

อาหารธรรมชาติสำหรับเพิ่มมวลเชื้อและส่งเสริมความสามารถของเชื้อสเตรปโตมัยซิสปฏิบัติการ
ยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

Natural medium for biomass and enhance antibiosis capability of antagonistic *Streptomyces* spp.
against *Ralstonia solanacearum*

วรณิมา ชูดพิมาย (Worachima Chudpimai)* เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล (Petcharat Thummabenjapone)**

บทคัดย่อ

อาหารธรรมชาติที่เหมาะสมต่อการเพิ่มมวลเชื้อ *Streptomyces*-PR87 และส่งเสริมความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาของพืชได้ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์ arginine glycerol mineral salt (AGM) มากที่สุด ได้แก่ oat meal medium และ corn meal medium จึงนำ corn meal medium ไปพัฒนาต่อโดยใช้เมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวานเป็นองค์ประกอบหลัก พบว่าอาหาร corn meal ที่ได้ดัดแปลงจากเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวานสามารถใช้เพิ่มมวลเชื้อ *Streptomyces* -PR15, -PR33, -PR84 และ -PR87 ได้ดีกว่า AGMB และสนับสนุนประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum*ให้อยู่ในระดับการยับยั้งที่ดีมากใกล้เคียงกับเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหาร AGMA เชื้อ *Streptomyces* -PR15, -PR33 และ -PR87 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรข้าวโพดข้าวเหนียวให้น้ำหนักแห้งของมวลเชื้อมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 5 วัน ส่วนเชื้อ *Streptomyces* -PR84 ได้มวลเชื้อมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 7 วัน

ABSTRACT

The most suitable natural media for multiplication and enhance antibiosis activity of *Streptomyces*-PR87 against *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt disease of tomato which better or as well as the arginine glycerol mineral salt (AGM) medium were oat meal and corn meal media. The modified corn meal media using waxy corn seeds or sweet corn seeds as major ingredient were developed. Results showed that both of culture media provided higher biomass of all *Streptomyces* -PR15, -PR33, -PR84 and -PR87 than be cultured in AGMB. The antibiosis activities against *R. solanacearum* were strong and closely to the level of those cultured on AGMA. The maximum dry weight of biomass *Streptomyces* -PR15, -PR33 and -PR87 obtained from waxy corn meal broth medium for 5 days culture while highest yield of *Streptomyces*-PR84 biomass required 7 days culture.

คำสำคัญ: การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี โรคเหี่ยวเฉาของพืช ชีวภัณฑ์

Key words: Biological control, tomato disease, bioformulation

* มหบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

เชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะการเจริญคล้ายเชื้อรา มีโครงสร้างในส่วนของ substrate mycelium และ aerial mycelium บนผิวหน้าอาหารเพาะเลี้ยง เป็นที่รู้จักกันดีในแง่ของการเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะหลายชนิดที่ใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และประยุกต์ใช้ในทางการเกษตร เช่น Blasticidin-S และ Kasugamycin เป็นต้น (Agrios, 2005) มีการนำเชื้อ *Streptomyces* spp. มาใช้ควบคุมโรคพืช เนื่องจากมีกลไกที่สำคัญ เช่น การแก่งแย่งครอบครองพื้นที่กับเชื้อสาเหตุโรค การเป็นปรสิต การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วย (Lahdenpera, 2000; Khaled and Tarabily, 2008) ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Streptomyces rimosus* สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น เชื้อ *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Alternaria brassicicola*, *Botrytis* sp. และ *Fusarium oxysporum* เป็นต้น (Marten et al., 2001) จากรายงานของ เพชรรัตน์ (2545) ที่คัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* ได้หลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญกับพืชวงศ์แตง ควบคุมโรคเหี่ยวเหี่ยวมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ลดการเกิดโรครากปมจากไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) และมีแนวโน้มในด้านการส่งเสริมการพัฒนาระบบรากมะเขือเทศและการเจริญเติบโตของมะเขือเทศด้วย (เมธาวิ, 2552) เชื้อ *Streptomyces* มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคพืชและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการหาแหล่งอาหารธรรมชาติที่ได้จากเมล็ดธัญพืชชนิดต่างๆ มาทดแทนอาหารสังเคราะห์เพื่อผลิตมวลเชื้อ *Streptomyces* ให้ได้ปริมาณที่มาก และศึกษาความสามารถในการเป็นปฏิสัมพันธ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช และวัตถุค้นหาได้ง่าย และ/หรือราคาถูก

