก ขอบสีน้ำตาลเข้มแผลจะขยายใหญ่ขึ้นไปตามเส้นใบ (vein) เนื้อเยื่อบริเวณกลางแผลจะแตกและหลุดออกไปทำให้เกิดเป็นรู นอกจากนี้โรคแอนแทรคโนสยังสามารถเข้าทำลายกิ่งทำให้เกิดอาการ dieback ได้อีกด้วย (Lim and Khoo, 1985; Ploetz *et al*., 1996) และในบางครั้งพบว่าการแสดงอาการอาจเริ่มมาจากปลายกิ่ง อาการที่พบบนแผลจะพบจุดสีน้ำตาลขนาดเล็ก ต่อมาจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นเป็นแผลสีน้ำตาลถึงดำเนื้อเยื่อบริเวณแผลจะแห้ง สามารถเกิดขึ้นได้ทั่วทั้งผล โดยเฉพาะบริเวณปลายผลทั้งสองข้าง อาการของโรคจะเห็นชัดในระยะที่ผลเริ่มสุก (ภาพ 1) เมื่อมีความชื้นสูงจะพบการสร้างกลุ่มของโคนิเดียสีส้มบริเวณแผล และเนื้อเยื่อภายในผลถูกทำลายลึกลงไปกว่า 5 มิลลิเมตร (Ploetz *et al*., 2003) การแพร่กระจายของเชื้อ แพร่กระจายโดยอาศัยน้ำฝน โดยโคนิเดียมจะงอกภายใน 6 - 8 ชั่วโมง เมื่ออยู่ในน้ำ และจากนั้น 10 - 12 ชั่วโมง จะสร้าง appressorium นอกจากนี้ Dodd *et al*. (1991) ในฟิลิปปินส์พบว่าใบที่งอกออกมาใหม่สามารถถูกเชื้อเข้าทำลายได้ง่ายที่สุด อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของโคนีเดียมอยู่ระหว่าง 25 - 30 องศาเซลเซียส



ภาพ 1 ลักษณะอาการโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง; A: อาการบนผลมะม่วง และ B: กลุ่มโคนิเดีย (ที่มา: http://agriqua.doae.go.th)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

การจำแนกชั้นของเชื้อ (Rodriguez and Redman, 2008)

Kingdom : Fungi

Phylum : Ascomycota

Class : Sordariomycetes

Subclass : Incertae sedis

Order : Phyllachorales

Family : Phyllachoraceae

Genus : *Colletotrichum*

Species : *C. gloeosporioides*

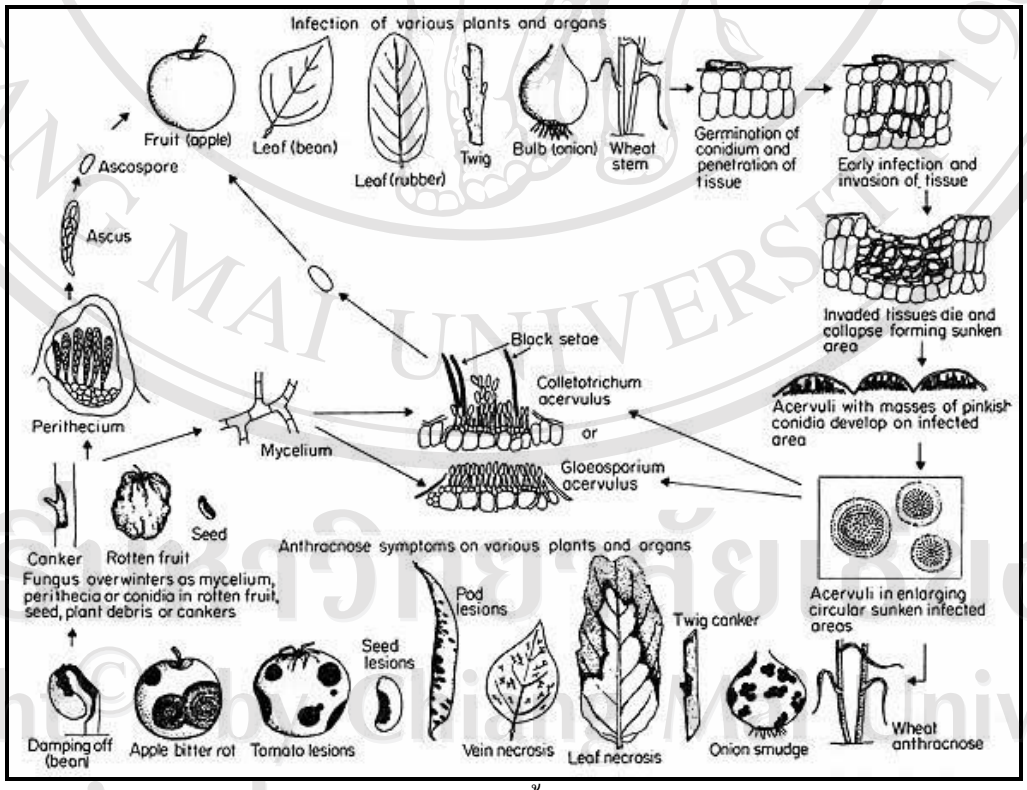
ลักษณะทั่วไปของเชื้อราคือ สร้างเส้นใยฝังอยู่ในผิวพืช เส้นใยไม่มีสี หรือสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลแก่ แตกกิ่งก้าน มีผนังกั้นโคนิเดียม เกิดบนโคนิดิโอฟอร์ ซึ่งมีกำเนิดจาก stromatic cell ของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า acervulus ใต้ชั้น epidermis ของพืช เมื่อแก่จะดันผิวพืชให้แตกออกโคนิเดียจะถูกปล่อยออกมาเป็นกลุ่มในลักษณะแห้งหรือของเหลวข้นสีเหลืองอ่อน หรือสีส้มอมชมพู เมื่อนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะสร้างโคนิเดียมเป็นกลุ่มบน stromatic cell คล้าย sporodochium การสังเกตลักษณะของ acervulus จึงต้องดูจากสภาพธรรมชาติ หรือบนพืชอาศัย บางครั้งพบการสร้างเม็ดสเคลอโรเตีย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โคนิเดียเดี่ยวๆ ไม่มีสี เซลล์เดียว ผนังบาง เรียบ ลักษณะรูปร่างรูปไข่ หรือยาวรี ตรง หรือโค้งงอ อาจมี guttule ลักษณะคล้ายฟองอากาศอยู่ภายใน มีการสร้าง sterile hypha สีน้ำตาล ผนัง หนาเรียบ ปลายแหลมคล้ายหนามเรียกว่า setae บริเวณขอบของ acervulus หรือปะปนอยู่กับโคนิดิโอฟอร์ ลักษณะการสร้าง setae ของเชื้อรานี้เป็นลักษณะที่ไม่คงที่เปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ appressorium สีน้ำตาล มีผนังสีน้ำตาลเข้มลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลกลมรีคล้ายกระบอง หรือรูปร่างไม่แน่นอน บางครั้งผนังมีรอยหยัก (lobe) สร้างเดี่ยวๆ หรือเกิดติดกันเป็นกลุ่ม telemorph state ของเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* จัดอยู่ในสกุล *Glomerella* (Sutton, 1980)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การแพร่ระบาด

เชื้อรา *Colletotrichum* เข้าทำลายพืชโดยโคนิเดียมงอก germ tube ออกมาแล้วสร้าง appressorium เป็นส่วนช่วยยึดเกาะผิวชั้น cuticle ภายใน 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงสร้าง infection peg และเส้นใยงอกไปตามช่องว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space) ภายในเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วพักแฝงตัวอยู่ระหว่างเซลล์ในชั้น epidermis และ sub-epidermis หรือในช่วง 2 - 5 ชั้นเซลล์ จากผิวนอกลงไป หรือลึกประมาณ 1 มิลลิเมตร จากนั้นเชื้อราจะพักตัวอยู่ในผลดิบ เมื่อมะม่วงเริ่มสุก ผิวเริ่มเปลี่ยนเป็น สีเหลือง 25 - 50 เปอร์เซนต์ ของผล จึงปรากฏอาการแอนแทรคโนสให้เห็น ผลมะม่วงที่เป็นโรคจะมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา คือ มีอัตราการหายใจ การผลิตก๊าซคาร์บอกไดออกไซด์ และการผลิตก๊าซเอทธิลีน สูงกว่าผลมะม่วงปกติ (ภาพ 2)

ส่วนสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่การเข้าทำลายของเชื้อรา คือ เชื้อราจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 24 - 32 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์สูง โดยเฉพาะช่วงที่มีฝนตกชุกในระยะที่มะม่วงแทงช่อดอกหรือแตกใบอ่อน โรคจะระบาดรุนแรง มีการสำรวจพบโรคระบาดมากในแหล่งที่มีการปลูกมะม่วงมาเป็นเวลานาน และสวนมะม่วงที่มีอายุมาก



ภาพ 2 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Colletotrichum*

(ที่มา: http://www.nysaes.cornell.edu/pp/extension/tfabp/santsmf.shtml)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การควบคุมป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum*

1. ฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น benomyl หรือ mancozeb ในแปลงปลูกโดยเฉพาะในช่วงออกดอกติดผลจนถึงก่อนเก็บเกี่ยว ร่วมกับการป้องกันกำจัดโรคด้วยวิธีเขตกรรม
2. จุ่มผลมะม่วงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หรือจุ่มในสารเคมี thiabendazole ความเข้มข้น 250 ppm ซึ่งผสมกับน้ำร้อน 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
3. หากต้องการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี อาจใช้วิธีห่อผลมะม่วงในแปลงปลูก ซึ่งพบว่าสามารถลดความเสียหายจากโรคแอนแทรคโนสได้บ้าง

การสร้างความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (ธรรมศักดิ์, 2543)

ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่จะเน้นวิธีการป้องกัน กล่าวคือ ทำการฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดป้องกัน (protectant fungicide) ก่อนที่จะปล่อยให้เกิดการระบาดรุนแรงของโรค หากมีการปล่อยให้ระบาดรุนแรง จะทำให้การใช้สารดังกล่าวควบคุมไม่ได้ผล จึงต้องใช้สารที่มีคุณสมบัติในการรักษาเพื่อหยุดการลุกลามของโรค ซึ่งสารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติดูดซึมเข้าสู่ส่วนต่างๆ ของพืช และจากการใช้สารดูดซึมชนิดนี้เองก่อให้เกิดปัญหาในการสร้างความต้านทานขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการนำสาร benomyl ซึ่งเป็นสารดูดซึมเข้ามาใช้ในปี ค.ศ. 1970 ซึ่งก่อนหน้านั้นมีการใช้สารชนิดป้องกัน ได้แก่ maneb mancozeb และสารประกอบทองแดงในการควบคุมโรคพืชโดยปราศจากปัญหาการสร้างความต้านทานต่อสารเหล่านี้ แต่หลังจากค้นพบสาร benomyl และนำมาใช้ในการควบคุมโรคพบว่ามีข้อดีกว่าสารกลุ่มดูดซึม และหากโรคไม่ระบาดรุนแรงมากนักสามารถหยุดการลุกลามของโรคได้ ดังนั้นทำให้เกษตรกรนิยมสารชนิดนี้อย่างกว้างขวางและบ่อยครั้งขึ้น ทำให้มีการสร้างความต้านทานอย่างรวดเร็วภายใน 2-3 ปี นอกจากนี้ มีสารอีกหลายชนิดที่มีกลไกการออกฤทธิ์ทำลายที่มีความเฉพาะเจาะจงเหมือนกับ benomyl มีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดการสร้างความต้านทานขึ้นตาม ซึ่งพบว่า benlate เป็นสารเคมีที่สร้างความต้านทานอย่างรวดเร็ว โดยสารดังกล่าวจะไปยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ในขบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส (mitosis) และไมโอซิส (meiosis) มีผลทำให้พันธุกรรมเปลี่ยนจึงเกิดการดื้อยา

การใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดโรคพืชมักประสบปัญหาในด้านการดื้อต่อยา หรือเกิดความต้านทานต่อสารนั้น (resistance to fungicide) ซึ่งเชื้อจะมีการปรับตัวเองเป็นเชื้อกลายพันธุ์หรือ mutant ใหม่ ซึ่งลักษณะเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ เชื้อกลายพันธุ์นี้จะเกิดขึ้นหลังจากมีการใช้สารเคมีชนิดนั้นติดต่อกันเป็นเวลานานและต่อเนื่อง โดยส่วนมากพันธุกรรมของเชื้อที่ดื้อต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารป้องกันกำจัดเชื้อรา (fungicide resistance) ถูกควบคุมโดยส่วนนอกโครโมโซม เช่น พลาสมิด เป็นต้น และควบคุมโดยโครโมโซมมียีนที่ทำหน้าที่อยู่ สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดไม่อาจฆ่าเชื้อราได้ แต่สารเหล่านี้ทำงานโดยการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในลักษณะใดลักษณะหนึ่งเพียงชั่วคราว ต่อเมื่อฤทธิ์ของสารจางหายไป หรือลดลงเชื้อราก็จะเจริญเติบโตได้ดี

บทบาทของสารกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมต่อเชื้อรา (ธรรมศักดิ์, 2539)

สารป้องกันกำจัดราชนิดดูดซึมเป็นสารที่ใช้กับ ดอก ผล ใบ ลำต้น และราก จะเคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่างๆ ภายในพืช ไม่เป็นพิษกับพืช ไม่มีผลกระทบต่อขบวนการชีวภาพ มีพิษเฉพาะกับเชื้อรา เพราะว่าฤทธิ์ของสารมีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อราเท่านั้น และในบางครั้งจะมีพิษจำเพาะมาก (monosite inhibitor)

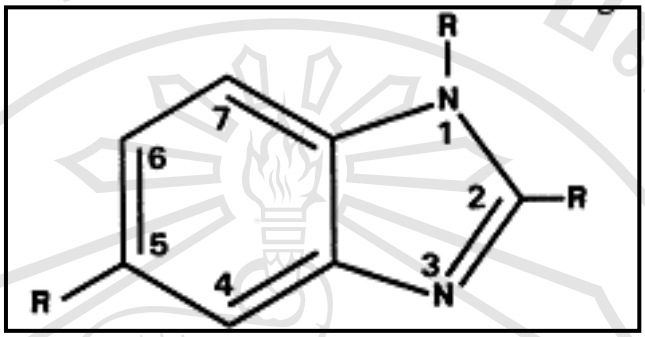
กลไกทางเคมีที่จำเพาะเจาะจง (specific mechanism of biochemical)

1. รบกวนขบวนการหายใจ (interference with cell respiration)
2. รบกวนการแบ่งเซลล์ (interference with cell deviation)
3. รบกวนการสังเคราะห์ sterol (interference with sterolbiosynthesis)
4. รบกวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (interference with cell wall synthesis)
5. รบกานการสังเคราะห์โปรตีน (interference with protein synthesis)
6. สารที่มีพิษจำเพาะเจาะจงสูงมาก (highly selective fungicide)

สารเบนซิมิดาโซล (benzimidazole)

สารเบนซิมิดาโซลเป็นสารประกอบอินทรีย์ heterocyclic aromatic organic compound ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชประเภทดูดซึม (systemic fungicide) สามารถควบคุมป้องกันกำจัดเชื้อราได้กว้าง (broad-spectrum) และรวดเร็ว (Davidse, 1986; Hollomon *et al*., 1998) สารเคมีในกลุ่มนี้ประกอบด้วยสารหลายชนิด (ตาราง 1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3 โครงสร้างเคมีสารเบนซิมิดาโซล (ที่มา: Bartlett *et al*., 1992)

ตาราง 1 สูตรสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (chemical structures formulas of benzimidazoles group)

Derivative	Side chain composition		
	R1	R2	R5
benzimidazole	-H	-H	-H
benomyl	$-CONH(CH_2)_3CH_3$	$-NHCOOCH_3$	-H
thiabendazole	-H	-4-Thiazole	-H
carbendazim	-H	$-NHCOOCH_3$	-H
albendazole	-H	$-NHCOOCH_3$	$-SCH_2CH_2CH_3$
fenbendazole	-H	$-NHCOOCH_3$	-S-phenyl
oxfendazole	-H	$-NHCOOCH_3$	-SO-phenyl
oxibendazole	-H	$-NHCOOCH_3$	$-OCH_2CH_2CH_3$
mebendazole	-H	$-NHCOOCH_3$	-CO-phenyl
parbendazole	-H	$-NHCOOCH_3$	-CH2CH2CH2CH3

ที่มา: Bartlett *et al.* (1992)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารคาร์เบนดาซิม (carbendazim) (International Programme on Chemical Safety, 1996)

common name: carbendazim

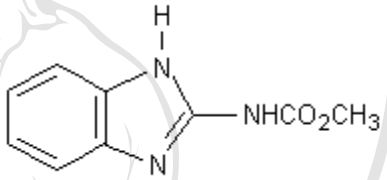
chemical group: Benzimidazole carbamate

IUPAC name: methyl benzimidazol-2-ylcarbamate

molecular formula: $C_9H_9N_3O_2$

relative molecular mass: 191.2

structural formula:



trade names: Aimcozim, BAS 346F, Bavistin, BCM, Bendazim, BMC, Carbendazole, Carbendor, Cekudazim, Corbel, Custos, Delsene, Derosal, Derosalin, Equitdazin, Focal, Hoe 017411, Kemdazin, Kombat, Konker, Lignasan, MBC, MCAB, MCB, Pillarstin, Triticol.

สารคาร์เบนดาซิม เป็นสารเคมีชนิดดูดซึมตัวหนึ่งในกลุ่มสารเบนซิมิดาโซล ใช้ควบคุมป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่างๆ ในธัญพืช ผลไม้ ดอกไม้ และพืชผักต่างๆ ได้ดี (Australian Pesticides and Veterinary Medicines, 2007)

กลไกการออกฤทธิ์ของสารเบนซิมิดาโซล (mechanism of benzimidazole) (Seiler, 1975; Davidse, 1986; Ishiii, 2004; Ma and Michailides, 2005; ธรรมศักดิ์, 2539)

สารเบนซิมิดาโซลจะเข้าไปรวมตัวกับโปรตีนของ tubulin ซึ่งประกอบด้วย alpha (α)-tubulin กับ beta (β)-tubulin แต่ส่วนใหญ่สารนี้จะจับ (bind) กับ beta-tubulin ของเชื้อราอย่างเฉพาะเจาะจงในโครงสร้าง microtubule ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ซึ่งเป็นโครงสร้างคล้ายเส้นด้ายมีหน้าที่สำหรับดึง chromosome ให้แยกคู่ในระยะ metaphase ดังนั้นสารเบนซิมิดาโซลจึงมีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(mitosis) และการเกิดโครงสร้างของเซลล์โดยจะรบกวนหรือขัดขวางการทำงานของ microtubule การมีฤทธิ์เฉพาะเจาะจงแบบนี้ จึงเป็นลักษณะเด่นของสารกลุ่มนี้ และส่งผลให้เชื้อราเกิดการต้านทานต่อสารนี้ได้อย่างรวดเร็ว สารนี้ไม่มีพิษต่อเชื้อราในคลาส Oomycetes และ Zygomycetes สำหรับเชื้อราในคลาส Basidiomycetes ตอบสนองพอสมควร แต่เชื้อราในคลาส Ascomycetes และ Deuteromycetes มีการตอบสนองมาก ปัจจุบันสารคาร์เบนดาซิมได้รับความนิยมสูงเนื่องจากมีความคงตัวและใช้ได้ทันทีมีพิษโดยตรงต่อเชื้อรา

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (ธรรมศักดิ์, 2543)

มีปัจจัยหลายปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงในการสร้างความต้านทาน ซึ่งปัจจัยสำคัญที่จะก่อให้เกิดการสร้างความต้านทานได้เร็วหรือช้าเพียงใด ได้แก่ คุณสมบัติของสารเคมี เช่น กลไกการออกฤทธิ์ทางชีววิทยาของเชื้อ และการปฏิบัติต่างๆ ในการผลิตพืช

1. คุณสมบัติทางด้านเคมี และการออกฤทธิ์ของสาร

สารป้องกันกำจัดเชื้อราบางกลุ่ม เช่น bemzimidazole และ phenylamide จะมีการสร้างความต้านทานโดยการกลายพันธุ์ของยีนเพียง 1 ยีน ดังนั้นจึงมีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดความต้านทาน ส่วนสารกลุ่ม dicarboximides และกลุ่มที่ยับยั้ง การสร้าง sterol หรืออาจเรียกว่าเป็นสารพวก demethylation inhibitor's (DMI's) ถูกสร้างความต้านทานช้ากว่า เนื่องจากจะต้องมีการกลายพันธุ์ของยีนมากกว่า 1 ยีน สารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีตำแหน่งการออกฤทธิ์หลายตำแหน่ง (multi-site fungicide) ซึ่งไปรบกวนหลายกระบวนการของเชื้อรา และส่วนใหญ่สารเหล่านี้มีการออกฤทธิ์แบบป้องกัน โดยยับยั้งการงอกของสปอร์ ความเสี่ยงที่เกิดความต้านทานมีต่ำหรืออาจไม่มีในการสร้างความต้านทาน

2. ชีววิทยาของเชื้อรา

เชื้อราที่มีวัฏจักรชีวิตสั้น สามารถขยายพันธุ์ได้เร็ว และขยายพันธุ์ได้ครั้งละมากๆ และหากมีการแพร่กระจายของสปอร์ไปในอากาศ (air-borne fungi) เช่น เชื้อราสาเหตุโรคราสนิม ราแป้ง และราน้ำค้าง มีความเสี่ยงในการพัฒนาการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีสูง เนื่องจากส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ เช่น สปอร์มีโอกาสสัมผัสกับสารเคมีสูง ดังนั้นความรุนแรงในการคัดเลือกเพื่อสร้างความต้านทานจึงมีสูง เชื้อราพวกนี้ ได้แก่ พวกที่ก่อให้เกิดโรคกับส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน เช่น ใบ โดยบนใบหนึ่งๆ อาจพบจำนวนสปอร์หลายพันสปอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การพัฒนาและกลไกการสร้างความต้านทานของเชื้อราต่อสารเบนซิมิดาโซล (ธรรมศักดิ์, 2543)

การสร้างความต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราเป็นการดัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อรา เพื่อให้มีการตอบสนองต่อสารเคมี นักวิทยาศาสตร์เชื่อกันว่าการลดการตอบสนองต่อสารเคมีนั้นเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ของเชื้อรา ซึ่งอาจมีจำนวนน้อยมาก หรืออาจมีเพียง 1 ในล้าน ที่จะเกิดการกลายพันธุ์ ส่วนเชื้อราที่จะเกิดการกลายพันธุ์นั้นอาจเป็นส่วนของเส้นใย (mycelium) ส่วนที่ใช้ขยายพันธุ์เรียกว่า สเคลอโรเตียม หรือสปอร์ หรือนิวเคลียสของเซลล์ที่ขยายพันธุ์และแพร่กระจายไปที่อื่นได้ และการกลายพันธุ์นั้นอาจเกิดมาจากการกลายพันธุ์ของยีนเพียง 1 ยีน จะใช้เวลาในการพัฒนาความต้านทานโดยการลดการเข้าไปของสารเคมี และการสลายพิษของสารเคมี

Hoeschst and Dupont (1973) รายงานว่า สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเป็นสารกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมในกลุ่มเบนซิมิดาโซล มีบทบาทสำคัญในการควบคุมโรคพืช ใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดกับธัญพืช ผลไม้ พืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับ นอกจากนี้ยังใช้ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งคาร์เบนดาซิมจะไปทำงานโดยการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยจะเข้าไปรบกวนการสร้าง spindle fiber ที่กระบวนการแบ่งเซลล์แบบ mitosis การใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเป็นประจำนั้นพบว่าจะทำให้เกิดการดื้อยา (resistance) ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

Yuan and Zhou (2003) รายงานว่าไอโซเลทของ *Gibberella zeae* ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ความเข้มข้นของสารคาร์เบนดาซิมในความเข้มข้นต่างๆ สามารถแบ่งการเจริญของเชื้อราได้ 3 ระดับ โดยกำหนดให้ (S: sensitive) คือ ไอโซเลทที่ไม่ต้านทานต่อสารเคมี ซึ่งเชื้อราสามารถเจริญได้ดี 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 1.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับไอโซเลทที่ต้านทานสารได้ปานกลาง (MR: moderate resistance) คือ เชื้อราสามารถเจริญได้ที่ 1.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจริญได้บ้างที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ (HR: high resistance) คือ ไอโซเลทที่ต้านทานได้สูง ซึ่งเชื้อราสามารถเจริญได้ที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถเจริญได้ที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสรุปได้ว่ามี 2 ระดับของการต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมใน *Gibberella zeae* และได้วิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่ 1 locus หรือ 2 locus ที่ความแตกต่างของ allelic และการต้านทานนี้ไม่ได้มีผลมาจาก modifying หรือ cytoplasmic component ภายในเซลล์ของเชื้อสาเหตุ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรองจิต (2530) ได้ศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาของเชื้อ *Colletotrichum* sp. ที่ต้านทานต่อสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซล ได้แก่ สารป้องกันกำจัดเชื้อราเบโนมิล และคาร์เบนดาซิม ซึ่งพบว่าเชื้อราที่ผ่านการทดสอบกับสารเคมีจะสร้างโคโลนีเป็น sector และเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์-อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) พบว่าเส้นใยเชื้อรามีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น บวมพอง โป่งกลม เรียงต่อกันเป็นข้อๆ เส้นใยจะเหี่ยวและเป็นร่องไปตามยาว เรียงอัดตัวแน่น และเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope พบว่า เชื้อราสร้างสปอร์ผิดปกติไป เช่น รูปร่างเล็กและผอมลง หรือรูปร่างอ้วน และยาวขึ้น หรือหงิกงอ โดยเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การเจริญของเส้นใย พบว่าทั้ง benomyl และ carbendazim ส่วนมากสร้างสปอร์ได้ไม่แน่นอน ไม่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดโคโลนีและระดับความเข้มข้นของสารเคมี

การควบคุมโรคโดยชีววิธี (biological control หรือ biocontrol)

การควบคุมโรคโดยชีววิธี หมายถึงการลดปริมาณเชื้อสาเหตุของโรค หรือลดกิจกรรมการก่อให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรคหรือปรสิตที่อยู่ในระยะที่มีปฏิกิริยา โดยการใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่า มาใช้ในการควบคุม และอาจรวมถึงการใช้สารพันธุกรรม (gene product) จากสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นด้วย ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ไม่รวมถึงมนุษย์ (Cook and Baker, 1983; Cook, 1985)

เมื่อประมาณ 100 ปีที่ผ่านมาถือว่าเป็นยุคใหม่ของการควบคุมโดยชีววิธี ในปี ค.ศ. 1941 C. F. von Tubuef นักโรคพืชชาวเยอรมัน ได้เขียนหนังสือชื่อ “Biologische Bedampfung von Pilzkrankheiten der Pflanzen” ซึ่งถือได้ว่าเป็นหนังสืออ้างอิงเล่มแรกที่มีการกล่าวถึงการควบคุมโดย ชีววิธี และในปี ค.ศ. 1961 L. O. Howard ได้ตั้งชื่อวิธีการควบคุมศัตรูพืชในหนังสือเล่มดังกล่าวว่า biological method ขึ้นเป็นครั้งแรก ซึ่งในปี ค.ศ. 1961 H. S. Smith ได้เปลี่ยนมาใช้ biological control แทน (Cook, 1998) และหลังจากนั้นเป็นต้นมาก็ได้มีการค้นคว้าและวิจัยเกี่ยวกับวิธีการควบคุมโดยชีววิธีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงปัจจุบัน ซึ่งในปัจจุบันเริ่มมีความตื่นตัวในเรื่องสิ่งแวดล้อมและต้องการผลผลิตที่ปลอดภัยต่อสุขภาพมากขึ้น ดังนั้นจึงมีการนำจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มาใช้อย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ จนถึงขึ้นมีการนำจุลินทรีย์บางชนิดมาใช้ในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าและได้ทำการจดลิขสิทธิ์และสิทธิบัตร

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เป็นวิธีการที่ได้รับความสนใจมากในหลายประเทศ เพราะเป็นวิธีการที่ประยุกต์พฤติกรรมทางธรรมชาติ โดยการศึกษาค้นคว้าเพื่อนำเอาจุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคพืชมาใช้ประโยชน์ เพื่อแก้ปัญหาการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดขึ้นในผลผลิตทาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเกษตร ซึ่งวิธีการนี้คนส่วนใหญ่อาจมองข้ามความสำคัญไป จนกระทั้งเมื่อประสบปัญหาในการป้องกันโรคโดยใช้สารเคมีแล้วจึงจะมองหาวิธีการอื่นๆ มาทดลองใช้ (ปฏิพันธ์, 2546)

กลไกการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (เกษม, 2532; จิระเดช, 2546)

1. การแข่งขันซึ่งกันและกัน (competition) หมายถึง การที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งเข้าไปยึดพื้นที่หรือเจริญเติบโตก่อนที่เชื้อสาเหตุโรคพืชจะสามารถเข้าทำลายพืชได้
2. การเป็นปรสิต และตัวห้ำ (parasite and predation) หมายถึง กรณีที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ซึ่งเจริญอยู่ใกล้เคียงหรือบนส่วนของเชื้อโรคพืชแล้วเข้าทำลายเชื้อโรคพืชเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารหรือสารประกอบต่างๆ จากเชื้อโรคพืช
3. การชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อโรค (induction of resistant in plant) เป็นกลไกที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปกระตุ้นให้ต้นพืชไปสร้างภูมิคุ้มกัน หรือสร้างสารต่างๆ ที่มีผลในการต่อต้านหรือยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช
4. การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) หมายถึง ผลิตผลจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งมักมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้

สารปฏิชีวนะ (antibiotics)

สารปฏิชีวนะ (antibiotics) มาจากคำภาษากรีก 2 คำ คือ anti และ biosis ถูกนำมาใช้ครั้งแรกโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศส ชื่อ Vullimin ในปี ค.ศ. 1889 โดยให้ความหมายว่า เป็นสารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง สามารถทำลายสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ยังผลให้เกิดความปลอดภัยของสิ่งมีชีวิตชนิดที่สามได้ ฉะนั้น กล่าวโดยทั่วๆ ไป สารปฏิชีวนะ หมายถึง สารต้านจุลชีพที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งส่วนมากพบว่าผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ แล้วมีคุณสมบัติในการเลือกออกฤทธิ์ทำลาย (selective toxic) เชื้อจุลินทรีย์อีกพวกหนึ่งได้ (อัญชลี, 2534) ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบันได้มีผู้ให้คำนิยามหรือคำจำกัดความของคำว่าสารยับยั้งหรือสารต้านจุลชีพ และสารปฏิชีวนะไว้หลายท่าน เช่น Betina (1983) ได้ให้นิยามสารปฏิชีวนะว่า เป็นผลผลิตพวกสารเมตาบอไลท์ (metabolite) ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา สาหร่าย พืชชั้นสูง สัตว์ชั้นสูงและชั้นต่ำ ซึ่งมีปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biological activity) ในความเข้มข้นต่ำ ปัจจุบันสารที่เป็นที่รู้จักได้แก่ antibacterial, antifungal, antivirus และ antiprotozoal เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่สารปฏิชีวนะจะเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ของแบคทีเรีย และเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แหล่งผลิตสารปฏิชีวนะ (มาลินี, 2540)

ในการเจริญของจุลินทรีย์นั้น มีการสังเคราะห์สารชนิดต่างๆ ในระหว่างที่มีการเจริญ สารที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้น สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารปฐมภูมิ (primary metabolite) และสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) สารปฐมภูมิจะถูกสร้างขึ้นในช่วงกระบวนการเปลี่ยนสารเชิงซ้อนให้เป็นสารประกอบที่ง่ายขึ้น โดยมีเอนไซม์เป็นตัวย่อยสลาย เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ และสลายสาร วิธีการสลายเชิงซ้อนจะเกิดตัวกลาง (intermediate) และมีการใช้สาร intermediate เป็น precursor ในการสังเคราะห์สารที่มีความจำเป็นในการเจริญ เช่น deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA), protein, lipid และ polysaccharide ปฏิกิริยาต่างๆ ของสารปฐมภูมิมีความสมดุลและไม่มีการสะสมสารที่จำเป็นสำหรับการมีชีวิตรอด ส่วนสารทุติยภูมิหรือเรียกว่า idiolite เนื่องจากสารดังกล่าวถูกสร้างขึ้นในช่วง idiophase ของการเลี้ยงเชื้อแบบ batch culture ซึ่งในระยะแรกเชื้อมีการปรับตัวและมีการแบ่งเซลล์อย่างช้าๆ (lag phase) ต่อมาเชื้อจะมีอัตราการเจริญสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (acceleration phase) จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดของการเจริญ (exponential phase) อาหารถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ปริมาณอาหารที่ลดลงเป็นผลให้เกิดการสะสม biochemical intermediate บางชนิดทำให้อัตราการเจริญถูกจำกัด (deceleration phase) เชื้อเริ่มมีการเปลี่ยน biochemical pathway ทำให้ได้สารปฏิชีวนะออกมา (Isaac and Jennings, 1995) สารทุติยภูมิเป็นสารที่ไม่มีความจำเป็นสำหรับการเจริญหรือเพื่อสังเคราะห์สารของจุลินทรีย์ แต่อาจมีบทบาทในการแข่งขันเพื่อมีชีวิตรอดในธรรมชาติ (Martin and Demain, 1980) ดังนั้นจึงพบว่ามีเชื้อเพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้

วิธีทดสอบสารปฏิชีวนะ (antimicrobial activity)

เชื้อแอคติโตมัยซีสแต่ละชนิดมีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะในสภาวะของการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ต่างกัน บางชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งและบางชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว หรืออาจจะสร้างได้ดีทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว ดังนั้นในการตรวจสอบหาเชื้อที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะจึงสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีการใหญ่ๆ คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. วิธีเจือจาง (dilution method) (Tortora *et al.,* 1992)

เป็นการทดสอบเชิงปริมาณ เนื่องจากสามารถทราบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ทำลายเชื้อได้ มีหลักการสำคัญคือ เจือจางสารปฏิชีวนะให้มีความเข้มข้นต่างๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเพาะเชื้อทดสอบลงไป แบ่งเป็น 2 วิธีคือ