วิธีการวิจัย

1. ชนิดอาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* -PR87 บนอาหารแข็ง arginine glycerol mineral salt agar (AGMA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7-10 วัน หรือจนกว่าจะพบการสร้างสปอร์ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 ซม. ตัดชิ้นอาหารที่มีเชื้อเจริญอยู่ใส่ในอาหารเหลว AGMB และอาหารทดสอบชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ อาหารกึ่งสังเคราะห์ YEME (yeast extract 4 g/l, malt extract 10 g/l, CaCO₃ 2 g/l และ glucose 4 g/l), sporulation medium (yeast extract 1 g/l, beef extract 1 g/l, tryptose 2 g/l, FeSO₄ 0.01 g/l และ glucose 10 g/l) และอาหารธรรมชาติที่พัฒนาขึ้นมา ได้แก่ oat meal medium, corn meal medium, wheat meal medium, barley meal medium และ Job's tear meal medium ในปริมาตร 100 มล./flask ขนาด 250 มล. เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เก็บ biomass โดยกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักสด จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักแห้ง วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) 4 ซ้ำ

2. ลักษณะการเจริญและความสามารถในการเป็นปฏิสัมพันธ์ของเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

นำเชื้อ *Streptomyces*-PR87 ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร AGMA และอาหารสูตรต่างๆ ทั้ง 7 ชนิด ที่นำมาทดสอบในข้อ 1 โดยเตรียมในรูปอาหารแข็ง (เดิมวัน 15 กรัม/ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อชนิดอาหาร บันทึกลักษณะโคโลนี แล้วนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยวิธี dual culture bioassay โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อ *R. solanacearum* ประมาณ 10⁸ cfu/ml บ่มเชื้อที่ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกต

ลักษณะของวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสทั้งสองด้านในหน่วยมิลลิเมตร แล้วจึงหาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบกับชิ้นอาหาร AGMA (control) วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ

3. ผลกระทบของชนิดข้าวโพดต่อคุณภาพของ cornmeal medium ที่มีต่อการเจริญและการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ

เตรียมอาหารสูตร corn meal medium ที่ใช้เมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวสีน้ำตาล(waxy corn) หรือเมล็ดข้าวโพดหวานสลับสี(sweet corn) และอาหาร AGMB ที่ใช้เป็นอาหารเปรียบเทียบ แล้วนำเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต PR15, PR33, PR84 และ PR87 ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร AGMA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 7-10 วัน หรือจนกว่าพบว่าการสร้างสปอร์ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 ซม. ตัดแล้วย้ายใส่ลงในอาหารทดสอบ 100 มล. ใน flask ขนาด 250 มล. เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เก็บ biomass ในวันที่ 3, 5 และ 7 วัน โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งหม้อ เชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักสด จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักแห้ง วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ

ผลการวิจัย

1. ชนิดอาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณเชื้อ

เชื้อ *Streptomyces*-PR87 สามารถเจริญได้ในทุกชนิดอาหารทดสอบ โดยในอาหารกึ่งสังเคราะห์ YEME ให้น้ำหนักแห้งของเชื้อต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตรสูงที่สุด รองลงมาคือ oat meal medium และ corn meal medium ซึ่งได้ปริมาณเชื้อมากกว่าในอาหารสังเคราะห์ AGMB ที่ใช้เป็นอาหารพื้นฐาน อาหารสูตร wheat meal medium, barley meal medium และ Job's tear meal medium ให้น้ำหนักเชื้อใกล้เคียงกับในอาหาร

AGMB ส่วนอาหารสังเคราะห์ sporulation medium ให้น้ำหนักเชื้อต่ำที่สุด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณมวลเชื้อ *Streptomyces* -PR87 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน

Medium	Fresh weight of mycelia (mg)	Dry weight of mycelia (mg)
AGMB	699.55 d	245.93 c
YEME medium	3446.04 a	435.53 a
sporulation medium	2387.43 b	155.22 e
oat meal medium	3584.06 a	365.46 b
corn meal medium	3459.75 a	354.44 b
wheat meal medium	1741.00 c	235.75 c
barley meal medium	1707.50 c	206.25 d
Job's tear meal medium	1826.00 c	247.25 c
C.V.(%)	4.09	4.38
F-test	**	**

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

2. ลักษณะการเจริญและความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ *Streptomyces*-PR87 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

เชื้อ *Streptomyces*-PR87 ที่เจริญบนอาหารแข็งสูตรต่างๆ พบว่า มีความแตกต่างกันในด้านสีของ aerial mycelium โดยแบ่งกลุ่มการเปลี่ยนสีของ aerial mycelium ได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มสีน้ำตาล(brown) ได้แก่ อาหารสูตร AGMA และ sporulation medium, กลุ่มสีน้ำตาลอมเทา(grayish brown) ได้แก่ oat meal medium, corn meal medium และ wheat meal medium, กลุ่มสีเทา(gray) ได้แก่ Job's tear meal medium และขาว(white) ได้แก่ barley meal medium ส่วนบนอาหาร YEME medium นั้นเชื้อ *Streptomyces* -PR87 เริ่มสร้าง aerial mycelium สีขาวที่ขอบโคโลนี ในวันที่ 7 และ เริ่มเปลี่ยนสี aerial mycelium เป็นสีน้ำตาลในวันที่ 10 ลักษณะผิวหน้าโคโลนี แบ่งได้เป็น

2 กลุ่ม คือ ผิวน้ำโคลนคัลล์ผงแป้ง(powdery) ได้แก่ อาหารสูตร AGMA, sporulation medium, oat meal medium, corn meal medium และ barley meal medium, ผิวน้ำโคลนคัลล์ผ้ากำมะหยี่(velvety) ได้แก่ YEME medium, wheat meal medium และ Job's tear meal medium (ตารางที่ 2)

เมื่อพิจารณาขนาดของโคโลนี และความเร็วในการสร้าง aerial mycelium ซึ่งใช้บ่งชี้ความเร็วในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptomyces*-PR87 พบว่า อาหาร AGMA, sporulation medium, oat meal medium, corn meal medium และ Job's tear meal medium เชื้อเจริญเติบโตได้ดีมาก สร้าง aerial mycelium ได้มากและเร็ว และพัฒนาการด้านเปลี่ยนสีของ aerial mycelium เกิดขึ้นเร็วภายในเวลา 5 วันหลังการเพาะเลี้ยง(ตารางที่ 2)

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* 3 ไอโซเลต (RSTO, MPNC3 และ Pewcks) ของเชื้อ *Streptomyces*-PR87 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่าเชื้อ *Streptomyces*-PR87 ที่เลี้ยงไว้บนอาหารสูตรต่างๆ สามารถสร้างแนวยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ได้แตกต่างกันตามไอโซเลตของเชื้อ *R. solanacearum* โดยอาหาร oat meal medium ให้แนวยับยั้งได้กว้างมากที่สุดในทุกไอโซเลต

ของเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งดีกว่าเชื้อ *Streptomyces*-PR87 ที่ได้จากอาหาร AGMA เล็กน้อย (ตารางที่ 3)

3. ผลกระทบของชนิดข้าวโพดต่อคุณภาพของ corn meal medium ที่มีต่อการเจริญและการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ

เชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต -PR15, -PR33, -PR84 และ -PR87 ที่ทดสอบเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร corn meal medium ที่เตรียมได้จากเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว และ ข้าวโพดหวาน เปรียบเทียบกับ อาหาร AGMA พบว่า อาหารธรรมชาติจากเมล็ดข้าวโพดได้มวลเชื้อ *Streptomyces* มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร AGMB กับทุกไอโซเลต ส่วนอาหารที่เตรียมจากเมล็ดข้าวโพดหวานได้มวลเชื้อ *Streptomyces* มากกว่าอาหาร AGMB เฉพาะไอโซเลต -PR15 และ -PR87 มวลของเชื้อ *Streptomyces* ทุกไอโซเลตเพิ่มขึ้นจากวันที่ 3 ไปวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงพบว่ามวลเชื้อลดลง ยกเว้นใน *Streptomyces*-PR84 ที่ได้มวลเชื้อมากที่สุดเมื่อเลี้ยงได้ 7 วัน (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบมวลเชื้อที่ได้ในแต่ละไอโซเลตพบว่า เชื้อ *Streptomyces*-PR33 มีการเพิ่มมวลเชื้อได้มากกว่าเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลตอื่นๆ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Streptomyces*-PR87 เจริญบนอาหารชนิดต่างๆ