- วิธีเจือจางในอาหารเหลว (tube or broth dilution method)

เป็นการเจือจางความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว เพื่อให้ความเข้มข้นสารลดลงตามความต้องการจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่าที่ต้องการแล้วเติมเชื้อทดสอบลงไปเท่าๆ กันทุกหลอด โดยเชื้อทดสอบนี้ควรมีปริมาณ 10^5 - 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับเชื้อทดสอบ แล้วนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบ (minimal inhibitory concentration, MIC) โดยดูหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญเมื่อดูด้วยตาเปล่า และนำไปหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อทดสอบได้ โดยนำหลอดที่ไม่มีการเจริญไปเพาะใหม่อีกครั้ง ความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่ขึ้นคือค่า MIC

- วิธีเจือจางในอาหารแข็ง (agar dilution method)

เป็นการเจือจางสารปฏิชีวนะในอาหารวุ้นที่หลอมเหลว อุณหภูมิ 48 - 50 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปจะใช้อาหารแข็งหลอมเหลว 19 มิลลิลิตร เติมสารละลายปฏิชีวนะ 1 มิลลิลิตร ผสมจนเข้ากัน เทใส่จานอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็งตัว เพาะเชื้อทดสอบลงไป นำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม สังเกตการณ์เจริญของเชื้อ

2. วิธีแพร่ (diffusion method) (Koneman *el al.,* 1983)

หลักการคือให้สารปฏิชีวนะแพร่ไปในอาหารแข็งแล้วไปยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบที่เพาะเอาไว้ ทำให้เกิดวงใส (clear zone) ขึ้นรอบบริเวณที่ใส่สารปฏิชีวนะ สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

paper disc method

เป็นวิธีที่นิยมใช้มากโดยการเพาะเชื้อทดสอบลงบนอาหารให้เจริญทั่วผิวหน้าอาหาร แล้ววางกระดาษวงกลมที่ชุบสารปฏิชีวนะลงไป หรืออาจจะวางกระดาษที่แห้งลงไปก่อนแล้วค่อยหยดสารปฏิชีวนะลงไป นำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม แล้วดูผลการยับยั้ง ปัจจัยในการทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะด้วยวิธี disc diffusion method (Koneman *et al.,* 1983 and Murrey *et al.*, 1995)

ชนิดของอาหารที่ใช้ทดสอบต้องเป็นอาหารที่เชื้อทดสอบสามารถเจริญได้ตามปกติไม่มีสารยับยั้งหรือกระตุ้นให้เกิดการเจริญเป็นพิเศษ

- ความเป็นกรด - ด่าง (pH) ของอาหารควรอยู่ในช่วง 7.2-7.4 เนื่องจากความเป็นกรด-เบสมีผลต่อความแข็งแรงของอาหาร จึงมีผลต่อการแพร่ของสารปฏิชีวนะ
- อุณหภูมิที่บ่มควรเหมาะสมกับเชื้อทดสอบ
- ปริมาณตั้งต้นของเชื้อทดสอบ
- ผิวหน้าอาหารที่วาง paper disc ต้องแห้ง

agar well method

เป็นวิธีการทดสอบที่เตรียมอาหารวุ้นทดสอบเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างเป็น base layer ชั้นบนเป็น seed layer ซึ่งเพาะเชื้อทดสอบไว้ เจาะวุ้นชั้นบนให้เป็นหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ใส่สารปฏิชีวนะจนเต็มหลุม บ่มเพาะเชื้อ แล้วตรวจวงใสที่เกิดขึ้น

cylinder cup method

ใช้ถ้วยทรงกระบอกวางบนอาหารแข็งที่เพาะเชื้อไว้แล้วโดยก่อนวางนำไฟมาลนที่ก้นถ้วยก่อนเพื่อให้ถ้วยติดแน่นกับผิวอาหาร แล้วเติมสารปฏิชีวนะลงไปในถ้วย นำไปบ่มแล้วดูผลการยับยั้ง

agar plug method ทำได้ 2 แบบ คือ

1. ใช้เชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะเป็น agar plug โดยเลี้ยงเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็งในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อสร้างสารปฏิชีวนะและปล่อยออกมาในอาหารวุ้น จากนั้นจึงเจาะวุ้นออกมาเป็นแท่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 เซนติเมตร นำมาวางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อทดสอบ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ตรวจวงใสที่เกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ใช้เชื้อทดสอบเป็น agar plug โดยเลี้ยงเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะโดยการ streak เชื้อบนอาหารแข็งเป็นบริเวณครึ่งหนึ่งของจานอาหาร บ่มเพาะให้เชื้อเจริญเต็มที่ นำแท่งวุ้นที่มีเชื้อทดสอบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 1.0 เซนติเมตร วางลงบริเวณตรงกลางจานอาหาร บ่มเพาะเชื้อระยะหนึ่ง สังเกตการเจริญของเชื้อทดสอบ (Crawford *et al.,*1993)

droplet method (Pickup *et al.,* 1993)

เป็นวิธีการที่ใช้ peristaltic pump หยดอาหารแข็งที่อยู่ในสภาพหลอมเหลว 1.0 มิลลิลิตร ลงในจานอาหาร โดยให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15 มิลลิเมตร เมื่ออาหารแข็งตัว นำเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะมาเพาะลงบนผิวหน้าอาหารดังกล่าว บ่มเพาะจนเชื้อเจริญเต็มที่ จึงเทอาหาร NA หลอมเหลวที่ผสมเชื้อทดสอบราดบนแผ่นวุ้นในจานอาหาร บ่มเพาะเชื้อระยะหนึ่ง ตรวจวงใสที่เกิดขึ้น

cross streak method (Koneman *et al.,* 1983)

เพาะเลี้ยงเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะโดยการขีด (streak) เป็นแนวเส้นตรงบนผิวอาหารแข็ง บ่มเพาะเชื้อจนเจริญเต็มที่ จากนั้นนำเชื้อทดสอบมาขีดเป็นแนวตั้งฉากกับเชื้อที่เลี้ยงไว้ บ่มเพาะเชื้อระยะหนึ่งตรวจ inhibition zone ที่เกิดขึ้น วิธีนี้อาหารที่ใช้ต้องเหมาะสำหรับกาเจริญของเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะและเชื้อทดสอบด้วย

แอกติโนไมซีส (actinomycetes)

เชื้อแอกติโนไมซีสพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ อากาศ อาหาร และในพืช แหล่งที่พบมากได้แก่ บริเวณที่มีการสะสมสารอินทรีย์ เช่น ดินที่เพาะปลูก วัตถุเน่าเปื่อย โคลน ตะกอนในแม่น้ำ ใต้ทะเล ดินบริเวณน้ำพุร้อน หรือป่าชายเลน นอกจากนี้ยังพบมากในดินบริเวณรอบๆ รากพืช (rhizosphere) และในชิ้นส่วนของต้นพืช (endophytic actinomycetes) จะเห็นได้ว่าสามารถพบแอกติโนไมซีสได้ทั่วไป โดยมีปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมปริมาณของแอคติโนมัยซีท คือ สภาพและปริมาณอินทรีย์วัตถุ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และระดับความชื้น อุณหภูมิ และฤดูกาลของพืชอาศัย (Coombs and Franco, 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอกติโนไมซีส (Kalakoutskii and Agre, 1976) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจัดอยู่ใน

Kingdom : Bacteria

Division : Actinobacteria

Class : Actinomycetes

Order : Actinomycetales

Family : Actinomycetaceae, Mycobacteriaceae, Frankiaceae, Actinoplanaceae, Dermatophilaceae, Nocardiaceae, Streptomycetaceae and Micromonosporaceae

ลักษณะทั่วไปของแอกติโนไมซีส

แอกติโนไมซีสเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์เซลล์เดียว เมื่อเจริญบนอาหารแข็งจะแตกกิ่งออกเป็นเส้นสายชนิดเดียว หรือสองชนิด ซึ่งเรียกว่า substrate และ mycelium ก็ได้ ซึ่ง substrate mycelium นั้นเกิดขึ้นก่อนบนอาหาร แล้วแทงเข้าไปในอาหารเพื่อที่จะนำสารอาหารไปใช้ได้อย่างเต็มที่ เมื่อโคโลนีเจริญขึ้น aerial mycelium จะมีขึ้นในสภาวะพิเศษ เช่น ขาดน้ำ ขาดธาตุอาหาร หรือมีการสะสมของ inhibition compound ดังนั้น aerial mycelium จึงต้องมี hydrophobic sheath เพื่อกันการสูญเสียน้ำ (Mendez *et al.,* 1985)

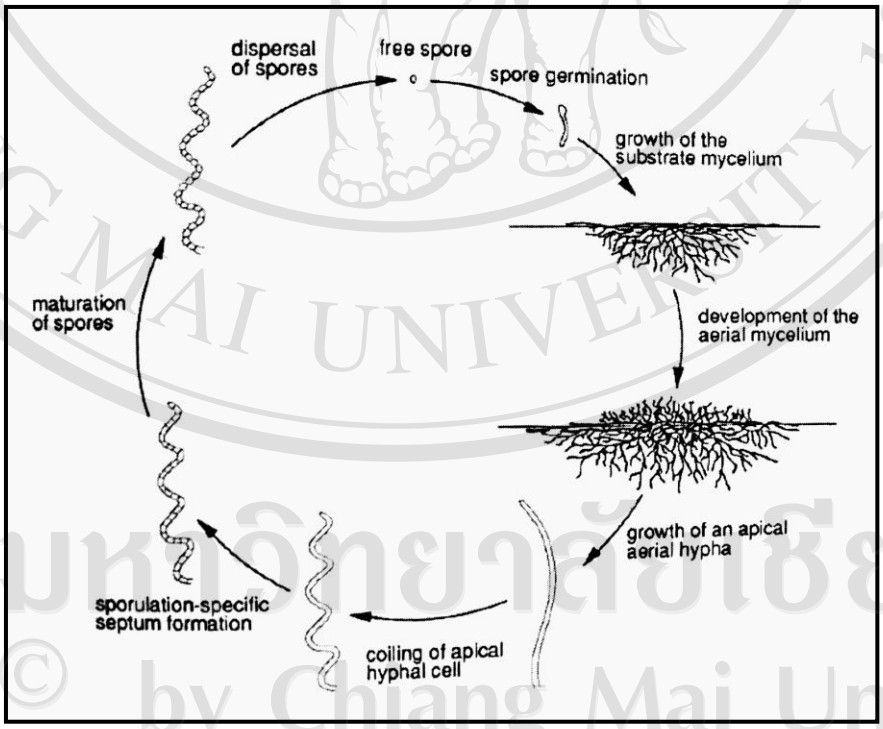
แอกติโนไมซีสสืบพันธุ์โดยการ fission หรือสร้างสปอร์พิเศษหรือโคนีเดีย มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียแท้จริงทั้งขนาด (1 ไมโครเมตร) ส่วนประกอบทางเคมี biochemical activities ไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริงเพราะ chromatin granules กระจายอยู่ทั่วทั้งเซลล์ ถูกทำลายโดย bacteriophage ได้ ไวต่อสารปฏิชีวนะที่มีผลต่อแบคทีเรีย แต่ดื้อต่อสารปฏิชีวนะที่มีผลต่อเชื้อรา สารของเซลล์ไม่มีไคติน และ เซลลูโลสที่พบในเส้นใยของราและสปอร์ (Waksman, 1967) โดยลักษณะสำคัญที่จัดแอกติโนไมซีสเป็นแบคทีเรียที่แท้จริงคือ มีเซลล์แบบ prokaryote และผนังเซลล์ประกอบด้วย peptidoglycan (*N*-acety1 glucosamine เชื่อมกับ *N*-acety1 muramic acid, *L*-2,6 diaminoqimelic acid, glycine และ alanine) แยกความแตกต่างของแต่ละจีนัสโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Holt *et al.,* 1994) แอกติโนไมซีสส่วนใหญ่เป็นพวก aerobe บางจีนัสเป็น facultative anaerobe หรือ obligate anaerobe บางจีนัสเป็นเชื้อสาเหตุก่อโรคในมนุษย์ สัตว์ และพืช และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บางจีนัสเป็น obligate symbiotic ในปมรากพืชและตรึงไนโตรเจนได้ เช่น จีนัส *Frankia* (สายสมร, 2547)

เชื้อแอกติโนไมซีส เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารจะพบลักษณะเส้นใยใต้ผิวอาหารที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.8 ไมโครเมตร สีของเส้นใยมีตั้งแต่ สีขาว ใสไม่มีสี สีเหลืองอ่อน สีน้ำตาลอ่อน แดง ชมพู ส้ม เขียว หรือสีดำ สามารถสร้างรงควัตถุ และอาจเปลี่ยนแปลงไปได้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเจริญเติบโต และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แอกติโนไมซีสต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและเป็นพวก chemoheterotrophic กล่าวคือ สามารถเจริญได้ดีในสภาพขาดแสงสว่าง และได้พลังงานจากอินทรีย์สาร (อานัฐ, 2551) แต่พบบางชนิดมีคุณสมบัติเป็น anaerobe ซึ่งต่างจากเชื้อรา และยีสต์ที่ไม่มีคุณสมบัติดังนี้

แอกติโนไมซีสเป็นแบคทีเรียที่มีสัณฐานวิทยา และกายภาพหลากหลายมาก แต่ส่วนใหญ่แล้วเป็นแบคทีเรียที่ต้องอาศัยออกซิเจน (aerobic) ได้อาหารจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ (saprophytic) ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) มีอยู่ทั่วไปทั้งในดิน น้ำ อากาศ พบมากในดินที่เป็นด่างเล็กน้อย อุดมด้วยสารอินทรีย์ (Porter, 1971)



ภาพ 4 วงจรชีวิตของเชื้อ *Streptomyces* (ที่มา: Chater *et al.,* 1996; ปริญญ์, 2551)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การจัดจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีส

แอกติโนไมซีส แบ่งออกได้เป็น 8 กลุ่ม ตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al*., 1994) ซึ่งได้แก่ group 22 – group 29 (ส่วนในกลุ่มที่ 1 – 21 นั้น เป็นกลุ่มของแบคทีเรีย) ซึ่งมีลักษณะที่สำคัญดังนี้

Group 22 Nocardioform Actinomycetes

เป็นกลุ่มที่มีลักษณะแตกต่างกัน สร้างเส้นใยสายสั้นๆ บางจีนัสสร้าง aerial mycelium และอาจสร้างสปอร์เป็นสายโซ่ แยกความแตกต่างของจีนัสโดยใช้องค์ประกอบของผนังเซลล์ และสาร mycolic acid ที่พบภายในเซลล์และลักษณะทางเคมีอื่นๆ ประกอบ แบ่งได้ 4 subgroup คือ

Subgroup 1 Mycolic – containing bacteria

Subgroup 2 *Psuedonocardia* และ related genera

Subgroup 3 *Nocardioides* และ Terrabacter

Subgroup 4 *Promicromonospora* และ related genera

Group 23 Genera with multilocular sporangia

แอกติโนไมซีสในจีนัสนี้สร้างเส้นใยที่มีผนังกั้นตามขวาง สปอร์ที่มีลักษณะทรงกลม อาจเคลื่อนที่ได้ เช่น *Dermatophilus* และ *Geodermmatophilus* หรือเป็นแบบไม่เคลื่อนที่ เช่น *Frankia*

Group 24 Actinoplanetes

สร้างเส้นใยที่คงทน (Stable filament) อาจจะมี aerial mycelium น้อยถึงไม่มีเลยสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้อยู่ในสปอร์แรงเจีย เช่นในจีนัส *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Dactylosporangium* และ *Pilimelia* หรืออาจจะสร้างสปอร์เดี่ยวๆ ไม่เคลื่อนที่ เช่น *Micromonospora* หรือในบางกรณีสร้างสปอร์ที่เป็นสายโซ่สั้นๆ เช่น Catrllaspola ผนังเซลล์ของแอคติโนกลุ่มนี้ ประกอบด้วยสาร diaminopimelic acid แบบ *meso* - DAP และ glycine เมื่อวิเคราะห์น้ำตาลพบว่าเป็นน้ำตาล arabinose และ xylose

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Group 25 Streptomycetes and related genera

เป็นกลุ่มที่มีลักษณะแตกต่างกัน มีผนังเซลล์ที่ประกอบไปด้วย aminopimelic acid แบบ *LL* – DAP และ glycine บน aerial mycelium สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายโซ่ เช่น ในจีนัส *Streptomyces* และ *Streptoverticillium* ส่วนจีนัสอื่นๆ เช่น *Intrasporangium*, *Kineosporia* และ *Sporichthya* สร้าง aerial mycelium น้อยหรือไม่สร้างเลย และสปอร์มีหลายรูปแบบ

Group 26 Madolomycetes

มีการสร้างเส้นใยที่คงทนและสร้างสปอร์แบบไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เช่น จีนัส *Microbispora* (สร้าง 2 spores/chain) *Microtetraspora* (สร้าง 4 spores/chain) และ *Actinomadura* (มากกว่า 2 spores/chain) ส่วนจีนัสอื่นๆ สร้างสปอร์ใน sporangia พบใน *Streptosporangium* ผนังเซลล์ของแอกติโนไมซีสในกลุ่มนี้ ประกอบด้วยสาร *meso* – DAP แอกติโนไมซีสกลุ่มนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 subgroup คือ

Subgroup 1 Streptosporangium และ related genera

Subgroup 2 Actinomadura

Group 27 Thermomonospora and related genera

มี aerial mycelium เป็นเส้นใยแบบคงทน สร้างสปอร์เป็นคู่ ซึ่งอยู่เดี่ยวๆ ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี เช่น แอกติโนไมซีสในกลุ่ม *Thermomonospora* กลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสายโซ่ พบใน *Actinosynnema* และ *Nocardiopsis* ในบางกลุ่มสร้างโครงสร้างที่คล้ายสปอร์แรงเงีย พบใน *Streptoalloteichus* ผนังเซลล์แอกติโนไมซีสในกลุ่มนี้ประกอบด้วย *meso* – DAP ไม่พบ amino acid และน้ำตาล

Group 28 Thermoactinomycetes

มีการสร้างเส้นใยที่คงทน และสร้างสปอร์แบบเดี่ยวๆ บน aerial mycelium และ substrate mycelium แอกติโนไมซีสในกลุ่มนี้พบเพียงแค่จีนัสเดียวคือ *Thermoactinomyces* ทุกสปีชีส์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic) ผนังเซลล์ประกอบด้วยสาร aminopimelic acid แบบ *meso* – DAP แต่ไม่พบสาร amino acid หรือ น้ำตาลชนิดอื่นๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Group 29 Other genera

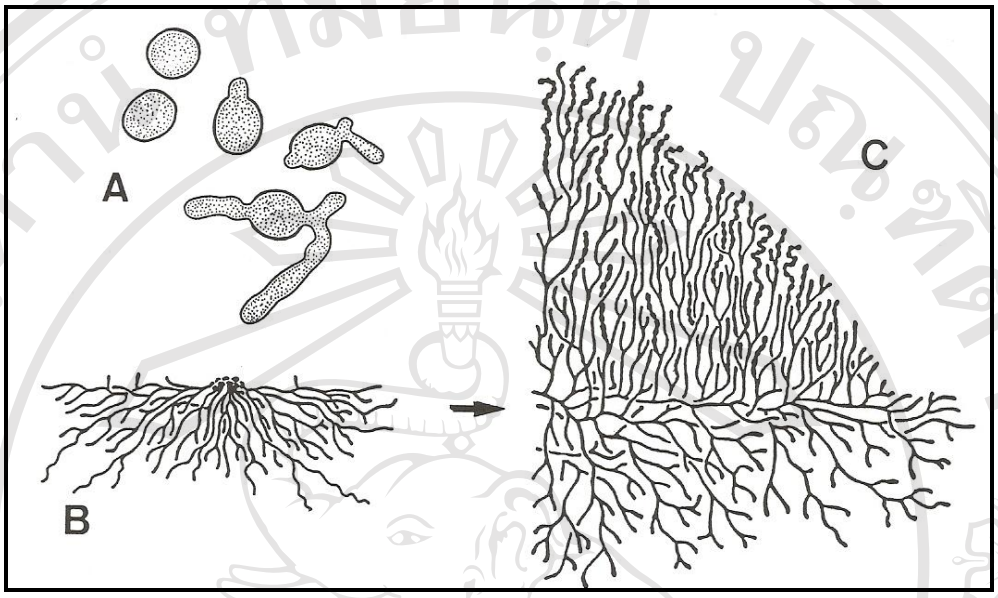
แอกติโนไมซีสในกลุ่มนี้มี 3 จีนัส ซึ่งมีลักษณะไม่เหมือนกับแอกติโนไมซีสในกลุ่มอื่นๆ สร้าง aerial mycelium ที่มีสปอร์เป็นสายโซ่ ไม่พบสาร mycolic acid ในเซลล์ ได้แก่ *Glycomyces*, *Kitasatosporia* และ *Saccharotrix*

1. ลักษณะทางสัณฐานของแอกติโนไมซีส (Morphology of actinomycete)

1. การสร้างตัวของโคโลนี (Formation of colony)

โคโลนีของแอกติโนไมซีสสร้างมาจากเส้นใย (mycelium) การเจริญของโคโลนีจะเริ่มตั้งแต่การใส่เชื้อ คือ single spore, sporangium และชิ้นส่วนของเส้นใย ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เชื้อที่ใส่ลงไปจะมีการพัฒนาขั้นแรกโดยมีการสร้าง substrate mycelium หรือที่รู้จักกันในชื่อ primary หรือ vegetative mycelium การเจริญของเส้นใยจะเจริญลงในแนวดิ่งแทงทะลุลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจะสร้าง secondary mycelium หลังจากนั้นจะสร้าง aerial mycelium ชูขึ้นไปเหนือผิวหน้าอาหาร (ภาพ 5) (Kalakoutskii and Agre, 1976) ความแตกต่างระหว่าง aerial mycelium เป็นเส้นใยที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และ substrate mycelium เป็นเส้นใยที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน สามารถจำแนกได้ง่ายโดยการส่องดูใต้กล้อง light microscope โดยใช้ชิ้นส่วนของเชื้อวางบน cover slip พบว่า substrate mycelium จะมีลักษณะโปร่งแสงภายใต้ phase-dark ส่วน aerial mycelium จะมีการหักเหของแสงภายใต้ phase-bright แต่มีแอคติโนไมซีสบางสายพันธุ์ที่ไม่สร้าง aerial mycelium เช่น *Micromonospora* หรือ *Actinoplanes* อาจเป็นเพราะระยะการเกิด aerial mycelium ในวงจรชีวิตถูกจำกัดทำให้มีการสร้าง aerial mycelium ที่สั้น เช่นในกรณีของเชื้อ *Sporichthya*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 5 การพัฒนาของเส้นใยในเชื้อ *Streptomyces*; A: การงอกของสปอร์ B: ลักษณะการเกิดของเส้นใยใต้ผิวอาหาร และ C: ลักษณะการเจริญของโคโลนีและสปอร์บนเส้นใยเหนืออาหาร (ที่มา: Vobis, 1981; Wildermuth, 1970)

ลักษณะของโคโลนีอาจจะมีแบบยกตัวขึ้น (raised) หรือ แบนเรียบ (flat) บางครั้งอาจจะมีลักษณะคล้ายหนัง (leathery layer) ซึ่งมีตั้งแต่อ่อนนุ่ม และ เหนียวไปจนถึงแข็งมาก สีของโคโลนีมีตั้งแต่สีขาว (white), เหลือง (yellow), ส้ม (orange), แดงกุหลาบ (rose), แดง (red), ม่วง (purple), น้ำเงิน (blue), เขียว (green), น้ำตาล (brown) และดำ (black) ผิวหน้าของโคโลนีอาจมีลักษณะ smooth, ridged, wrinkled, granular หรือ squanmous ขนาดของโคโลนีขึ้นอยู่กับสปีชีส์ อายุ และสภาวะการเจริญเติบโต ซึ่งจะมีขนาดต่างๆ ตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลางระดับมิลลิเมตรไปจนถึงเซนติเมตร

2. ชนิดของการเกิดสปอร์ (sporulation type)

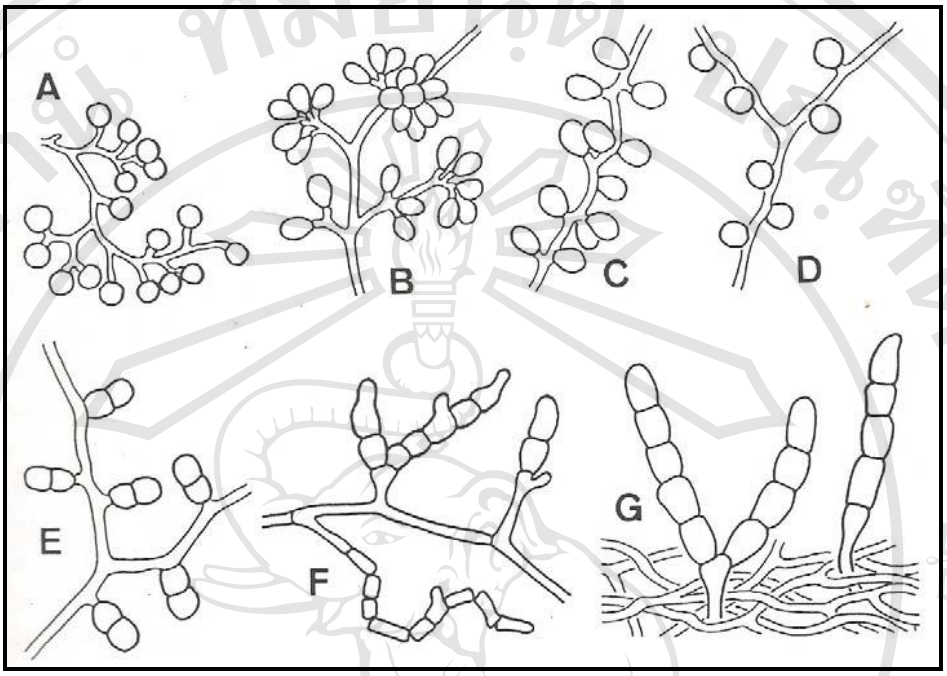
แอกติโนไมซีสสร้างสปอร์จากโครงสร้างพื้นฐาน 3 แบบ คือ แบบสปอร์เดี่ยว (single spore) แบบเป็นสายโซ่ (chain) หรือ sporangium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การสร้างสปอร์เดี่ยว (single spore)

รูปแบบการสร้างสปอร์เดียวนี้เรียกว่า monosporous รูปแบบนี้จะพบเป็นจำนวนมากในกลุ่มเชื้อทั่วไป (ภาพ 6) เช่นจีนัส *Micromonospora* พบว่า sporophore จะเกิดขึ้นบน substrate mycelium สปอร์จะมีลักษณะอยู่บนกิ่งสั้นๆ และจะเกิดการรวมตัวกันเป็นช่อ โดยการเกิดของ sporulation เริ่มจากเกิดการบวมบริเวณส่วนปลายของ hypha หลังจากนั้นจะมีการสร้าง septum และตามไปด้วยการสร้างผนังของสปอร์ ส่วนจีนัส *Thermomonospora* จะสร้างสปอร์เดี่ยวบน aerial mycelium ตรงบริเวณปลายของ sporophore มีทั้งที่แบบแตกกิ่ง และไม่แตกกิ่ง การแตกกิ่งซ้ำอีกครั้งจะนำไปสู่การสร้างตัวของกลุ่มสปอร์ การเกิด sporulation อาจเกิดได้ใน substrate hyphae เชื้อที่มีการสร้างสปอร์แบบเดี่ยวอีกชนิดคือจีนัส *Saccharomonospora* ซึ่งจะพัฒนาและสร้างสปอร์เดี่ยวบน aerial mycelium ส่วน sporophore ไม่มีการแตกกิ่ง และจะสร้าง ovoid spore บริเวณปลายสั้นๆ ของมัน (Cross, 1970 ; McCarthy, 1989a, b) และจีนัส *Thermoactinomyces* มีการพิจารณาว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับจีนัส *Bacillus* มากกว่าแอกติโนไมซีสชนิดอื่นๆ การเกิดของ hypha เหมือนกับการเกิดใน sporoactinomycete และจีนัส *Thermoactinomyces* มีลักษณะเหมือนจีนัส *Bacillus* คือ จะสร้าง true endospore ที่ทนต่อความร้อนสูงและมีแคลเซี่ยมสูง มีการสร้างสปอร์บน substrate mycelium และ aerial mycelium (Lacey, 1989)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



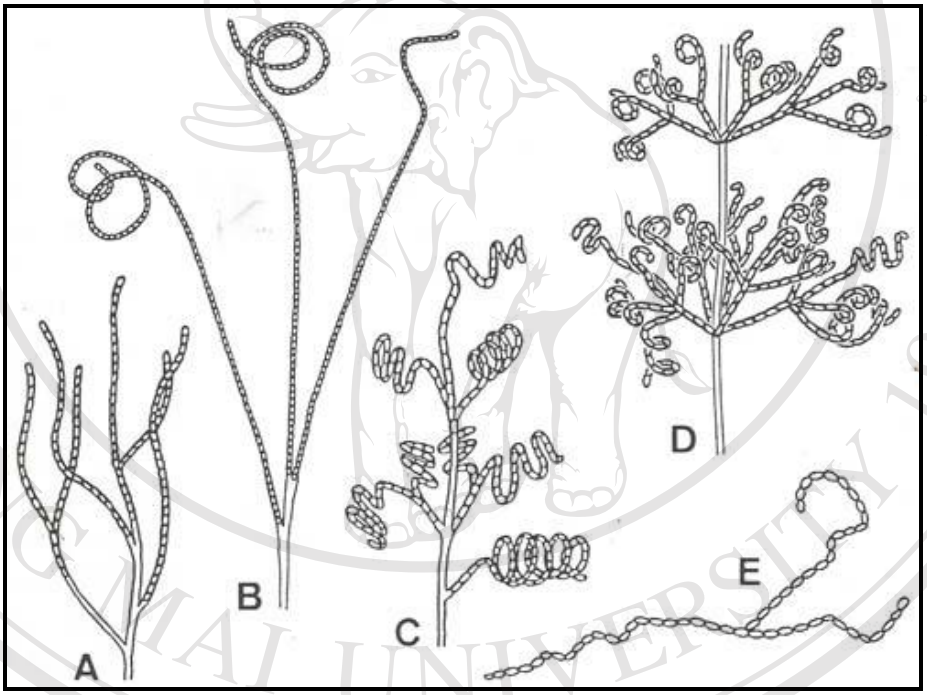
ภาพ 6 ลักษณะของสปอร์แบบเดี่ยว (single spore) และสปอร์สายสั้น (short chains) Monospora; A: *Micromonospora*, B: *Thermomonospora*, C: *Saccharomonospora*, D: *Thermoactinomyces* Dispora, E: *Microbispora* Oligosporous, F: *Nocardia brevicatena* และ G: *Catellatospora*
(ที่มา: Vobis, 1981; Wildermuth, 1970)

2. การสร้างสปอร์แบบสายโซ่ (chain)

รูปแบบการสร้างสปอร์แบบสายโซ่ เกิดจากเส้นใยของ hypha โดยจะมีการแบ่งผนังเซลล์ออกเป็นช่องๆ และแต่ละช่องสามารถเปลี่ยนเป็นรูปไปเป็นสปอร์ได้ การสร้างสปอร์แบบนี้เกิดขึ้นในกลุ่มแอกติโนไมซีสส่วนใหญ่ สปอร์แบบสายโซ่สามารถแบ่งตามสัณฐานวิทยา คือ ความยาวหรือจำนวนสปอร์สายโซ่แบบ dispora จะมีสปอร์เป็นคู่ คือ จีนัส *Microbispora* เป็นตัวแทนของสปอร์กลุ่มนี้ ลักษณะของสปอร์คือ สปอร์มีลักษณะทรงกลมรูปไข่ 2 สปอร์ต่อกัน จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร และจะมีความหนามากกว่า hyphae ของโคโลนี 3 – 4 เท่า ซึ่งจะอยู่บน aerial mycelium หรืออยู่บน sporophore ที่สั้นๆ (ภาพ 6) การสร้างสปอร์จะเริ่มจากการแตกหน่อด้านข้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความยาวของ hypha ทำให้เกิดกิ่งสั้นๆ ด้านข้าง หลังจากนั้นจะเกิดการพองบวมขึ้นและแบ่งตัวออกจากศูนย์กลาง แอกติโนไมซีสที่สร้างสปอร์แบบ oligosporous จะสร้างสปอร์แบบสายโซ่สั้น ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะมีประมาณ 7 ถึง 20 สปอร์ต่อโซ่ อย่างน้อยที่สุดต้องมี 3 สปอร์ แม้ว่าบางสปีชีส์อาจสร้างสปอร์ได้มากถึง 30 สปอร์ เช่นในสปีชีส์ *Nocardia brevicatena* จะสร้างสปอร์สายโซ่สั้นตั้งแต่ 2-7 สปอร์ ทั้งใน substrate และ aerial mycelium sporophore และสายโซ่สปอร์จะมีการแตกกิ่งเกิดขึ้นด้วย (ภาพ 6) ในสปีชีส์ *Sacoharopolyspora rectirtrgula* (Korn-Wendisch *et al*., 1989)



ภาพ 7 ลักษณะของสปอร์สายยาว (long chain) Streptomyces; A: *Rectiflexibiles* type, B: *Retinaculiaperti* type, C: *Spira* type, D: *Verticillati* type *Nocardiopsis* และ E: fragmenting branched aerial hypha
(ที่มา; Hutter, 1967)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอกติโนไมซีสที่มีการสร้างสปอร์แบบสายโซ่ยาว (polysporous) จีนัส *Streptomyces* เป็นตัวอย่างที่ดีในการศึกษาสปอร์ในกลุ่มนี้ เนื่องจากจะสร้างสปอร์สายโซ่ยาวโดยมีสปอร์มากกว่า 50 สปอร์ (Cross, 1970) โดยจะสร้างสปอร์บน aerial mycelium และสามารถจำแนกลักษณะของสายสปอร์ดังนี้ (ภาพ 7)

A. *Rectiflexibiles*: สายโซ่ของสปอร์เป็นแบบเส้นตรง (straight) หรือเป็นแบบโค้งงอ (flexuous) อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