Culture medium	Characteristics				
	color of aerial mycelium	color of substrate mycelium	Growth ¹	size (mm)	colony surface
AGMA	brown	yellow-brown	+++	1-5	powdery
YEME medium	white	yellow-brown	++	1-5	velvety
sporulation medium	brown	yellow-brown	+++	1-5	powdery
oat meal medium	grayish brown	yellow-dark green	+++	1-5	powdery
corn meal medium	grayish brown	yellow-dark green	+++	1-6	powdery
wheat meal medium	grayish brown	yellow-dark green	++	1-5	velvety
barley meal medium	grayish white	yellow-dark green	++	1-4	powdery
Job's tear meal medium	gray	yellow-brown	+++	1-5	velvety

¹หมายเหตุ: การเจริญบนอาหาร โดย +++ เชื้อเจริญเติบโตได้ดีมาก สร้าง aerial mycelium ได้มากและรวดเร็ว, ++ เชื้อเจริญเติบโตได้ดีปานกลาง สร้าง aerial mycelium ได้มากและรวดเร็วปานกลาง, + เชื้อเจริญเติบโตช้า สร้าง aerial mycelium ได้น้อย

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยการสร้างแนวยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* 3 ไอโซเลต (RSTO, MPNC3 และ Pew-cks) โดยวิธี bioassay ของเชื้อ *Streptomyces*-PR87 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน

Medium	Inhibition zone (cm)		
	Biovar 3 (RSTO) ¹	Biovar 3 (MPNC3) ¹	Biovar 4 (Pewcks) ¹
AGMA	2.4 bc	2.40 ab	1.7 bc
YEME medium	1.8 e	1.80 d	1.6 cd
sporulation medium	2.3 cd	2.30 bc	1.5 d
oat meal medium	2.5 ab	2.60 a	2.2 a
corn meal medium	2.6 a	2.60 a	1.9 b
wheat meal medium	2.1 d	2.40 ab	2.3 a
barley meal medium	1.8 e	2.13 c	2.3 a
Job's tear meal medium	2.2 cd	2.13 c	2.3 a
C.V.(%)	3.15	3.96	4.96
F-test	**	**	**

¹ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ของเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลตต่างๆมีความแตกต่างกันไปตามไอโซเลตของเชื้อและชนิดอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง มากกว่าจำนวนวันที่ใช้เพาะเลี้ยง (3, 5 และ 7 วัน) เชื้อ *Streptomyces*-PR15 และ *Streptomyces*-PR33 ที่เลี้ยงบนอาหาร AGMA สร้างแนวยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* (RSTO และ MPNC3) ได้ดีกว่า เมื่อเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารสูตรข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวาน ในขณะที่เชื้อ *Streptomyces*-PR84 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร AGMA และ อาหารสูตรข้าวโพดหวานมีความกว้างของแนวยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้ไม่แตกต่างกันซึ่งดีกว่าเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตรข้าวโพดข้าวเหนียว ส่วนเชื้อ *Streptomyces*-PR87 ที่เลี้ยงไว้ในอาหารสูตรข้าวโพดหวานให้แนวยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* กว้างที่สุด แต่ก็ไม่ได้แตกต่างทางสถิติกับเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร AGMA (ตารางที่ 5)

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

อาหารธรรมชาติที่ส่งเสริมทั้งการเพิ่มปริมาณเชื้อ *Streptomyces*-PR87 และสนับสนุนประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ให้อยู่