B. *Retinaculiaperti*: สายโซ่จะเป็นห่วง (hook) แบบห่วงเปิดแบบสั้น หรือม้วนเป็นวงกลมประมาณ 1-3 วง

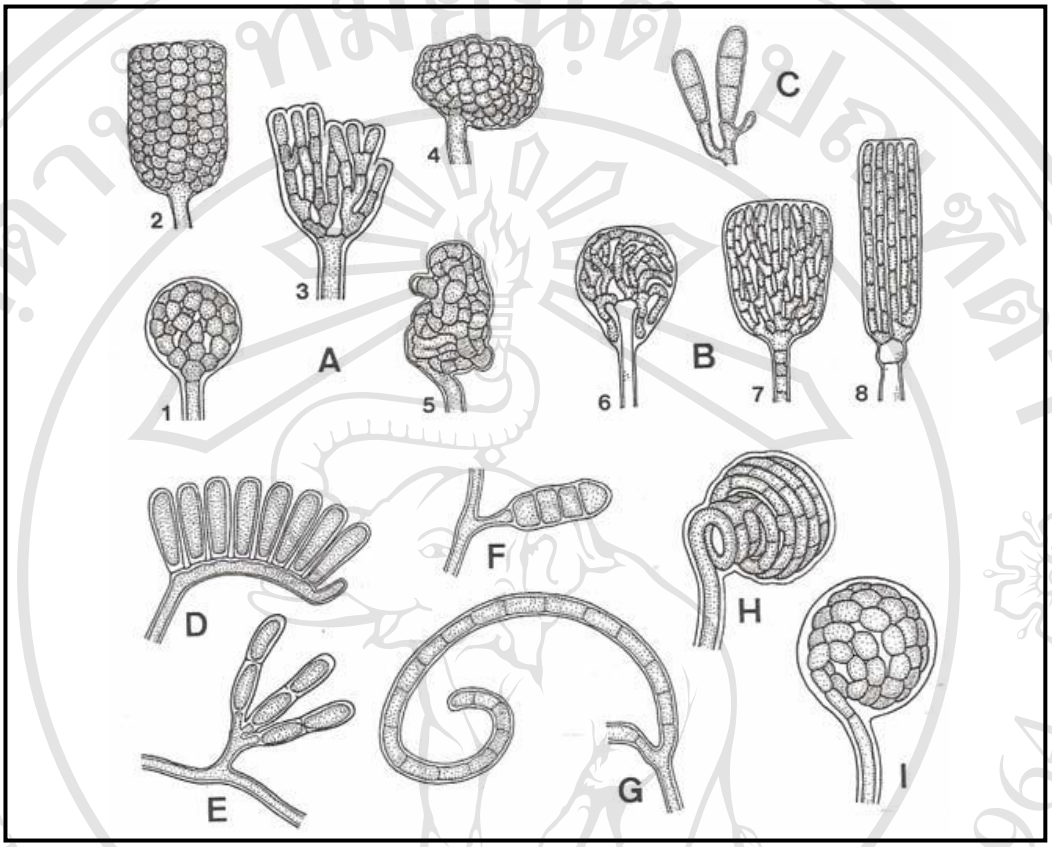
C. *Spira*: สายโซ่สปอร์แบบเกลียว (spiral) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ a) แบบปิด และเกลียวอัดกันแน่น b) แบบเปิด เกลียวยาวและขยายออก

D. *Verticillati*: สายโซ่สปอร์ปีนแบบเกลียวก้นหอย และมีการแตกกิ่งออกมาเหมือนร่ม จีนัส *Nocardiopsis* ก็มีการสร้างสปอร์แบบสายโซ่ยาว ซึ่งจะมีการสร้าง aerial hypha เป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปเส้นตรง (straight), โค้งงอ (flexuous) หรือ ซิกแซก (zigzag) ชิ้นส่วนของสปอร์ที่สมบูรณ์จะมีความยาวหลายขนาด (Meyer, 1989)

3. การสร้างสปอร์ภายใน sporangium

มีหลายจีนัสที่มีความแตกต่างกันในการสร้างเยื่อหุ้มสปอร์ใน sporangium ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายถุง และสปอร์จะมีการพัฒนาอยู่รวมกันภายในถุงนี้จนกว่าจะถูกปล่อยออกไป sporangium มีความแปรผันทั้งในเรื่องของขนาดและรูปร่าง ขนาดของ sporangium จะอยู่ระหว่าง 2 – 50 ไมโครเมตร ซึ่งโดยปกติแล้วมักจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร และรูปร่างจะมีทั้งแบบ cylindrical, clavate, tubular, bottle-shaped, campanulate, digitate, irregular, lobare, umbelliform, pyriform หรือ globose (ภาพ 8) การสร้าง sporangium จะสร้างบน aerial mycelium และ substrate mycelium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 8 ลักษณะการสร้างสปอร์ภายใน sporangium

การสร้าง sporangium จะสร้างบน aerial mycelium

A: *Actinoplanes* (including *Ampullariella*); polysporous,

1) globose, 2) cylindrical, 3) lobate, 4) subglobose, 5) irregular

B: *Pilimelia*;

6) ovoid, 7) campanulate, 8) cylindrical;

C: *Dactylosporangium*; oligosporous, claviform.

การสร้าง sporangium จะสร้างบน substrate mycelium

D: *Planomonospora*; monospora, clavate, E: *Planobispora*; disporous, cylindrical, F: *Planotetraspora*; tetrasporous, cylindrical, G: *Planopolyspora*; polysporous, tubular H: *Spirillospota*; polysporous, globose และ I: *Streptosporangium*; polysporous, spherical

(ที่มา; Vobis, 1981; Wildermuth, 1970)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. โครงสร้างในการสืบพันธุ์แบบอื่นๆ

การเกิดของสปอร์บางชนิดยากที่จะจัดจำแนก เนื่องจากมีความแตกต่างในสัณฐานวิทยา ซึ่งกรณีนี้รวมไปถึง hyphae ของจีนัส *Intersporangium* ซึ่งจะมีถุง vesicle อยู่ระหว่างกลางและในบริเวณส่วนปลาย ซึ่งแต่ละอันก็จะมีลักษณะโครงสร้างภายในที่พิเศษเฉพาะในแต่ละอัน (Kalakoutskii, 1989) Thick-walled chlamydospore สามารถพบได้ในเส้นใยของ *Actinosporangium violaceum* (Krasil'nikov, 1981) โครงสร้างสปอร์แบบ globose body และ spherical พบแค่เพียง 2 จีนัส คือ *Dactylosporangium* และ *Catellatospora* (Thiemann *et al*., 1967; Asano *et al*., 1989) ในจีนัส ที่มีการสร้าง sporangium เช่น *Actinoplanes, Ampullariella* และ *Pilimelia* เหล่านี้จะสร้าง sporangium ที่ไม่สมบูรณ์ โดย sporogenous hypha ยังคงจะมีการสร้างตัวอยู่บนบริเวณส่วนปลายของ hypha แต่พบว่าไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ ถ้าหาก sporogenous hypha เป็นแบบ fragment จะทำให้สปอร์จัดเรียงเป็นแถว และสปอร์ที่มีการพัฒนาแบบอิสระนี้จะไม่มีการสร้าง flagella ดังนั้นจึงเรียกว่า conidia ในขณะที่ supporting hyphae จะถูกเรียกว่า conidiophore (Couch, 1963; Vobis, 1992) ซึ่งลักษณะที่คล้ายกันนี้จะเกิดในจีนัส *Kibdelosporangium* ซึ่งจะมีโครงสร้างเหมือน Sporangium (Shearer *et al*., 1989)

2. ลักษณะทางเคมีที่ใช้ในการจัดจำแนกแอกติโนไมซีส (Chemical grouping of actinomycete)

การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีมีความจำเป็นเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อแอกติโนไมซีสที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันหรือในกรณีที่ไม่มีการสร้างสปอร์ (Lechevalier, 1968; Hasegawa *et al*., 1983) ได้เสนอการแบ่งกลุ่มของเชื้อแอกติโนไมซีส โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ ลักษณะส่วนประกอบของผนังเซลล์ คือ cell wall diaminopimeric acid isomer (A_2pm) และ whole-cell sugar ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางและใช้เป็น taxonomic marker โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อใช้แยกความแตกต่างขององค์ประกอบผนังเซลล์ (cell wall type) คือ *LL* และ *meso* isomer ของ diaminopimelic acid (DAP) และความแตกต่างขององค์ประกอบของน้ำตาลที่ผนังเซลล์ (whole cell sugar pattern) เช่น galactose, arabinose, xylose, mannose, glucose, และ ribose เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 รูปแบบขององค์ประกอบของน้ำตาลที่ผนังเซลล์ (whole cell sugar pattern)

Type	Diagnostic
A	galactose, arabinose
B	madurose, no arabinose or xylose
C	none
D	xylose, arabinose

(ที่มา; Lechevalier and Lechevalier (1970)

ตาราง 3 การจัดจำแนกและแบ่งกลุ่ม โดยใช้ลักษณะทางเคมี

Genus	A2pm isomer	Whole-cell sugar pattern	Cell Wall Type
Streptomyces *Sporichthya* *Streptoverticillium* *Microellobospora* *Nocardioides*	*LL*	No characteristic sugar pattern	I
Actinoplanes *Micromonospora* *Ampullariella* *Dactylosporangium,* *Amorphosporangium*	*meso*	D	II
Thermoactinomyces *Geodermatophilus* *Actinobifida* *Nocardiopsis*	*meso*	C	III
Dermatophilus, *Planomonospora,* *Streptosporangium,* *Microbispora,* *Spirillospora,* *Nocardiamadurae type - Actinomadura*	*meso*	B	III
Mycobacterium *Thermomonospora* *Nocardia* *Pseudocardia* *Micropolyspora*	*meso*	A	IV

(ที่มา; Microbiology procedure, 2009)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

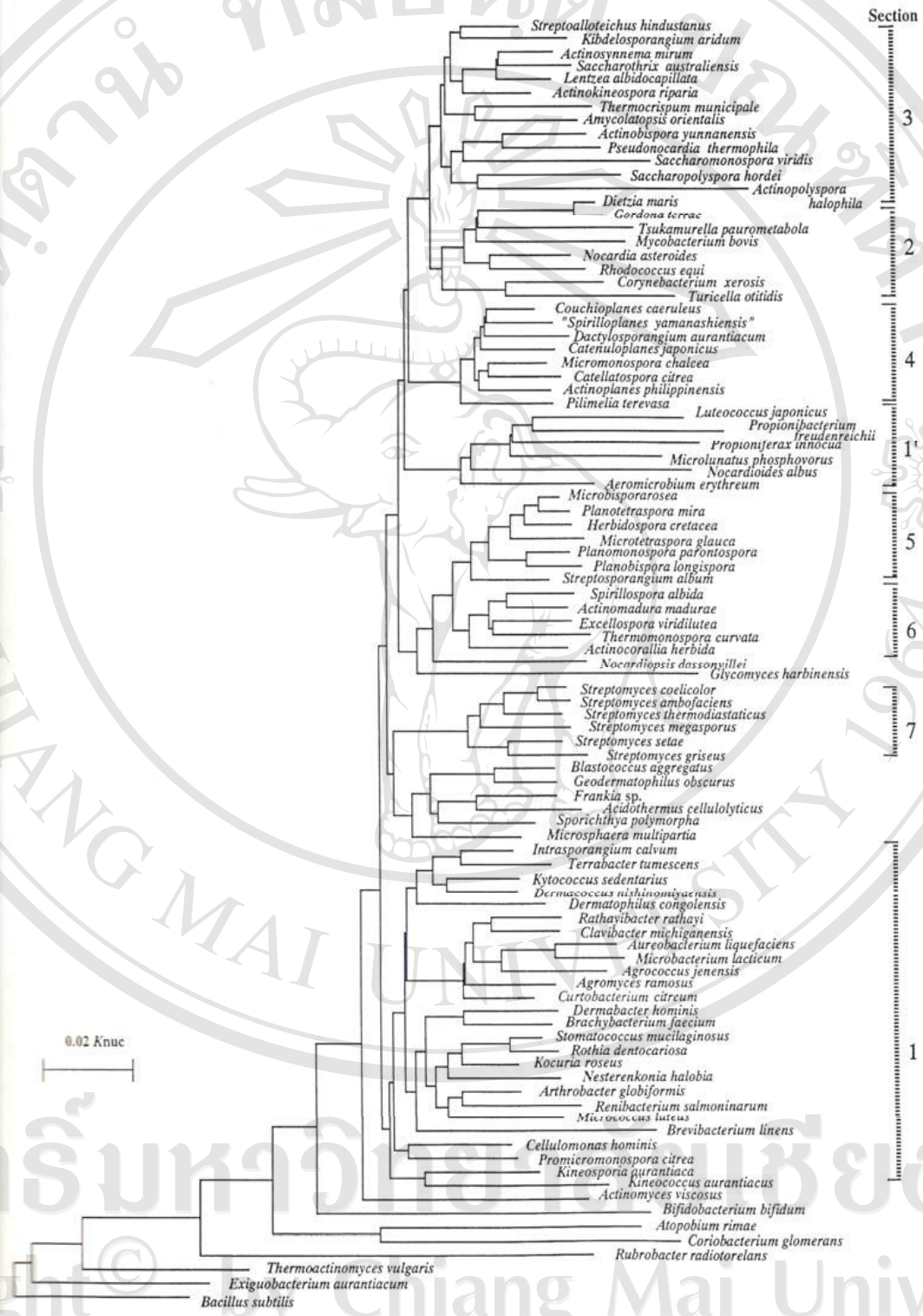
3. การจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล โดยใช้เทคนิค 16S rDNA sequencing

DNA sequencing analysis คือ การตรวจหาการเรียงตัวของลำดับเบส เป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยตรง โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้งสี่ชนิด (A, G, C, T) ที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอ ผลที่ได้จากการทำ DNA sequence สามารถบอกได้ถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเกิด transversion transition silent หรือ selected ของยีน และยังใช้เป็นเครื่องวัดระดับ nucleotide base (Takamatsu, 1998) การใช้เทคนิค DNA sequencing analysis ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) (นันพนา, 2549)

4. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแอกติโนไมซีส (Phylogenetic relationshipof actinomycete)

ปัจจุบันได้มีความก้าวหน้าทางเทคนิคชีวโมเลกุล มาช่วยในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ และพบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสมีความสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Micrococus* และ *Arthrobacter* และในแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ยังไม่สามารถแยกแอกติโนไมซีสออกจากกิ่งของแบคทีเรียได้ ด้วยเหตุนี้ การศึกษาหาความสัมพันธ์โดยใช้เทคนิค 16S rRNA sequence จึงมีความสำคัญมากที่นำมาใช้ในการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียและแอกติโนไมซีส Yokota (1997) สามารถจำแนกแอกติโนไมซีสและแอคติโนแบคทีเรียได้ทั้งหมด 102 จีนัส และนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ได้ทั้งหมด 90 จีนัส (ภาพ 9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 9 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแอกติโนไมซีส 90 จีนัส โดยใช้เทคนิค 16S rRNA sequence (ที่มา: Yokota *et al*., 1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Polymerase Chain Reaction (PCR) (วรรณา และคณะ, 2548)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ polymerase chain reaction เรียกสั้นๆ ว่า PCR เป็นเทคนิคพื้นฐานทางอณูชีววิทยา (molecular biology) ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุ์กรรมหรือ DNA ในหลอดทดลอง จากปริมาณ DNA ที่ใช้เป็นแม่แบบ (DNA template) เพียงเล็กน้อย จนได้ผลผลิตเป็นพันล้านโมเลกุล

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยสารตั้งต้นที่สำคัญ ดังนี้

1. DNA แม่แบบ หรือ DNA แม่พิมพ์ (DNA template)
2. DNA สายเริ่มต้นขนาดสั้นๆ เรียกว่า ไพรเมอร์ (primer)
3. นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) หรือเบส
4. เอนไซม์ DNA โพลีเมอเรส (DNA polymerase)
5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)
6. บัฟเฟอร์ (buffer)
7. น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

การทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

1. การแยกดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิสูง 94 - 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 - 60 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอ คลายเกลียวคู่ออกจากกันเป็นสายเดี่ยว และทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ
2. การจับของสายไพรเมอร์ (primer annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 50 - 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 - 60 วินาทีเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบในบริเวณที่ลำดับเบสเข้าคู่กัน
3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการต่อสายไพรเมอร์ (primer extension) โดยใช้อุณหภูมิ 70 - 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 - 120 วินาที ขึ้นอยู่กับความยาวของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ขั้นตอนนี้เอนไซม์ DNA polymerase จะทำหน้าที่นำเบส (A, T, C, G) ที่เข้าคู่กับ DNA แม่แบบมาต่อเข้าที่ปลายของสายไพรเมอร์ทั้งสองเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่

ปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนหลักรวมเรียกว่า 1 รอบ พีซีอาร์ (PCR cycle) เกิดขึ้นโดยนำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมดังกล่าวข้างต้นเข้า เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ ซึ่งเป็นเครื่องที่สามารถเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง - ต่ำ ได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งกำหนดจำนวนรอบและเวลาสำหรับปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนได้อย่างอัตโนมัติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปฏิกิริยา PCR จะเกิดขึ้นซ้ำๆ ประมาณ 25 - 40 รอบ โดยสายดีเอ็นเอสังเคราะห์ขึ้นในแต่ละรอบจะถูกใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในรอบต่อๆ ไปจนสิ้นสุดปฏิกิริยา ดังนั้นผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จึงเพิ่มเป็นทวีคูนเรียกการเพิ่มจำนวนแบบนี้ว่า exponential amplification ซึ่งคำนวณได้เท่ากับ 2^n (n คือจำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา) ตัวอย่างเช่น ถ้าทำปฏิกิริยา 35 รอบ จะมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2^{35} หรือประมาณ 34 พันล้านเท่าของปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น

โดยสรุปปฏิกิริยา PCR เป็นเทคนิคพื้นฐานทางอณูชีววิทยาที่ใช้เพิ่มประมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้ดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยจนได้ผลผลิตเป็นพันล้านโมเลกุล มีขั้นตอนการทำที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว นับเป็นเทคโนโลยีที่มีความสำคัญต่อการศึกษาค้นคว้าวิจัยและพัฒนาความรู้ทางด้านชีวโมเลกุล และสามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะทางด้านการแพทย์ เกษตรกรรม และอุตสาหกรรม นอกจากนี้หลักการของปฏิกิริยา PCR ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้และพัฒนาเป็นเทคโนโลยีอณูชีววิทยาขั้นสูงได้ต่อไปอีกมากมาย

การแยกเชื้อบริสุทธิ์และการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอกติโนไมซีส

การแยกแอกติโนไมซีสบนอาหารที่จำเพาะผสมร่วมกับสารปฏิชีวนะ เป็นการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียบางกลุ่มที่ไม่ต้องการ เพื่อให้เชื้อแอกติโนไมซีสซึ่งเจริญเติบโตช้ากว่าที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญออกมา การจำแนกชนิดของแอกติโนไมซีสโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้แก่ ลักษณะโคโลนี โดยสามารถสังเกตด้วยตาเปล่า และตรวจดูลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การสร้างสปอร์สามารถจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีสได้ในระดับจีนัส ส่วนในการจำแนกในระดับสปีชี่ส์ ต้องอาศัยการตรวจสอบหลายๆ ด้านประกอบกัน ได้แก่ ชนิดของกรดอะมิโนภายในผนังเซลล์ (DAP) ลักษณะของน้ำตาลใน whole cell hydrolysate และการตรวจสอบในระดับโมเลกุลเป็นต้น (Lechevalier, 1968 อ้างโดย Holt *et al*., 1994) เริ่มมีการศึกษาแอกติโนไมซีสในศตวรรษที่ 19 และพิสูจน์ให้เห็นว่าแอกติโนไมซีสที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสามารถให้ประโยชน์แก่พืชได้ จากการศึกษาด้านการจำแนกแอกติโนไมซีสพบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสที่อาศัยอยู่ในพืชและอยู่ร่วมกับปรสิต (parasites) หรือ saprophytes ส่วนมากจะอยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* และ *Microbispora* (Matsukma *et al*., 1994; Okazaki *et al*., 1995; Matsumoto *et al*., 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Sardi *et al.* (1992) แยกเชื้อแอกติโนไมซีสจากรากพืชจำนวน 28 ชนิด บนอาหาร starch casein medium ที่ผสมสารปฏิชีวนะ nystatin และ cycloheximide พบว่าเป็นเชื้อ *Streptomyces* มากที่สุด 482 ไอโซเลท รองมาคือ *Nocardia, Strepverticillum, Micromonospora* และ *Streptosporangium* จำนวน 4, 2, 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ

Takao *et al*. (1995) ได้แยกเชื้อแอกติโนไมซีสจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 8 ชนิด บนอาหาร salt agar medium ที่ผสม yeast และผสมสารปฏิชีวนะเช่นเดียวกับ Sardi *et al.* (1992) พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสที่ได้คือ *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*, *Actinoplanes* และ *Thermonospora*

Shimizu *et al*. (2000) แยกแอกติโนไมซีสจากราก ลำต้น และใบ ของต้น rhododendron บนอาหาร IMA-2 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ amphotericin B, riphampin-viccillin solution และ heritage (Active ingradient : Azoxystrobin) หลังจากนั้นบ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 4 สัปดาห์ พบเชื้อแอกติโนไมซีสจำนวน 10 ไอโซเลท จากนั้นทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคของ rhododendron จากการทดลองพบว่า ไอโซเลท R-5 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora cinnamoni* และ *Pestalotiopsis sydowiana* ดีที่สุด โดยสามารถสร้าง inhibition zone ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางเคมีพบว่า ไอโซเลท R-5 จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces*

Coombs and Franco (2003) คัดเลือกแอกติโนไมซีสเอนโดไฟท์ จากรากของข้าวสาลีได้ทั้งหมด 38 สายพันธุ์ พบว่าเป็นกลุ่มของ *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora* และ *Nocardia* นอกจากนั้น Okazaki (2003) แยกเชื้อแอกติโนไมซีสเอนโดไฟท์จากพืชทั่วไปได้ทั้งหมด 246 สายพันธุ์ พบว่าเป็นจีนัส *Streptomyces*, *Microbispora*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinomadura* จำนวน 97, 57, 23, 18 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ

Takahashi and Omura (2003) ทำการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสเอนโดไฟท์จากใบไม้ร่วง 9 ชนิด ของพืชชั้นสูง พบว่า 32 สายพันธุ์ เป็นกลุ่ม *Streptomyces* 33 สายพันธุ์ เป็นกลุ่มของ *Microbispora* และอื่นๆ อีก 10 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นกลุ่ม rare actinomycetes

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Hideyuki *et al*. (2003) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของเชื้อแอกติโนไมซีสที่แยกได้จากประเทศอินโดนีเซียและประเทศญี่ปุ่น โดยใช้เทคนิคพื้นฐานทางโมเลกุลมาใช้ในการจัดจำแนกคือ 16S rDNA partial sequence homology ใช้เชื้อแอกติโนไมซีสทั้งหมด 1,128 ไอโซเลท ในแต่ละประเทศ จากการจัดจำแนกเบื้องต้นพบว่าประเทศอินโดนีเซียสามารถจำแนกได้ 790 ไอโซเลท และสามารถจำแนกได้ 9 แฟมมิลี่ 23 เจนเนอร่า 185 สปีชีส์ และตัวอย่างเชื้อแอกติโนไมซีสจากประเทศญี่ปุ่นจำแนกเบื้องต้นได้ 981 ไอโซเลท จัดจำแนกได้ 9 แฟมมิลี่ 22 เจนเนอร่า 207 สปีชีส์

Chitti *et al*. (2004) แยกเชื้อแอกติโนไมซีส สายพันธุ์ TT 1-11T จากพีทในประเทศไทย ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological) ลักษณะทางเคมี (chemotaxonomic) สามารถจัดจำแนกอยู่ในจีนัส *Micromonospora* และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ (phylogenetic) โดยใช้ 16S rDNA sequences เพื่อเป็นการยืนยัน จากการทดสอบพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *M. coerulea* และ Ying *et al*. (2006) แยกแอกติโนไมซีส สายพันธุ์ GY1 ที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยละลาย poly (vinyl alcohol) จากดินบริเวณบริษัทสิ่งทอและโรงงานผลิต PVA ประเทศจีน และจัดจำแนกแอคติโนมัยซีท สายพันธุ์ GY1 ว่ามีความคล้ายกับ *Streptomyces venezuelae* โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล 16S rDNA sequence และผลตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological) และลักษณะทางกายภาพ (physiological) เช่นเดียวกับ Meguro *et al*. (2006) ได้จำแนก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ MBR-52 ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S-rDNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *S. ciscaucasicus*. 99.6 เปอร์เซนต์ และ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ S-76 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces griseorubiginosus*,มากที่สุดถึง 99 เปอร์เซนต์ และมีกรดอะมิโนที่ผนังเซลล์แบบ LL-DAP พบสารประกอบน้ำตาล arabinose, galactose, madurose (Cao *et al*., 2004) และ นันพนา (2549) ได้รายงานว่า จากการแยกเชื้อแอกติโนไมซีส (AM 4/6) มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces* sp. CHR28 99 เปอร์เซนต์

มีการศึกษาแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากส้ม พบเชื้อ *Burkholderia cepacia, Citrobacter freundii, Achromobacter, Acinetobacter, Alaacligenes-Moraxella, Arthobacter, Bacillus, Corynebacterium, Enterobacter* และ *Pseudomonas* ที่แยกจาก xylem ของรากมะนาว (*Citrus jambhiri*) เช่นเดียวกับ Araujo *et al*. (2001) แยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากรากของส้มพบเชื้อ *Pantoea agglomerans, Bacillus pumilus* ในปี 2004 Lacava *et al*. ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส้มและแบคทีเรีย *Xylella fastidiosa* ที่เป็นสาเหตุของโรค citrus-variegated

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

chlorosis สามารถแยกเชื้อเอนโดไฟท์ได้ดังนี้ *Bacillus pumilus, Curtobacterium flaaumfaciens, Enterobacter cloacae, Methylobacterium, M. mesophilicum, Nocardia* sp., *Pantoea agglomerans, Streptomyces* sp., และ *Xanthomonas campestris* เชื้อดังกล่าวนี้พบแอกติโนไมซีสสองจีนัสนั้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อแอกติโนไมซีสสามารถเข้าไปอยู่อาศัยภายในต้นส้มได้

หน้าที่และความสำคัญของเชื้อแอกติโนไมซีส

เชื้อแอกติโนไมซีสจัดเป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญต่อมนุษย์มากชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะในจีนัส *Streptomyces* เนื่องจากเป็นกลุ่มที่พบมากในธรรมชาติ ที่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว ซึ่งหน้าที่สำคัญของเชื้อแอกติโนไมซีส ได้แก่

1. การย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ

เชื้อแอกติโนไมซีสในธรรมชาติส่วนใหญ่เจริญอยู่ในดิน มีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของอินทรีย์วัตถุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนประกอบของพืช และสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์อื่นๆ กล่าวคือ ในช่วงที่มีอินทรีย์วัตถุในดินมากจะมีพวกแบคทีเรีย และเชื้อราเจริญอยู่มาก ส่วนแอกติโนไมซีสจะเจริญตามมาในภายหลัง เพราะเชื้อแอกติโนไมซีสเจริญเติบโตได้ช้าจะเจริญได้ดีต่อเมื่อจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งได้ลดปริมาณลงแล้ว โดยช่วยย่อยสลายกรดอินทรีย์น้ำตาลต่างๆ แป้ง ไขมัน และ โปรตีน สำหรับแอกติโนไมซีสที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ได้เป็นอย่างดี พบว่าเป็นเชื้อในจีนัส *Streptomyces* มากที่สุด รองลงมาได้แก่ เชื้อแอกติโนไมซีสในจีนัส *Micromonospora, Streptosporangium, Nocardia* และ *Microbispora* (Alexander, 1977) นอกจากนี้ยังมีแอกติโนไมซีสที่สามารถย่อยสลาย cellulose ได้ดีที่อุณหภูมิสูงคือ แอกติโนไมซีสในจีนัส *Thermomonospora* และ *Streptomyces* เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Czoch and Mordarski, 1988)

สำหรับการย่อยสลายลิกนิน (lignin) ในธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็นกิจกรรมของเชื้อรา โดยเฉพาะเห็ดชนิดต่างๆ อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าแอกติโนไมซีสย่อยสลาย lignin ได้ เช่น จีนัส *Streptomyces* และ *Micromonospora* เป็นต้น ส่วนกรณีของไคตินนั้นพบว่า 90 เปอร์เซนต์ ของไคติน (chitin) จะถูกย่อยสลาย โดยแอกติโนไมซีสในจีนัส *Streptomyces* และ *Micromonospora* เช่นกัน แอกติโนไมซีสส่วนใหญ่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน และโปรตีนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้โดยแอกติโนไมซีสที่สามารถย่อยสลายแป้ง และโปรตีนได้ดี เช่น *Streptomyces Nocardia* และ *Micromonospora* เป็นต้น ส่วนการย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ paraffin, phenol, steroid และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

pyrimidine พบว่าเป็นกิจกรรมของแอกติโนไมซีสในจีนัส *Nocardia* มากกว่าจีนัสอื่น ส่วนเชื้อในจีนัส *Micromonospora* มีบทบาทในการย่อยสลาย chitin, cellulose, glucoside, pentosane และ lignin (Alexander, 1977)

2. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม

แอกติโนไมซีสบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม เชื้อแอกติโนไมซีสที่สร้างเอนไซม์ย่อยสลาย cellulose และ xylan ที่ใช้ในอุตสาหกรรมที่สำคัญ คือ *Thermomonospora* และ *Streptomyces* ส่วนเชื้อแอกติโนไมซีสที่สร้างเอนไซม์ย่อยสลาย chitin ที่สำคัญ ได้แก่ *S. griseus, S. antibioticus* และ *Amycolatopsis orientalis* (Czoch and Mordarski, 1988) เชื้อ *S. rubiginosus, S. bambergensis, S. violaceoniger* และเชื้อในกลุ่ม *Ampullariella* sp. ใช้ผลิตเอนไซม์ glucose-isomerase (Backe, 1983) นอกจากนี้ยังมีการผลิต thermostable-α-amylase โดยเชื้อ *Nocardiopsis* sp. (Stamford *et al.,* 2001) เพื่อนำไปใช้ในการย่อยแป้งในอุตสาหกรรม เอนไซม์ที่ได้สามารถทำงานได้ 100 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นอกจากความสามารถที่ผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมแล้ว ยังมีความสามารถย่อยสลายสารพิษต่างๆ เช่น การย่อยสลาย ariphatic-aromatic copolyester โดยเชื้อ *Thermomonospora fusca* (Witt *et al.,* 2001) เป็นต้น

3. ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตในรูปที่พืชนำไปใช้ได้

เชื้อแอกติโนไมซีสบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ เช่น เชื้อในจีนัส *Nocardia* และยังมีเชื้อแอกติโนไมซีสที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ คือ *Frankia* (Alexander, 1977) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความสามารถของเชื้อ *Streptosporangium* ที่แยกได้จากดินที่เป็นกรด โดยเชื้อกลุ่มนี้มีความสามารถผลิตกรดที่ช่วยละลายหินฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ ในกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดโดยการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งสามารถละลายหินฟอสเฟตได้ (Caroline, 1997)

4. ความสามารถในการนำไปควบคุมศัตรูพืช

มีรายงานการใช้เชื้อแอกติโนไมซีสในการควบคุเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคกับพืช เช่น เชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC108 ซึ่งสามารถผลิตเอมไซม์ไคติเนสที่มีสมบัติในการต่อต้านเชื้อราจึงมีการนำมาใช้ควบคุมเชื้อราโรคพืชอย่างกว้างขวาง นอกจากเอนไซม์ไคติเนสแล้ว เชื้อชนิดนี้ยังสามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อรา และสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ ดังนั้นจึงมีการใช้เชื้อชนิดนี้ในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช (Mahadevan and Crawford, 1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ

แอกติโนไมซีสเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และเภสัชกรรม นอกจากนี้ยังผลิตสารกำจัดแมลง สารปราบวัชพืช รวมไปถึงสารต้านมะเร็ง และสารกดระบบภูมิคุ้มกัน (Waksman and Lechevalier, 1962; Goodfellow *et al.,* 1988; Lazzarini *et al.,* 2000) จากข้อมูลของ Antibiotic Literature Database (ABL) รายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างโดยจุลินทรีย์ทั้งหมด 23,000 ชนิด พบว่ามาจากเชื้อรา 42 เปอร์เซนต์ *Streptomyces* 32.1 เปอร์เซนต์ แบคทีเรียอื่นๆ 10.8 เปอร์เซนต์ และแอกติโนไมซีสที่หายาก 16 เปอร์เซนต์ ซึ่งแบ่งเป็น Micromonosporaceae 38.1 เปอร์เซนต์ Pseudonocardiceae 15 เปอร์เซนต์ Thermonnosporaceae 14 เปอร์เซนต์ Nocardia 11 เปอร์เซนต์ Streptosporangiaceae 6 เปอร์เซนต์ Nocardioides 26 เปอร์เซนต์ และอื่นๆ อีก 13.3 เปอร์เซนต์ (Lazzarini *et al.,* 2000)

ตาราง 4 ตัวอย่างเชื้อแอกติโนไมซีสที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

โรค	เชื้อสาเหตุ	แอกติโนไมซีส	ที่มา
seed and root rot	*Pythium ultimum*	*Streptomyces lydicus* WYEC108	Yuan and Crawford, 1995
damping-off	*Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp.	*Streptomyces* sp.	Jones and Samac, 1996
basal rot	*Sclerotinia minor*	*S. viridodiasticus*	El-Tarabily, 2000
potato scab	*Streptomyces scabies*	*S. diastatochromogenes* PonSSII	Neeno-Eckwall *et al.,* 2001
wilt disease of banana	*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*	*S. violaceusniger* strain G10	Getha and Vikineswary, 2002
rice sheath blight, seedling blight	*Pellicularia sasakii, P. filamentosa*	*S. hygrosscopicus* 10-22	Pang *et al.,* 2002a
ear rot of maize	*Stenocarpella maydis*	*Streptomyces* spp.	Bressan and Figueiredo, 2005
yam leaf spot disease	*Colletotrichum gloeosporioides*	*Streptomyces* spp.	Soaers *et al.,* 2006
damping-off in sugar beet	*Sclerotium rolfsii*	*Streptomyces* spp.	Errakhi *et al.,* 2007