ในระดับที่ไม่ต่ำกว่าเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารสังเคราะห์ AGMA ได้แก่ อาหารสูตร oat meal medium และ corn meal medium ในขณะที่ wheat meal medium, Job's tear meal medium, barley meal medium, อาหารกึ่งสังเคราะห์ YEME medium และอาหารสังเคราะห์ sporulation medium ได้มวลเชื้อต่ำกว่าและ/หรือมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้ต่ำกว่า การที่เชื้อ *Streptomyces* ปฏิบัติที่นำมาศึกษามีความแตกต่างกันในส่วนของการเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงและการสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* จัดเป็นสิ่งที่พบได้เนื่องจากความสามารถต่างๆ เหล่านี้ถูกกำหนดไว้ในสารพันธุกรรมของเชื้อซึ่งมีความแตกต่างกันมากในระดับสปีชีส์ (บรรจบ, 2549)

เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนอาหารและประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* แล้ว จึงคัดเลือกอาหารสูตร corn meal medium ไปศึกษาต่อถึงผลกระทบของชนิดของเมล็ดข้าวโพดที่นำมาประกอบสูตรอาหาร พบว่า เชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต-PR15, -PR33, -PR84 และ -PR87 เจริญได้ดีในอาหาร corn meal medium ทั้งที่เตรียมจากเมล็ด

ข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวาน โดยใช้เวลา 5-7 วัน ขึ้นอยู่กับไอโซเลตของเชื้อ *Streptomyces* การสร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* พบว่าแตกต่างกันไปตามไอโซเลตของเชื้อและชนิดอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมากกว่าจำนวนวันที่ใช้เพาะเลี้ยง (3, 5 และ 7 วัน) ผลการทดลองนี้ได้ข้อสรุปว่าวัตถุดิบของอาหาร corn meal medium ที่พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มมวลเชื้อ *Streptomyces*-PR15, -PR33, -PR84 และ -PR87 นั้นสามารถใช้ได้ทั้งเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวาน และได้มวลเชื้อมากกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร AGMB ที่เป็นอาหารพื้นฐานเปรียบเทียบ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักแห้งของมวลเชื้อที่ได้รับพบว่ายังมีความผันแปรค่อนข้างสูง (%CV สูง)

กว่าเมื่อพิจารณาจากน้ำหนักสดของมวลเชื้อ แต่สามารถมองเห็นแนวโน้มถึงช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มมวลเชื้อ *Streptomyces* แต่ละไอโซเลตได้ โดย *Streptomyces*-PR15, *Streptomyces*-PR33, *Streptomyces*-PR87 ควรใช้เวลาเพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลง corn meal นาน 5 วัน ส่วนเชื้อ *Streptomyces*-PR84 ได้มวลเชื้อมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 7 วัน (ตารางที่ 4) จากผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าอาหารธรรมชาติสูตรเมล็ดข้าวโพดที่พัฒนาขึ้นมา สามารถนำมาใช้เพิ่มมวลของเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลตต่างๆ ที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อ *R. solanacearum* ทดแทนอาหารสังเคราะห์ AGMB ได้เป็นอย่างดี โดยอาหารสูตรข้าวโพดข้าวเหนียวมีความยืดหยุ่น ใช้ได้ดีกับไอโซเลต

ตารางที่ 4 มวลเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต -PR15, -PR33, -PR84 และ -PR87 ในอาหารสูตรดัดแปลง corn meal medium และ AGMB ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 3, 5 และ 7 วัน

<i>Streptomyces</i> isolate	Medium (broth)	3 day		5 day		7 day	
		Fresh weight (mg) ¹	Dry weight (mg) ¹	Fresh weight (mg) ¹	Dry weight (mg) ¹	Fresh Weight (mg) ¹	Dry weight (mg) ¹
<i>Streptomyces</i> -PR15	AGMB	1081.7 f	120.3 e	1359.0 e	177.7 f	1438.0 f	137.0 cd
	waxy corn meal	3198.7 bc	386.0 ab	8406.7 ab	786.2 ab	3312.7 bcd	300.0 ab
	sweet corn meal	3647.7 ab	471.0 a	6804.0 bc	674.3 abc	2391.3 def	318.3 ab
<i>Streptomyces</i> - PR33	AGMB	1461.7 ef	155.3 e	6554.7 bc	494.3 cde	1676.7 ef	101.3 d
	waxy corn meal	3393.0 bc	289.0 bcd	9070.3 a	820.6 a	3518.3 abc	310.7 ab
	sweet corn meal	1510.0 ef	148.0 e	4150.0 d	471.7 de	1648.7 ef	205.7 bcd
<i>Streptomyces</i> -PR84	AGMB	2761.7 bcd	240.1 cde	4018.3 d	392.1 e	2698.3 cd	244.6 abc
	waxy corn meal	4763.7 a	490.3 a	7224.0 abc	608.4 bcd	4068.3 ab	309.0 ab
	sweet corn meal	4646.0 a	318.3 bc	5398.3 cd	387.3 e	4360.3 a	356.3 a
<i>Streptomyces</i> - PR87	AGMB	1628.3 def	146.0 e	1375.0 e	174.4 f	1478.3 f	200.3 bcd
	waxy corn meal	2350.0 cde	223.7 cde	6681.0 bc	535.8 cde	3386.0 abcd	243.7 abc
	sweet corn meal	2775.7 bc	158.1 de	5797.3 cd	434.1 de	2516.3 cde	130.8 cd
C.V. (%)		17.98	22.26	16.53	42.59	16.48	38.7
F-test		**	**	**	**	**	**

¹ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 5 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ของเชื้อ *Streptomyces* -PR15, -PR33, -PR84 และ -PR87 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ อายุ 3, 5 และ 7 วัน

Streptomyces isolate	Culture medium	Dia. of inhibition zone (cm) against <i>R. solanacearum</i> isolates ¹					
		MPNC3			RSTO		
		3 day	5 day	7 day	3 day	5 day	7 day
Streptomyces -PR15	AGMA	3.1 ab	3.1 a	2.4 b	3.1 b	2.7 a	2.5d e
	waxy corn meal agar	2.4 c	1.8 d	1.8 c	2.6 c	2.2 b	2.2 b
	sweet corn meal agar	2.1 cd	1.4 f	1.4 de	2.2 de	1.7 cd	1.8 ab
Streptomyces -PR33	AGMA	1.5 e	1.5 ef	1.4 de	1.5 f	1.5 de	1.5 efg
	waxy corn meal agar	1.4 e	1.4 f	1.4 e	1.3 f	1.3 e	1.4 g
	sweet corn meal agar	1.2 e	1.3 f	1.3 e	1.4 f	1.3 e	1.4 fg
Streptomyces -PR84	AGMA	2.0 d	1.8 d	1.8 c	2.0 e	1.9 bc	1.9 cd
	waxy corn meal agar	1.9 d	1.5 ef	1.6 c	2.1 de	1.7 bc	1.7 def
	sweet corn meal agar	1.9 d	1.8 de	1.8 cd	2.0 de	1.9 cde	1.9 cd
Streptomyces -PR87	AGMA	2.9 b	2.5 bc	2.5 ab	3.0 b	2.6 a	2.6 a
	waxy corn meal agar	2.4 c	2.4 c	2.5 b	2.3 d	2.7 a	2.6 ab
	sweet corn meal agar	3.3 a	2.8 ab	2.8 a	3.6 a	2.8 a	2.8 ab
C.V. (%)		7.48	6.66	8.44	8.8	8.05	7.74
F-test		**	**	**	**	**	**

¹ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ต่างๆ ของเชื้อ *Streptomyces* ปฏิบัติได้มากกว่าสูตรข้าวโพดหวาน (เพิ่มปริมาณได้ดีและสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ได้มาก(ตารางที่ 4 และ 5)) ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับสัดส่วนของคาร์โบไฮเดรต และ โปรตีนที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณและการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ (Oskay, 2009) ของ *Streptomyces* ทั้งสี่ไอโซเลตที่พบในเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวมากกว่าเมล็ดข้าวโพดหวานและในเมล็ดธัญพืชอื่นๆ ที่นำมาทดสอบ

จากการสืบค้นองค์ประกอบในเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว 100 กรัมมีส่วนประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต 74.3 กรัม โดยมี sucrose 2330 มก. glucose 200 มก. fructose 200 มก. maltose 100 มก. แตกต่างจากส่วนประกอบของเมล็ดข้าวโพดหวาน 100 กรัม ที่มีคาร์โบไฮเดรต 68.3 กรัม โดยมี sucrose 2060 มก. glucose 500 มก. fructose 480 มก. และ maltose 180 มก. (Anonymous, 2010) จากงานวิจัยของ Cheng *et al.* (1995) พบว่า glucose เป็น carbon source ที่ดี

และมีอิทธิพลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะอีกหลายชนิด โดยมีสารปฏิชีวนะ 21 ชนิดที่ผลิตได้จากอาหารที่มี glucose เป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ยังมีสัดส่วนของกรด อะมิโน เช่น arginine อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับที่มีอยู่ในองค์ประกอบของอาหาร AGMA ซึ่ง arginine จัดเป็น precursor ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดย arginine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรด clavulanic (Rodríguez-García *et al.*, 1997) และ Baldwin *et al.* (1994) แสดงให้เห็นว่า arginine และ glycerol มีบทบาทสำคัญในการเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรด clavulanic และ valclavam และจากการศึกษาอิทธิพลของสารอาหารในการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ AK-111-81 macrolide ของ Gesheva *et al.* (2005) พบว่า arginine เป็นสารอาหารที่ดีสำหรับการเพิ่มปริมาณและการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ คล้ายกับ Kontro *et al.*, (2007) ศึกษาชนิดของอาหารสำหรับการเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* 10 ไอโซเลต

จากอาหาร 26 ชนิด พบว่ามีอาหาร 5 ชนิดที่สามารถผลิตสปอร์ได้ดี คือ starch-casein-KNO₃, glycerol-arginine (GA), actinomycete-isolation (AI), tryptone-yeast extract-glucose (TYG) และ Tryptone-soy agar

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นร่วมกับทุนวิจัยอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- บรรจบ วันกิ่ง. 2549. การจำแนกชนิด *Streptomyces* ปฏิบัติของเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2545. *Streptomyces* อีกมิติหนึ่งของการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. เกษตร 30 : 20-27.
- เมธาวิ ธิมาศ. 2552. ศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวเหี่ยวและโรครากปมมะเขือเทศ และความสัมพันธ์ระหว่างฟิโนไทป์และจีโนไทป์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press, California, USA.
- Anonymous. Nutritiondate. (Retrieved 20 January 2010) Available from : <http://nutritiondate-self.com>.
- Baldwin, J. E., Goh, K.C., and Schofield, C.J. 1994. Biosynthetic precursors of valclavam. Tetrahedron Lett 35: 2779-2782.
- Cheng, J.R., Fang, A., and Demain, A.L. 1995. Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:1096-1098.
- Gesheva, V., Ivanova, V., and Gesheva, R. 2005. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. Microbiol. Research. 160:243-248.
- Khaled, A. and Tarabily, E. 2008. Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing streptomycete actinomycetes. Plant Soil 308: 161-174.
- Kontro, M.H., Lignell, U., Hyvärinen, A., Vahteristo, M., Hirvonen, M.R., and Nevalainen, A. 2007. Nutrient effects on ten *Streptomyces* spp. Sporulation. pp 137-142. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.
- Lahdenpera, M.L. 2000. How Mycostop® acts in the control of fungal plant diseases. Infoletter 5 (Reviewed 20 July 2009) Available from : <http://www.verdera.fi>.
- Marten, P., Bruckner, S., Minkwitz, A., Luth, P., and Bergm, G., 2001. Rhizovit[®]: Impact and formulation of a new bacterial product. In: Koch, E., Leinonen P. (Eds.), Formulation of Microbial

- Inoculants: Proceedings of a meeting held in Braunschweig, Germany. COST Action 830/Microbial inoculants for agriculture and environment, Germany, pp. 78–82.
- Oskay, M. 2009. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. Afr. J. Biotechnol. 8(13):3007-3017.
- Rodríguez-García, A., Ludovice, M., Martin, J.F., and Liras, P. 1997. Arginine boxes and the *argR* gene of *Streptomyces clavuligerus*: evidence for a clear regulation of the arginine pathway. Mol. Microbiol. 25:219-228.
- Sabaratnam, S., and J.A. Traquair. 2000. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplant. Biological Control 23:245-253.