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อแอกติโนไมซีสที่ทำให้เกิดโรค

เชื้อแอกติโนไมซีสบางชนิด หรือบางสายพันธุ์นั้นสามารถเป็นตัวการก่อให้เกิดโรคทั้งในพืช สัตว์ และมนุษย์ได้ อย่างเช่นจากรายงานพบเชื้อ *Streptomyces luridiscabiei, S. puniciscabiei, S. niveiscabiei,* และ *S. acidiscabies* (Park *et al.,* 2003) ทำให้เกิดโรคในมั่นฝรั่ง และมีรายงานว่าเชื้อ *S. scabies* สามารถสร้างสาร thaxtomin ซึ่งทำให้เกิดพิษกับมันฝรั่ง (Doumbou *et al.,* 1998) นอกจากนั้นเชื้อ *S. somaliensis* (Nasher and Hay, 1998) และ *S. bikiniensis* (William *et al.,* 2003) ทำให้ก่อเกิดโรคได้ในมนุษย์

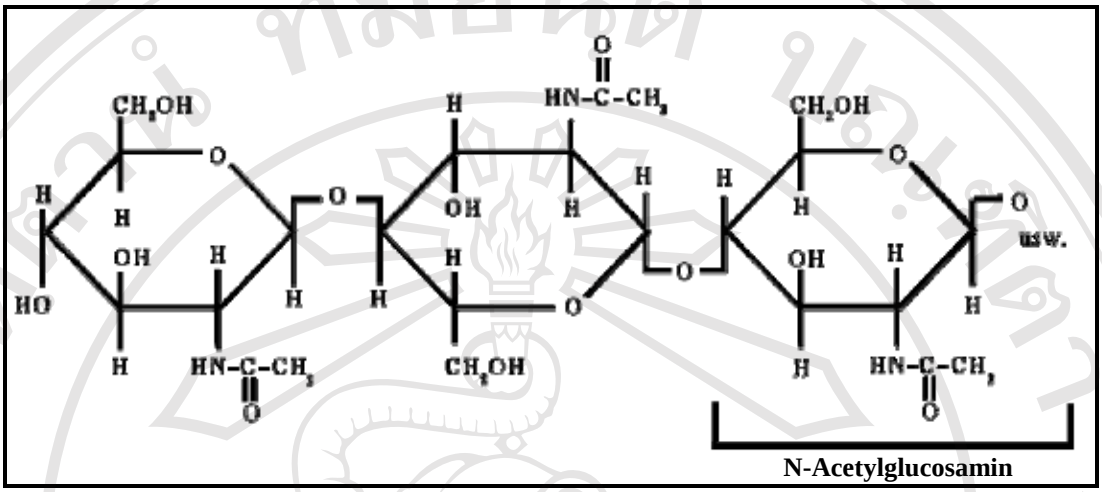
ไคติน (chitin)

ไคติน เป็นสารอินทรีย์ที่สำคัญในโครงสร้างของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง พวก แมลง กุ้ง ปู ตลอดจนเชื้อรา เห็ด และสาหร่ายสีเขียวบางชนิด เป็นต้น โดยปกติแล้วจะไม่พบไคตินบริสุทธิ์ในธรรมชาติ แต่จะเป็นของผสมรวมอยู่กับโปรตีน เกลือของสารประกอบอินทรีย์ เช่น แคลเซียม-คาร์บอเนต ($CaCO_3$) และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เช่น ในเชื้อรามีไคตินอยู่ประมาณ 20 - 44 เปอร์เซนต์ และสาหร่ายสีเขียวมีไคตินประมาณ 3 - 5 เปอร์เซนต์ แต่ไม่พบไคตินอยู่ในโครงสร้างของแบคทีเรีย (พูนศรี, 2532)

ลักษณะโครงสร้างไคติน (Muzzarelli, 1997; White, 1968)

ไคตินมีชื่อทางเคมีว่า poly-beta-(1,4)-2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose มีหน่วยย่อยคือ *N*-acetyl-*D*-glucosamine เชื่อมต่อด้วยพันธะ glycosidic bond ที่ตำแหน่ง beta-1,4 สูตรโมเลกุลคือ $(C_8H_{13}O_5)_n$ อนุพันธ์ของไคตินเรียกว่าไคโตซาน (chitosan) มีชื่อทางเคมีว่า poly-beta-(1,4)-2-amino-2-deoxy-*D*-glucose ได้จากกระบวนการ deacetylation เกิดจากการดึง acetyl group ออกจาก *N*-acetylglucosamine เป็น *D*-glucosamine

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 10 โครงสร้างทางเคมีของไคติน

(ที่มา: http://www.faunistik.net/DETINVERT/MORPHOLOGY/GEWEBE/IMAGES/chitin01.gif))

ในธรรมชาติเราจะพบไคติน 3 รูปแบบ ซึ่งแตกต่างกันที่การจัดตัวภายในสารของโมเลกุล ดังนี้ (Muzzarelli, 1977)

1.1 แอลฟาไคติน (α-chitin) การจัดเรียงตัวภายในโมเลกุลเป็นแบบวิ่งสวนทางกัน (antiparallel) มีพันธะไฮโดรเจนอยู่ในเส้นตรงเดียวกัน จึงเป็นโครงสร้างที่แข็งแรง แอลฟาไคตินพบได้ในเปลือกของแมลง และผนังเซลล์ของเชื้อรา

1.2 เบตาไคติน (β-chitin) การจัดเรียงตัวของบีตาไคตินจะไม่แข็งแรงเท่ากับแอลฟาไคตินเพราะเป็นแบบขนานวิ่งไปทางเดียวกัน (parallel) ทำให้มีความเสถียรต่ำ บีตาไคตินสามารถเปลี่ยนรูปเป็นแอลฟาไคตินได้โดยทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6N ในธรรมชาติบีตาไคตินจะพบได้น้อย

1.3 แกมมาไคติน (γ-chitin) การจัดเรียงตัวของโมเลกุลจะประกอบด้วย สายยาวของไคติน 2 สาย อยู่ในทิศเดียวกันต่อกับสายของไคตินอีกสายหนึ่งที่อยู่ในทิศตรงข้าม แกมมาไคตินสามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแอลฟาไคตินได้โดยทำปฏิกิริยากับลิเทียมไทโอโซยาเนต แกมมาคินพบได้ในเปลือกที่หุ้มตัวอ่อนที่เป็นดักแด้ของแมลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แหล่งของไคติน (Muzzarelli, 1977)

ไคตินเป็นสารอะมิโนโพลิแซคคาไรด์ที่ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลโครงสร้าง ที่พบมากเป็นอันดับรองจากเซลลูโลส มักพบในสิ่งมีชีวิตพวกพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยพบเป็นสารประกอบของโครงสร้างจำพวก ครัสเตเซียน เช่น เปลือกกุ้ง กระดองปู พวก Arthropod เช่น แมลง และ Mollusc เช่น กระดองปลาหมึก โดยจะรวมกันกับสารพวกโปรตีน และแร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) นอกจากนี้ ยังพบในผนังเซลล์ของเชื้อรา เห็ด ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยจะรวมอยู่กับโพลีแซคคาไรด์

คุณสมบัติของไคติน (Muzzarelli, 1977)

ไคตินมีคุณสมบัติที่เด่นชัดคือ ไม่ละลายในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป แต่ละลายในตัวทำละลายจำเพาะ เช่น กรดเกลือเข้มข้น และ anhydrous formic acid มีมวลโมเลกุล (molecular weight) 1.036×10^6 ดาลตัน ย่อยสลายได้ง่ายในตัวทำละลายกรด และย่อยสลายได้ที่อุณหภูมิมากกว่า 200 องศาเซลเซียส

ไคติเนส (chitinase)

ไคติเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolase ซึ่งจะย่อยสลายไคตินให้ได้เป็น *N*-acetyl-*D*-glucosamine อิสระ (Jeuniaux, 1966) เอนไซม์กลุ่มนี้ แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

1) Endo-chitinase หรือ chitinase (EC 3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ที่ตัดโพลิเมอร์ของ *N*-acetyl-*D*-glucosamine แบบสุ่มได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็น diacetylchitobiose และ triacetyl chotobiose บ้างเล็กน้อย (Shaikh and Dashpande, 1993)
2) Exo-chitinase หรือ *N*-acetylglucosaminidase หรือ chitobiase (EC 3.2.1.30) ซึ่งปัจจุบันถูกรวมไว้กับเอนไซม์ในกลุ่ม *N*-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.51) และจะย่อยสลายไคตินจากด้าน non-reducing end ได้เป็น chitobiose หรือ *N*-acetylglucosamine โมเลกุลเดี่ยว (Jeuniaux, 1966; Muzzarelli, 1977)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การแบ่งไคติเนส (chitiinase) ออกเป็น exo-chitinase และ endo-chitinase จะขึ้นอยู่กับชนิดของซับสเตรท เช่น *Streptomyces* sp. ซึ่ง chitinase complex จะย่อยสลาย pure crystalline beta-chitin ใน diatom spines ตรงปลาย non-reducing end เท่านั้น ได้ผลผลิตเป็น dimer คือ diacetylchitobiose เป็นส่วนใหญ่ ขณะที่ย่อยสลาย colloidal chitin แล้วจะได้ oligomer และ diacetylchitobiose ปนกัน (Shaikh and Dashpande, 1993)

คุณสมบัติไคติเนส (Muzzarelli, 1977; Ulhoa and Peberdy, 1991a, 1991b; Miyairi *et al.,* 1994)

คุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์ไคติเนส คือ ความจำเพาะและความเสถียรของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ (enzyme specificity) หมายถึง เอนไซม์ชนิดหนึ่งๆ จะมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทางเคมีได้เพียงอย่างเดียว อาจจะจำเพาะต่อสับสเตรท หรือสารที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ โดยที่เอนไซม์จะมี substrate binding active site หรือ catalytic site ที่เข้ากันได้ สับสเตรทบางชนิดอาจมีการชักนำให้รูปทรงของเอนไซม์เปลี่ยนไป เพื่อให้มีการรวมตัวกันได้อย่างเหมาะสมเรียกว่า induce fit

แหล่งของเอนไซม์ไคติเนส

ไคติเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตพวกพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อาจมีการสร้างขึ้นภายในเซลล์ตลอดเวลาในระดับต่ำ เรียกว่า constitutive enzyme หรือต้องมีตัวชักนำ เช่น ไคติน เรียกว่า inducible enzyme (Jeuniaux, 1966) หรือการรุกรานของเชื้อก็เป็นการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสด้วย (Sohlumbaurn *et al.,* 1986) การเติมไคตินลงในอาหารที่เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จะกระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไคติเนสเพิ่มมากขึ้น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ที่ผลิตไคติเนสก็เพื่อใช้ในการย่อยสลายไคติน เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหาร หรือป้องกันอันตรายจากการรุกรานของสิ่งมีชีวิตบางชนิด (นารีลักษณ์, 2542) ในเชื้อแอกติโนไมซีสพบว่า ไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบแต่สามารถผลิตไคติเนสได้ โดยเฉพาะ *Streptomyces* sp. (Gupta *et al.,* 1995)

แหล่งผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่สำคัญนิยมใช้จุลินทรีย์ เพราะสามารถผลิตได้ในปริมาณมากๆ และต้นทุนการผลิตต่ำ ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสทางการค้าได้แก่ *Streptomyces griseus, Streptomyces antibioticus, Serratia marcescens* และ *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes* A52 (Ohtakara, 1988)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประโยชน์ของเอนไซม์ไคติเนส (นิรัติ, 2539; Tsujibo *et al.*, 1993)

เอนไซม์ไคติเนสมีการนำมาใช้ประโยชน์หลายอย่าง เช่น

1. ไคติเนสที่พบในเมล็ดพันธุ์ พบว่าช่วยในการป้องกันเมล็ด และมีผลต่อแมลง หรือเชื้อราที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ
2. ใช้ในการเตรียม oligosaccharide ซึ่งเป็น biologically active substance
3. ใช้ในการเตรียม fungal protoplast
4. ใช้ในสารป้องกันกำจัดเชื้อรา และสารป้องกันกำจัดแมลง
5. ใช้ตรวจวัดไคติน และไคโตซานในเซลล์
6. มีความสำคัญในการย่อยสลาย chitin และนำกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่

การย่อยสลายไคตินโดย chitinolytic enzyme

เอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน ได้แก่ chitinase ซึ่งเป็น multi-complex enzyme โดยผลที่ได้จากการย่อยไคตินคือ *N*-acetyl-*D*-glucosamine เอนไซม์กลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยใหญ่ๆ ดังนี้

1) Endo-chitinase หรือ chitinase (EC 3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ที่ตัดโพลิเมอร์ของ *N*-acetyl-*D*-glucosamine แบบสุ่มได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็น diacetylchitobiose และ triacetyl chotobiose บ้างเล็กน้อย (Shaikh and Dashpande, 1993)

2) Exo-chitinase หรือ *N*-acetylglucosaminidase หรือ chitobiase (EC 3.2.1.30) ซึ่งปัจจุบันถูกรวมไว้กับเอนไซม์ในกลุ่ม *N*-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.51) และจะย่อยสลายไคตินจากด้าน non-reducing end ได้เป็น chitobiose หรือ *N*-acetylglucosamine โมเลกุลเดี่ยว

การแบ่ง chitinase ออกเป็น exo-chitinase และ endo-chitinase จะขึ้นอยู่กับชนิดของซับสเตรท เช่น *Streptomyces* sp. ซึ่ง chitinase complex จะย่อยสลาย pure crystalline beta-chitin ใน diatom spine ตรงปลาย non-reducing end เท่านั้น ได้ผลผลิตเป็น dimer คือ diacetylchitobiose เป็นส่วนใหญ่ ขณะที่ย่อยสลาย colloidal chitin แล้วจะได้ oligomer และ diacetylchitobiose ปนกัน (Shaikh and Deshpande, 1993)

ไคตินจะทำปฏิกิริยาบนตำแหน่งพันธะ beta-1,4-glycisidic แต่เนื่องจากไคตินมักอยู่ร่วมกับสารประกอบอื่นๆ เช่น โครงสร้างภายนอกของแมลงจะมีสารประกอบเชิงซ้อนของไคตินอยู่รวมกับโปรตีน แต่ในผนังเซลล์ของเชื้อราจะมีสารประกอบเชิงซ้อนของไคตินกับโปรตีน และกลูแคน ซึ่งทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้พันธะดังกล่าวมีความหลากหลายในธรรมชาติ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตสร้างเอนไซม์ไคติเนสที่มีคุณสมบัติความจำเพาะต่อสับสเตรท และให้ผลผลิตแตกต่างกันไปแบบจำเพาะด้วยเช่นกัน (Shaikh and Deshpande, 1993)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hsu and Lockwood (1975) ได้แยกเชื้อแอกติโนไมซีสจากดินและน้ำโดยใช้อาหารแข็งซึ่งประกอบด้วย 0.4% colloidal chitin และ mineral salt พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสสามารถเจริญได้ดี ส่วนแบคทีเรียและเชื้อราเจริญได้น้อย

Chernin *et al.* (1995) ได้ศึกษา chitinolytic activity จาก *Enterobacter agglomerans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในดินที่ต้านทานการเจริญเติบโตเชื้อราสาเหตุโรคพืช สามารถชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่สลายไคตินในอาหารที่มี colloidal chitin 0.2% w/v เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถตรวจพบเอนไซม์ทั้งหมด 3 ชนิด คือ *N*-acetyl-β-*D*-glucosaminidase, endo-chitinase และ chitobiosidase มีน้ำหนักโมเลกุล 89,000, 67,000 และ 59,000 ดาลตัน ตามลำดับ และใช้ *E. agglomerans* ต่อต้าน *R. solani* ซึ่งให้เกิดโรคในฝ้ายโดยทดลองในเรือนเพาะชำ พบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ 64 – 86 เปอร์เซนต์ และ *E. agglomerans* ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์จะไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้

ศิริลักษณ์ (2542) ศึกษาผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. โดยนำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อรา จำนวน 165 ไอโซเลท นำเชื้อราแต่ละไอโซเลทเลี้ยงในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) ซึ่งมี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บน้ำเลี้ยงโดยกรองเส้นใยออก จากนั้นนำน้ำเลี้ยงแต่ละไอโซเลทมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของราทั้ง 3 ชนิด โดยวิธี cylinder plate method พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. CK_{20}, *Trichoderma* sp. SC-23, *Basipetospora* sp. CK_{30}, *Aspergillus* sp. BB_4, *Fusarium* sp. D_4, *Trichoderma* sp. CT_{26}, *Fusarium* sp. CH_{12}, *Trichoderma* sp. SC-21 และ *Paecilomyces* sp. S1-11 ให้ผลยับยั้งเชื้อรา *Cladosporium* sp. โดยมีขนาดของวงใสเป็น 26.3, 16.7, 12.7, 12.3, 12.0, 10.3, 10.3, 9.3 และ 9.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ เชื้อรา *Alternaria* sp. P_{21} ให้ผลยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. โดยมีขนาดของวงใสเป็น 16.7 มิลลิเมตร เชื้อรา *Trichoderma* sp. CT_{26}, *Trichoderma* sp. CK_{20}, และ *Trichoderma* sp. SC-21 ให้ผลยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. โดยมีขนาดวงใสเป็น 26.0, 20.7 และ 11.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Xu *et al.* (1996) แยกและศึกษาความหลากหลายของเชื้อแอกติโนไมซีสในดิน จังหวัดยูนาน ประเทศจีน พบเชื้อแอกติโนไมซีสที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูง ได้แก่ *Streptomyces* และ *Thermoactinomyces* ซึ่งพบมาที่สุดถึง 97 เปอร์เซนต์ ของเชื้อแอกติโนไมซีส ทั้งหมด พบมากที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ขึ้นไป ในพื้นที่ป่าโดยเฉพาะป่าในเขตร้อน

Kim *et al.* (1999) พบสารปฏิชีวนะ As 1 A ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora capsici* โดยแยกจากน้ำเลี้ยงของเชื้อ *Streptomyces libani*

El-Tarabily *et al.* (2000) รายงานว่าเอนไซม์ β-1,3-glucanase และ ไคติเนส ที่สร้างจากเชื้อแอกติโนไมซีส สามารถลดการเกิดโรค basal drop ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotinia minor* โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีผลทำให้เส้นใยเหี่ยวแฟบ (plasmolysis) และทำให้ผนังเซลล์แตกสลาย (lysis)

Gomes *et al*. (2001) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสที่เจริญบนอาหาร solid colloidal chitin จากนั้นศึกษาลักษณะสัณฐาน และสรีรวิทยา พบว่าคือเชื้อ *Streptomyces* sp. จากนั้นเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. (RC1071) ในอาหาร colloidal chitin liquid pH 7 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำไปวิเคราะห์หา endochitinase พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 กิโลดาลตัน ทำการสกัดเอา endochitinase ที่ได้จาก *Streptomyces* sp. (RC1071) เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 7 ชนิด ได้แก่ *Fusarium solani, Fusarium graminearum, Fusarium* sp., *Aspergillus parasiticus, Fusarium oxysporum, Colletotrichum gloeosporiodes* และ *Magnaporthe grisea* ซึ่ง endochitinase ที่ได้นั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุได้

Thamthiankul *et al.* (2001) ได้ศึกษาไคติเนสที่ได้จาก *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani* พบว่า chitinase gene (*chiA*71) นี้ จะมี 1,905 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วย 635 amino acid และมีน้ำหนักโมเลกุล 71 กิโลดาลตัน จากการตรวจหาไคติเนสโดยใช้ SDS-PAGE หลังจาก denaturation พบ protein band ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ กัน คือ 66, 60, 47 และ 32 กิโลดาลตัน และในส่วน *N*-terminal พบว่าแต่ละ band จะมีลำดับเบสเหมือนกัน (Asp-Ser-Pro-Lys-Gln) น้ำหนัก 60, 47 และ 32 กิโลดาลตัน และในส่วนของ C-terminus มี 66 กิโลดาลตัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชนินทร (2544) ได้ทำการแยกเชื้อแอกติโนไมซีส จากรากข้าวและดินบริเวณรากข้าวพันธุ์สุพรรณหอมและสุพรรณ 60 โดยใช้อาหาร 3 ชนิด ได้แก่ traders protein agar สามารถแยกแอกติโนไมซีสได้หลากหลายและมากที่สุด แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliform* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคพืช พบว่าแอกติโนไมซีสที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phytophthora infestans, Rhizoctonia solani, Colletotrichum gloeosporioides, Pyricularia oryzae* และ *Fusarium oxysporum* ได้

Bordoloi *et al.* (2002) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ ซึ่งสกัดได้จากเชื้อ *Streptomyces* sp. พบว่าสามารถควบคุมโรคเหี่ยวจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum, F. moniliforme, F. semitectum, F. solani* และ *Rhizoctonia solani* ในพืชตระกูลกะหล่ำได้

Poalo (2002) ได้ศึกษาพัฒนาชุด selective primer สำหรับการทำ PCR เพิ่มปริมาณส่วนของ 16S rDNA ในแอกติโนไมซีสหลาย family ด้วยกัน ได้แก่ *Micromonosporaceae*, *Streptomycetaceae*, *Steptospororangiaceae* และ *Thermomonosporaceae* และในจีนัส *Dactylosporangium* โดยแต่ละชุดของ primer ที่ใช้นี้ เมื่อตรวจดู genomic DNA ที่ได้แล้ว พบว่ามีความเฉพาะเจาะจง (specific) สูงมาก และทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณยีน (amplify) ได้เป็นอย่างดี ผู้ทดลองยังได้มีการยืนยันผลการโดยการ clone ผลผลิต PCR ก็ยังพบว่าเกิดการเพิ่มปริมาณยีนได้ถึง 95 เปอร์เซนต์

Getha and Vikineswary (2002) ได้ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Streptomyces violaceusniger* strain G10 ยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 โดยวิธี dual culture พบวงใส (clear zone) บริเวณที่เส้นใยเชื้อราที่เจริญในระหว่างเชื้อทั้งสองชนิดนั้น เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยเชื้อราถูกย่อยสลาย จากนั้นน้ำเชื้อ *S. violaceusniger* strain G10 ในอาหารเหลวร่วมกับเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 พบเส้นใยเชื้อราแสดงอาการผิดปกติไม่มีการเจริญ

Sabaratnam and Traquair (2002) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากดินบริเวณรากมะเขือเทศ พบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคเน่าคอดินของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ทั้งการทดสอบกับเมล็ด และต้นกล้าได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ธงชัย (2003) ได้ศึกษาการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสจากส่วนต่างๆ ของพืชแล้วนำไปศึกษาลักษณะต่างๆ โดยอาศัย morphology, cell wall structure, nucleic acid gene sequence ของ 16S rDNA พบว่า *Streptomyces aurefaciens* เป็นตัวที่สร้างเอนไซม์ไคติเนสได้สูงสุด และสามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา *Colletotrichum musae* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วย และเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของพริกได้ และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแอกติโนไมซีส คือบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 1% colloidal chitin อุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส pH 6.5 - 7 และการเขย่าด้วยความเร็วรอบที่ 100 - 150 รอบต่อนาที

Zaki *et al.* (2003) ได้ศึกษา DNA-fingerprint และ phylogenetic ในเชื้อแอกติโนไมซีสที่สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ (chitinolytic actinomycetes) โดยในการศึกษานี้ ผู้ทดลองได้แยกเชื้อ chitinolytic actinomycetes บนอาหารวุ้นที่มีไคตินเท่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอน จำนวน 21 ไอโซเลท โดยจำนวนแอกติโนไมซีสที่พบทั้งหมดนั้น พบว่าเป็น active actinomycetes (halo-forming colonies) ซึ่งมีน้อยกว่า non-active actinomycetes (non-halo-forming colony) ส่วนในบริเวณ rhizosphere ของต้น *Alkanna orientales* จะสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ดีกว่าที่อื่น ส่วนการวิเคราะห์โดยเทคนิค RAPD โดยใช้ specific marker สำหรับ chitinolytic actinomycetes นั้น พบว่าไพรเมอร์ส่วนใหญ่มีความเฉพาะเจาะจง (specific) ในการจัดจำแนก (identify) ส่วน unique DNA polymorphisms ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดมี 30 RAPD-PCR marker ที่ใช้เป็น specific marker ส่วนการทำ phylogenetic relationship ระหว่างแต่ละไอโซเลทโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าแต่ละไอโซเลทมีความคล้ายคลึงกันสูงมาก

Bressan and Figueredo (2005) แยกเชื้อแอกติโนไมซีสจากดินบริเวณรากข้าวโพด พบเชื้อ *Streptomyces* sp. จำนวน 2 ไอโซเลท นำมาใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Stenocarpella maydis* สาเหตุโรค ear rot พบว่าไอโซเลท DAUFPE 11470 และ DAUFPE 14632 สามารถลดการเกิดโรคในระยะต้นกล้าได้ถึง 87.3 และ 85.6 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และสามารถเพิ่มเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดข้าวโพดได้

Boudjella *et al.* (2006) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสที่แยกได้จากดิน พบว่าเชื้อ *Streptosporangiam* Sg10 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อราได้เป็นอย่างดี

Hessan *et al.* (2006) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* 2 ไอโซเลท คือ S2 และ C ที่แยกได้จากดินแปลงปลูกข้าวสาลี เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคเน่าคอดินของ sugar beet พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Lumyong *et al*. (1996) ได้รายงานการแยก และคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสจากตัวอย่างดิน โดยแยกเชื้อได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลท จากนั้นได้นำไปทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนส บนอาหาร chitin agar พบว่า 54 ไอโซเลท สามารถเจริญบนอาหาร chitin agar ได้ จากนั้นนำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนส ในอาหารเหลวที่มี 1% ball-milled chitin นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 - 29 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปหากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (chitinase activity) โดยตรวจวัดจากปริมาณ *N*-acetylglucosamine ที่ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาที่ใช้ 1% swollen chitin เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส จำนวน 12 ไอโซเลท โดยที่ไอโซเลท CS10 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงที่สุดคือ 12.07 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และมี specific activity 41.30 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัม และเมื่อนำไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นเชื้อ *Streptomyces* sp.

Kim *et al*. (1999) พบสารปฏิชีวนะ As 1 A ที่แยกได้จากน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces libani* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุของโรคใบไหม้ในพืชได้

Nawani and Kapadnis (2004) พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. NK1057 สามารถสร้าง extracellular chitinase ทั้งแบบ endochitinase และ chitobiosidase ซึ่ง chitobiosidase ที่เชื้อผลิตได้สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* และยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ดีที่สุด

Chaurasia *et al*. (2005) ที่พบว่า สาร antifungal ที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ผลิตได้นั้นอยู่ในรูปของสารที่มีความสามารถในการแพร่ (diffusible compound) และสารระเหย (volatile compound) ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถย่อยสลายเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum* และทำให้เกิดช่องว่างภายในเซลล์ได้ (vacuolisation) อีกทั้งยังทำให้สปอร์มีรูปร่างผิดปกติ คือโป่งพอง (swollen) และมีผนังบาง (thick-walled) นอกจากการสร้างสารเมทาบอไลต์ (metabolite) ต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุ

Takefumi *et al.* (2005) พบว่าอาหาร soil extract agar (SEA) สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีและมีความหลากหลาย โดยพบว่าโคโลนีที่เจริญบนอาหาร SEA มีขนาดโคโลนีที่เล็ก และเจริญช้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Ana *et al.* (2006) ได้คัดเลือก *Streptomyces* ที่แยกได้จากดิน เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia eragrostides* และ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคใบจุดมัน (yam; *Dioscorea cayennensis* Lam) ในประเทศบราซิล พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีส 6 ไอโซเลท (*S. thermotolerans*, *S. griseus* subsp. *griseus*, *Streptomyces* sp. N0035, *S. purpurascens* และ 2 ไอโซเลท ของ *Streptomyces* sp.) สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใย และการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารทุติยภูมิ โดยพบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. (AC26) มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุทั้ง 2 ชนิด ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรานั้น จะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของทุติยภูมิ ขณะที่ *S. thermotolerans* และ *Streptomyces* sp. N0035 สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้เพียงชนิดเดียว ส่วน *S. griseus* subsp. *griseus* พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุ และไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้

สายพิณ และคณะ (2551) ได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส จำนวน 41 ไอโซเลท โดยคัดแยกจากตัวอย่างดินที่มีไคตินสะสมอยู่ปริมาณมาก ได้แก่ ดินจอมปลวก รังมด ป่าชายเลน เป็นต้น โดยสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Streptomyces* จำนวน 19 ไอโซเลท *Nocardioform actinomycetes* จำนวน 5 ไอโซเลท แบคทีเรียแกรมบวกสร้างสปอร์ 10 ไอโซเลท แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม จำนวน 5 ไอโซเลท และแบคทีเรียแกรมลบ *Serratia* จำนวน 2 ไอโซเลท จากนั้นทำการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus niger*, *Botrytis* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium poae* และ *Fusarium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบเชื้อที่สามารถย่อยไคตินได้ จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลท B1.1, D1.1 และ F1.1 ซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Botrytis* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ตามลำดับ เชื้อ *Nocardioform actinomycetes* ไอโซเลท S11.2 และ S22.2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ไอโซเลท K1.1 ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* และ *Fusarium* sp. และเชื้อแบคทีเรีย *Serratia* ที่สามารถยั้งยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp.

Errakhi *et al.* (2007) แยกเชื้อแอกติโนไมซีสจากดินบนอาหาร Bennett medium ได้เชื้อ *Streptomyces* จำนวน 10 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยวิธี well diffusion พบว่ายับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค และการงอกของเม็ดสเคลอโรเตียม โดยการใช้ biomass inocular ให้ผลดีกว่าการใช้ culture filtrate และ spore suspension

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปาริฉัตร (ไม่ระบุปีที่พิมพ์) ได้ศึกษาเชื้อแอกติโนไมซีส โดยพบว่าเป็นพวกแกรมบวก มีการดำรงชีพแบบ aerobic อยู่ในออเดอร์ *Actinomycetales* มีดีเอ็นเอที่มีเบส G + C เป็นองค์ประกอบถึง 69 – 78 เปอร์เซนต์ ซึ่งเชื้อแอกติโนไมซีสเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถผลิตสาร antibiotics และ biologically active substance ได้ ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการแยกและจัดจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีส โดยศึกษา biodiversity จากเชื้อแอกติโนไมซีสในน้ำทิ้งจากโรงงาน Cho Heng Rice Vermicelli จำนวน 125 ไอโซเลท พบว่ามี 29 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคพืช และสามารถย่อยสลายแป้งได้ ซึ่งได้มีการวิเคราะห์ต่อโดยการทำ 16S rDNA sequencing เพื่อการวิเคราะห์ dendrogram และ genetic relationship และจากการศึกษาพบว่ามี 18 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ โดยจากการจัดจำแนกแล้วพบว่าเป็น *Streptomyces* และ *Nocardia*

อภิญญา และคณะ (2545) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium solani* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในมะม่วง และลำไย โดยสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้จำนวน 242 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นองค์ประกอบ พบเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าว จำนวน 48 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูง เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุทั้ง 2 ชนิด พบเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อแอกติโนไมซีส จำนวน 2 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และเชื้อรา จำนวน 4 ไอโซเลท เชื้อแบคทีเรีย จำนวน 2 ไอโซเลท ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุทั้ง 2 ไอโซเลท ด้วยวิธี paper disc method โดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ enzyme production medium (EPM) ซึ่งมีเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่อุณหภูมิห้อง พบว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียไอโซเลท H11 (*Bacillus cereus*) สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *F. solani* โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้นได้ 23.3 มิลลิเมตร และ 15.7 มิลลิเมตร ตามลำดับ

Mutitu *et al.* (2008) ที่ใช้สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในอาหารเหลวมาฉีดพ่นบนต้นกล้ามะเขือเทศ ทั้งก่อนและหลังจากการปลูกเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคใบไหม้ในมะเขือเทศ พบว่าสารทุติยภูมิที่ได้จากเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท 28P และ CS35 สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุได้ 30.8 และ 19.8 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุไรวรรณ์ (2552) ได้คัดแยกจุลินทรีย์จากกล้วยไม้ และดินบริเวณรอบรากพืชในแปลงปลูก ซึ่งเมื่อนำมาศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SRA14 มีประสิทธิภาพดีสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SRA14 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าน้ำเลี้ยงที่เก็บจากช่วง stationary มีประสิทธิภาพดีกว่าช่วง exponential อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำไปทดสอบในสภาพแปลงพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ไม่แตกต่างกับการใช้สารเคมี mancozeb อย่างมีนัยสำคัญ

วรรษมน (2553) ที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก พบว่าเปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของ เส้นใยเชื้อราที่เกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองสปอร์ออก (NF) มีค่าสูงกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองสปอร์ออก (F) โดยพบเชื้อแอกติโนไมซีส 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ดี ได้แก่ NSP2, NSP1 และ NSP5 มีเปอร์เซนต์ยับยั้งในช่วง 53.33 - 75.00 เปอร์เซนต์ 53.33 - 66.67 เปอร์เซนต์ และ 43.33 - 58.33 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ นอกจากนี้การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโดยวิธี agar well diffusion method ทำให้ทราบว่า สารทุติยภูมิต่างๆ ที่เชื้อแอกติโนไมซีสผลิตได้นั้นมีคุณสมบัติในการแพร่ โดยสามารถแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทำให้เห็นลักษณะของเส้นใยเชื้อราตรงบริเวณที่มีการหยดอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งชนิด NF และ F ที่มีการเจริญช้ากว่าชุดควบคุม และการเกิดลักษณะของวงใส (inhibition zone) ในการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา

พรนภา (2554) ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองสปอร์ออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองสปอร์ออก (F) ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* บนเมล็ดพริก โดยปลูกเชื้อบนเมล็ดพริกด้วยการแช่ใน spore suspension ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าเมล็ดพริกปลูกเชื้อราทั้ง 2 ชนิด คือ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ให้ประสิทธิภาพเท่ากัน คือ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 65.33 เปอร์เซนต์ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 63.33 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และมีเปอร์เซนต์ความงอกเท่ากับ 83.33 และ 76.67 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved