รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพร่วมกับการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีส ที่แยกได้จากมูลสัตว์เพื่อต้านทานเชื้อ *Rhizoctonia solani*

จีรพรรณ์ ใจอินผล

สถาบันวิจัยและพัฒนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

พ.ศ. 2549

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

คำนำ

การดำเนินการศึกษาวิจัย เรื่อง การพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพร่วมกับการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากมูลสัตว์เพื่อต้านทานเชื้อ *Rhizoctonia solani* เกิดจากผู้วิจัยมีแนวคิดในด้านการลดต้นทุนการผลิตปุ๋ยชีวภาพจากการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่พบได้ในท้องถิ่น และคำนึงถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราในภาคเกษตรกรรม โดยการใช้ประโยชน์จากเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งพบได้ในสิ่งแวดล้อมรอบตัว ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ครอบคลุมถึงการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการยับยั้งเชื้อราทดสอบ และการย่อยสลายสารประกอบในกลุ่มเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่พบในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งพบได้ในท้องถิ่น รวมถึงการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชทดลอง โดยผลการทดลองที่ได้จะนำไปสู่การศึกษาผลกระทบของการนำปุ๋ยชีวภาพไปใช้จริงในภาคเกษตรกรรมได้

ผู้วิจัยคาดหวังว่าผลการวิจัยครั้งนี้จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในภาคเกษตรกรรมต่อไป

จีรพรรณ์ ใจอินผล

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อุไรวรรณ วิจารณกุล ที่ช่วยตรวจทานข้อบกพร่องของงานวิจัยจนประสบความสำเร็จด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโปรแกรมชีววิทยาประยุกต์ ที่เอื้อเฟื้อเวลาให้การช่วยเหลือด้านการจัดเตรียมอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ โปรแกรมชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้การสนับสนุนเกี่ยวกับเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน และห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา ที่ให้งบประมาณสนับสนุนจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

จีรพรรณ์ ใจอินผล

พฤษภาคม 2549

หัวข้อการวิจัย การพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพร่วมกับการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากมูลสัตว์เพื่อต้านทานเชื้อ *Rhizoctonia solani*

ชื่อผู้วิจัย นางสาวจีรพรรณ์ ใจอินผล

โปรแกรมวิชา ชีววิทยาประยุกต์

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตปุ๋ยชีวภาพร่วมกับการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีตจากมูลสัตว์ เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Rhizoctonia solani* ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าในพืช โดยนำตัวอย่างมูลสัตว์ 3 ชนิด คือ มูลสุกร มูลวัว และมูลค้างคาว สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีตได้ทั้งหมาดเท่ากับ 146 ไอโซเลต เมื่อทำการศึกษา พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ B4 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* sp. มีคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะดีที่สุดโดยให้วงใสที่เกิดจากการต้านทานเชื้อ *R. solani* มากที่สุด และให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด เท่ากับ 3.5 Unit/g เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B4 มาใช้เป็นหัวเชื้อร่วมกับการผลิตปุ๋ยชีวภาพพบว่าสามารถช่วยให้พืชทดลองมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าปุ๋ยชีวภาพที่ไม่มีการใส่ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B4 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยชีวภาพ

Research Title Application of antibiotic and cellulase-producing Actinomycetes isolated from animal wastes for biofertilizer production against *Rhizoctonia solani*

Author Jeerapun Jaiinphon

Program Applied Biology

Abstract

The purpose of this study was to determine the effect of supplemented Actinomycetes into biofertilizer production on *Rhizoctonia solani* which caused a rot root disease. 164 isolates of actinomycetes were isolated from feces of three animals including pig, cow and bat. The screening methods were preformed by antifungal and cellulose activities with dual cultivation and DNS methods, respectively. Among all strains, the strain no. B4 that belongs to *Streptomyces sp* was the most attractive candidate. It showed the widest inhibitory zone on *R. solani*, and its cellulase activity was detected up to 3.5 unit/gram. The *Streptomyces* sp B4 was subsequently applied as a starter on biofertilizer production for preliminary study in the practical field. This resulted that the survival rate of plant in present-starter condition was higher than that of the absence of starter.

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ข้อจำกัดของการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 แนวคิดทฤษฎี	5
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	16
บทที่ 4 ผลการวิจัย	19
บทที่ 5 สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ	25
บรรณานุกรม	28
ภาคผนวก	32
ภาคผนวก ก อุปกรณ์และสารเคมี	33
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	34
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมี	36
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานและการวัดปริมาณเอนไซม์	38
ประวัติผู้วิจัย	41

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากตัวอย่างมูลสัตว์ 19

ตารางที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของถั่วเขียวที่ผ่านการแช่ suspension ของเชื้อ *R. solani* เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในดินที่มีปุ๋ยชีวภาพที่เติมและไม่เติมเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ B4 23

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1 องค์ประกอบของเซลลูโลส	5
ภาพที่ 2 โครงสร้างของลิกนิน	7
ภาพที่ 3 การเกิด a) soft rot b) brown rot c) white rot ของเนื้อไม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา	8
ภาพที่ 4 sclerotia ของเชื้อ *Rhizoctonia* spp	12
ภาพที่ 5 พืชที่ถูกทำลายโดยเชื้อ *Rhizoctonia* spp.	12
ภาพที่ 6 เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากมูลสัตว์	19
ภาพที่ 7 การต้านทานการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส B4 ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani*	20
ภาพที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีต	21
ภาพที่ 9 การเจริญของถั่วเขียวหลังจากที่แช่ใน suspension ของเชื้อ *R.. solani*	22
ภาพที่ 10 ชุดการทดลองควบคุม (ดินไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพ)	24
ภาพที่ 11 อัตราการอดชีวิตของถั่วเขียว เมื่อใช้ปุ๋ยชีวภาพที่มี *Streptomyces* B4 ปริมาณเท่ากับ 3.5, 6.5, 9.5 และ 12.5 กรัม ต่อพื้นที่ทดลอง	24
ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	38

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การทำเกษตรกรรมในประเทศไทยประสบปัญหาจากศัตรูพืชต่างๆมากมาย โดยเฉพาะการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในกลุ่มแบคทีเรีย และเชื้อรา โดยเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มักจะมาจากดิน มูลสัตว์ หรือติดอยู่ตามเศษพืช ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์จะมีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสม เชื้อรา *Rhizoctonia* spp. เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดปัญหาต่อพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง โดยเฉพาะก่อให้เกิดโรครากเน่าในผลไม้ในกลุ่ม สับปะรด ส้มโอ ส้มเขียวหวาน มะม่วงหิมพานต์ และกล้วยไม้ เป็นต้น การแก้ไขผลกระทบจากการเข้าทำลายของเชื้อ *R. solani* หลังจากการเข้าทำลายพืชผลทำได้ยากมาก เนื่องจากเชื้อ *R. solani* เจริญได้ทั่วไปในดินและสามารถแพร่กระจายได้เป็นบริเวณกว้าง ในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อควบคุมเชื้อ *R. solani* อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าในพืชเศรษฐกิจ โดยผลจากการเกิดโรครากเน่าในพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆ ทำให้ระบบรากถูกทำลาย การเจริญเติบโตจะชะงัก และต้นเหี่ยวอย่างฉับพลัน จนยืนต้นตายในที่สุด การป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ *Rhizoctonia* spp. ทำได้โดยการจัดการกับพื้นที่เพาะปลูกให้มีการระบายน้ำได้ดี และใช้สารป้องกันกำจัดโรค รวมถึงการใช้ปุ๋ยคอกอินทรีย์เพื่อเพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในดินซึ่งเป็นวิธีการควบคุมทางชีวภาพที่เหมาะสมและมีต้นทุนการดำเนินงานต่ำ โดยนอกจากจุลินทรีย์ในปุ๋ยคอกจะช่วยควบคุมการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้แล้ว เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดยังมีบทบาทในด้านช่วยย่อยสลายซากพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยเช่นกัน

ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในมูลสัตว์มาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้ในด้านเกษตรกรรมอย่างกว้างขวาง โดยมูลสัตว์เป็นสิ่งเหลือทิ้งทางชีวภาพที่พบมากในแต่ละปี เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม และทำปศุสัตว์กันอย่างกว้างขวาง มีมูลสัตว์ชนิดต่างๆ รวมกันแล้วมีมากกว่า 3,000 x 10^6 กก.มูลแห้งต่อปี (กรมปศุสัตว์, ข้อมูลเศรษฐกิจการปศุสัตว์ประจำปี 2543) มูลสัตว์ส่วนหนึ่งถูกนำมาใช้ในการผลิตก๊าซชีวภาพ (560 x 10^6 ลบ.ม. ต่อปี) และส่วนหนึ่งถูกนำมาใช้ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้ทางด้านเกษตรกรรม ทดแทนการใช้สารเคมี โดยการใช้ปุ๋ยชีวภาพก่อให้เกิดประโยชน์ด้านช่วยปรับสภาพโครงสร้างของดินให้เป็นดินร่วน ช่วยอุ้มน้ำได้ดี และยังช่วยเพิ่มอินทรีย์วัตถุในดินให้มีมากขึ้น รวมถึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สารเคมีมากขึ้น ที่สำคัญการผลิตปุ๋ยชีวภาพเป็นการกำจัดสิ่งเหลือทิ้งทางการเกษตร และมูลสัตว์ได้อย่างมี

ประสิทธิภาพ อันก่อให้เกิดประโยชน์อย่างแท้จริง เชื้อจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพที่มีบทบาทสำคัญส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยซีส ทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพทั้งกระบวนการแบบใช้อากาศ และกระบวนการไม่ใช้อากาศ โดยจากการเจริญของเชื้อกลุ่มดังกล่าวจะทำให้มีการสะสมมวลเซลล์และสารเมตาบอไลท์ต่างๆ รวมถึงการเกิดความร้อนขึ้นจากกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้มีผลช่วยทำลาย เมล็ดของวัชพืช แมลง และเชื้อโรคบางชนิด เชื้อจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพส่วนหนึ่งมาจากธรรมชาติ และส่วนหนึ่งปนมากับมูลสัตว์ที่นำมาใช้ร่วมกันในขั้นตอนการผลิต และมีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อยเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ไคติน และลิกนิน จนมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อแอคติโนมัยซีสและเชื้อรา โดยจากบทบาทของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพนอกจากความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งแล้วเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในปุ๋ยชีวภาพบางชนิด มีส่วนช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคกับพืชได้โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบรากของพืช เช่น โรครากเน่า โคนเน่าซึ่งเป็นสาเหตุมาจากเชื้อ *Rhizoctonia* spp. รวมถึงเชื้อ *Phytophthora* spp. ด้วยเช่นกัน เพื่อให้เกิดผลผลิตที่มีคุณภาพเป็นที่ต้องการของตลาด

การศึกษาหาเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีส ที่ปนอยู่ในมูลสัตว์ซึ่งสามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์เซลลูเลส และสารปฏิชีวนะต้านทานเชื้อ *Rhizoctonia* spp. เพื่อนำไปพัฒนาใช้ร่วมกับการผลิตปุ๋ยชีวภาพจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จะมีส่วนช่วยให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ และในขณะเดียวกัน ปุ๋ยชีวภาพที่ได้ยังมีคุณสมบัติสามารถต้านทานการเจริญของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคด้วย เป็นการนำไปสู่การลดการใช้ปุ๋ยเคมี และลดความเสี่ยงต่ออันตรายจากการใช้สารเคมี นำไปสู่การทำเกษตรอินทรีย์เพื่อให้ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค รวมถึงเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของสินค้าในระดับสากลได้มากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.1.1 เพื่อคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากมูลสัตว์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส และสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าในพืช

1.1.2 เพื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีสไปใช้ร่วมกับปุ๋ยชีวภาพยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *R. solani* ในถั่วเขียว

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากมูลสัตว์ คือ มูลไก่ มูลสุกร มูลวัว มูลม้า มาทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และความสามารถในการสร้างสารต้านทานเชื้อ *R. solani* ที่เป็นสาเหตุโรครากเน่า ในพืช และนำเชื้อที่แยกได้นำมาใช้ร่วมกับการผลิตปุ๋ยชีวภาพโดยการใช้วัสดุเหลือทิ้ง คือ มูลสัตว์ (ที่พบเชื้อแอคติโนมัยซีส) เศษพืช ขี้เถ้าแกลบ รำอ่อน โดยใช้อัตราส่วน 10 : 1 : 1 : 1 นำปุ๋ยหมักที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani* โดยพืชทดสอบที่ใช้ คือ ถั่วเขียว ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจในจังหวัดพิษณุโลกและสามารถเกิดปัญหาโรครากเน่าจากเชื้อดังกล่าว

1.4 ข้อจำกัดของการวิจัย

ในการทดลองมีปัจจัยทางธรรมชาติที่มีผลต่อการเจริญของพืชทดลอง เช่น แสง ความชื้น อุณหภูมิ ซึ่งไม่ได้มีการควบคุมและอาจทำให้ผลการทดลองเปลี่ยนไปในแต่ละครั้ง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.5.1 เชื้อแอคติโนมัยซีสที่ผลิตเซลลูเลสจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบให้มีขนดโมเลกุลลดลง ช่วยสำหรับการอุ้มน้ำได้ดียิ่งขึ้น

1.5.2 สารปฏิชีวนะที่สร้างจากเชื้อแอคติโนมัยซีสที่อยู่ในปุ๋ยชีวภาพสามารถช่วยป้องกันเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรครากเน่า โคนเน่าในพืช เป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตจากการใช้สารเคมีในการฆ่าเชื้อราซึ่งอาจตกค้างในผลผลิตและสิ่งแวดล้อมได้

1.5.3 เชื้อแอคติโนมัยซีสที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการผลิตปุ๋ยชีวภาพ เพื่อใช้ประโยชน์จากพืชชนิดอื่นๆ ที่มีปัญหาการเข้าทำลายของเชื้อ *R. solani* ได้

1.5.4 ผลการวิจัยที่ได้จะช่วยป้องกันและแก้ปัญหาให้กลุ่มเกษตรกรที่ปลูกพืชเศรษฐกิจที่ประสบปัญหาเกี่ยวกับโรครากเน่า โคนเน่า โดยกลุ่มเกษตรกรสามารถดำเนินการผลิตปุ๋ยชีวภาพไว้

ใช้ประโยชน์ด้วยตนเอง และเป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเกษตรนำไปเผยแพร่แก่เกษตรกรเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ *R. solani* ได้

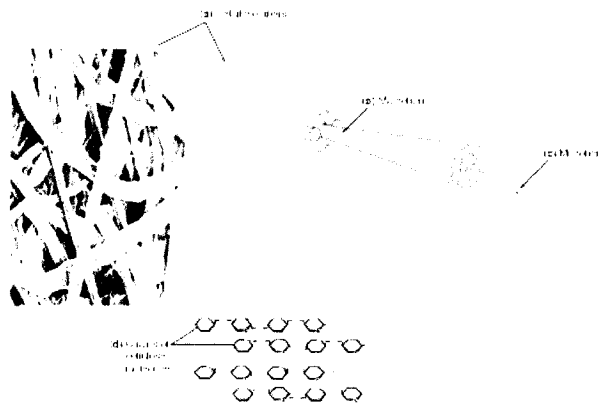
บทที่ 2

แนวคิดทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดทฤษฎี

2.1.1 เซลลูโลส

เซลลูโลสพบเป็นองค์ประกอบของพืชประมาณ 35-50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเซลลูโลสมี monomer เพียงชนิดเดียวต่อกันเป็นสายตรง (homopolymer) ซึ่ง monomer ที่เป็นกลูโคสแต่ละโมเลกุลจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β–1,4-glucosidic และหมุนทำมุม 180° กับกลูโคสโมเลกุลข้างเคียง ซึ่งทำให้แท้จริงแล้วหน่วยย่อยที่เรียงซ้ำๆ กัน เป็นโพลีเมอร์ของเซลลูโลส คือ cellobiose (β-1,4-D-glucosyl-D-glucose) แทนที่จะเป็น glucose ในปัจจุบันได้มีการจำแนกเซลลูโลสออกเป็นกลุ่ม เนื่องจากรูปแบบพันธะไฮโดรเจนที่อยู่ในโมเลกุลของเซลลูโลสมีความแตกต่างกัน คือ α-form และ β-form เซลลูโลสถูกสร้างขึ้นในธรรมชาติในลักษณะของโมเลกุลเดี่ยว โดยประมาณแล้ว 30 โมเลกุล ของเซลลูโลส จะมีการรวมกันเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น เรียกว่า protofibrils ซึ่งจะจับกันแน่นจนกลายเป็นหน่วยที่ใหญ่ขึ้น เรียกว่า microfibrils และการรวมกลุ่มกันของ microfibrils เป็นหน่วยใหญ่ขึ้น เรารู้จักกันดีว่าเป็นเส้นใยของเซลลูโลส (ภาพที่ 1)

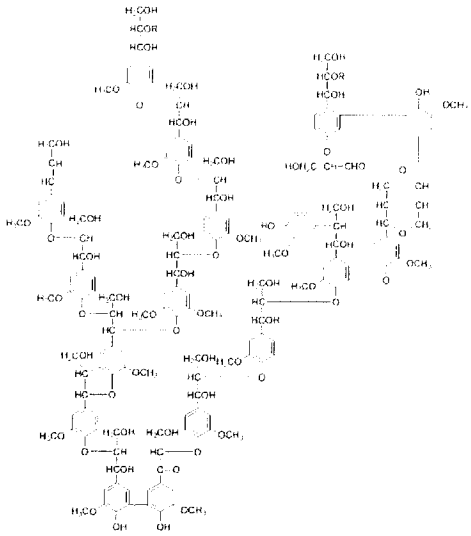


ภาพที่ 1 องค์ประกอบของเซลลูโลส

ที่มา : http://www.abcbodybuilding.com

เซลลูโลสมีความสำคัญเนื่องจากโครงสร้างที่เป็น crystalline ภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสจะต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งทำให้เกิดลักษณะที่ไม่ยืดหยุ่น หรือมีการจับกันแน่นของ microfibrils การจัดเรียงตัวของเซลลูโลสจะเป็นไปในทิศทางเดียวกัน (parallel) และจับกันอย่างแน่นหนา แต่ในธรรมชาติเส้นใยของเซลลูโลสไม่ได้อยู่ในรูปของ crystalline เพียงอย่างเดียว แต่อัตราการเกิดของ crystalline จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ โดยถ้า crystalline เกิดมากจะส่งผลให้เซลลูโลสมีความทนทานต่อการย่อยสลายด้วยเช่นกัน

พืชส่วนใหญ่นอกจากมีองค์ประกอบของเซลลูโลสแล้ว องค์ประกอบหลักที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งได้แก่ hemicellulose ซึ่งมีความสำคัญมากในด้านเพิ่มความแข็งแรงให้กับพืชและเป็นโครงสร้างที่อยู่รอบๆเซลลูโลส ช่วยป้องกันเซลลูโลสไม่ให้ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้ง่าย hemicellulose ประกอบด้วยโพลิเมอร์ของ ไซแลน (xylan) และแมนแนน (mannan) โดยไซแลนมีองค์ประกอบหลักคือ D-xylose และ D-arabinose ในขณะที่แมนแนนมีองค์ประกอบหลัก คือ D-glucose, D-galactose และ D-mannose องค์ประกอบหลักของ hemicellulose คือ ไซแลน ซึ่งในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน องค์ประกอบหลักของไซแลน คือ 4-O-methyl-D-glucoronic acid, L-arabinose หรือ acetyl groups ในขณะที่ไซแลนที่พบในหญ้าและธัญพืชต่างๆมีองค์ประกอบหลัก คือ L-arabinose โดยองค์ประกอบหลักเหล่านี้จะเป็นหมู่แทนที่ หรือ แขนงที่แยกออกมาจากสายหลักของ D-xylose นอกจากนี้พบว่าไซแลนยังเชื่อมต่อด้วยพันธะโควาเลนต์กับลิกนิน (lignin) ด้วย โดยลิกนินเป็นองค์ประกอบของพืชมีปริมาณอยู่ระหว่าง 5 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้งของพืช ลิกนินมีความสำคัญมากต่อการมีชีวิตของพืช เนื่องจากมีพันธะที่แข็งแรงช่วยเพิ่มความคงตัวของโครงสร้างพืช ป้องกัน hemicellulose และ เซลลูโลส จากการถูกย่อยสลายจากจุลินทรีย์ และมีส่วนสำคัญช่วยป้องกันพืชจากแสงอัลตราไวโอเลต เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติของลิกนิน คือ เป็นสารในกลุ่ม aromatic เป็นสาย โพลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ภายในโพลิเมอร์ของลิกนินมีพันธะที่แตกต่างกันเชื่อมกันอยู่แบบสุ่มอย่างน้อย 10 ชนิด (ภาพที่ 2) ซึ่งโครงสร้างที่ซับซ้อน มีน้ำหนักโมเลกุลมาก (100 kDa) และไม่มีพันธะที่สามารถย่อยสลายได้ จึงทำให้ลิกนินไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นการย่อยสลายทางชีวภาพของลิกนินต้องเกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกปล่อยออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เท่านั้น



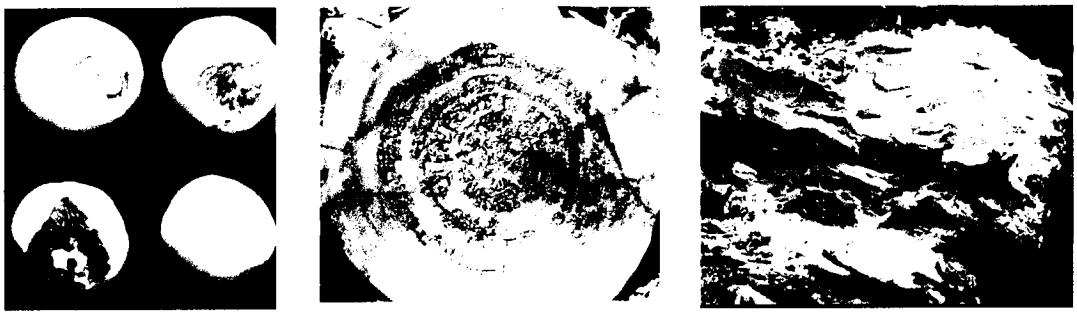
ภาพที่ 2 โครงสร้างของลิกนิน

ที่มา : www.ibwf.de/ibwf_mainframe_q.htm

2.1.2 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งในกลุ่ม lignocellulose

2.1.2.1 เชื้อรา

เชื้อราส่วนใหญ่ในกลุ่ม Ascomycetes, Deuteromycetes และ Basidiomycetes สามารถสร้างเอนไซม์ที่สำคัญออกมาเพื่อย่อยสลายวัสดุในกลุ่ม lignocellulose เชื้อราจะเจริญบนซากพืชที่ตายแล้วและย่อยสลายองค์ประกอบใดองค์ประกอบหนึ่งหรือหลายองค์ประกอบของไม้ โดยการปล่อยเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสออกมาภายนอกรอบๆเซลล์ เป็นสาเหตุทำให้เกิดความเสียหายต่างๆต่อเนื้อไม้ (soft rot, brown rot และ white rot) (ภาพที่ 3) เชื้อราที่ทำให้เกิดการผุพังในรูปของ soft-rot และ brown-rot จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในเนื้อไม้ แต่การย่อยสลายจะถูกจำกัดด้วยปริมาณของลิกนิน สำหรับ white-rot fungi ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes ซึ่งสามารถที่จะย่อยสลายทุกองค์ประกอบของพืชได้



(a) (b) (c)

ภาพที่ 3 การเกิด a) soft rot b) brown rot c) white rot ของเนื้อไม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา
ที่มา : http://webs.wichita.edu/mschneegurt/biol103/lecture21/lecture21.html

2.1.2.2 แบคทีเรีย

แบคทีเรียย่อยสลายองค์ประกอบของไม้ได้ช้ามากเมื่อเทียบกับเชื้อรา เนื่องจากขาดความสามารถในการแทรกผ่านโครงสร้างของพืช และยังต้องการสภาวะที่มีความชื้นค่อนข้างสูง แต่ยังมีการศึกษาพบว่ามีแบคทีเรียบางกลุ่มสามารถย่อยสลายลิกนินได้ โดยแบคทีเรียที่พบใน rumen ของสัตว์เป็นกลุ่มหลักที่สำคัญในการย่อยสลายเส้นใยของพืช เช่น จีนัส *Ruminococcus* sp., *Clostridium* sp. และ *Fibrobacter* sp. เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโพลิแซคคาร์ไรด์ได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถที่จะจับกับไฟเบอร์โดยใช้ cellulosome ซึ่งอยู่ที่ผิวของเซลล์ เชื้อในกลุ่ม actinomycetes บางชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มของ *Streptomyces* sp. ก็มีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งในกลุ่ม lignocellulose ได้เช่นกัน และยังมีการศึกษาเชื้อแบคทีเรียกลุ่มอื่นด้วยเช่นกัน โดยมีการศึกษาเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Rhizobium* spp. คือ *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ซึ่งกระบวนการบุกรุกเข้าสู่เซลล์พืชนั้น มีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์เซลลูเลส โดยเซลลูเลสจะทำให้ผนังเซลล์ของพืชบริเวณขนราก (root hair) อ่อนตัวลง และแบคทีเรียสามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่เซลล์พืชได้ ซึ่งจากผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์เซลลูเลสมีบทบาทต่อการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ของพืชโดยเชื้อจุลินทรีย์ (Chen *et al.*, 2004 : 111)

2.1.3 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายสารประกอบในกลุ่มเซลลูโลส

2.1.3.1 เซลลูโลส

มีเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมากมายมีความสามารถที่จะสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่จะสามารถสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นออกมาสำหรับย่อยสลายเซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์ การย่อยสลายเซลลูโลสในธรรมชาติเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์และปล่อยออกมากายนอกเซลล์ เช่น cellobiohydrolases, endoglucanases และ β-glucosidases โดยผลจากการย่อยสลายจะได้ glucose และ cellodextrins

2.1.3.2 เฮมิเซลลูโลส

จากการที่ hemicellulose เป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีเอนไซม์หลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้องเพื่อให้กระบวนการย่อยสลายเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ เอนไซม์ที่สำคัญ คือ endo-1,4-β-D-xylanase และ endo-1,4-β-D-mannanase ซึ่งผลิตภัณฑ์หลักจากการย่อยสลาย ได้แก่ xylobiose, xylotriose และ xylose

2.1.3.3 ลิกนิน (lignin)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลาย lignin ได้แก่ peroxidases, laccases, และ H_2O_2-producing oxidases โดยเอนไซม์ peroxidases และ laccases ก็คือ phenol oxidase การย่อยสลายลิกนินด้วยเอนไซม์นั้นเกิดปฏิกิริยาขึ้นอย่างไม่จำเพาะ และมีจุดที่เกิดปฏิกิริยา oxidation ขึ้นหลายตำแหน่งตรงบริเวณโครงสร้างของวงแหวนอะโรมาติก และพันธะภายในโมเลกุลของลิกนิน ปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยเอนไซม์จะคล้ายกับการย่อยสลายสารในกลุ่ม phenol (phenolic compound) ซึ่งจะก่อให้เกิด phenoxy radicals ในขณะที่ non-phenolic compounds จะถูกออกซิไดซ์ ให้อยู่ในรูปของ cation radicals

2.1.4 สารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะ (antibiotic) เป็นสารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในกลุ่มจุลินทรีย์ โดยเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึม และมีผลในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นเมื่อใช้ในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น สารปฏิชีวนะจัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) คือเป็นสารที่ไม่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตหรือเพื่อการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่างๆ แต่สารปฏิชีวนะอาจมีบทบาทในการแข่งขันเพื่อให้มีชีวิตรอดในธรรมชาติ ซึ่งในธรรมชาติแล้วมีจุลินทรีย์เพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ การสร้างสารปฏิชีวนะจะถูกสร้างขึ้นหลังจากที่เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเต็มที่แล้ว ซึ่งในสภาวะดังกล่าวปริมาณสารอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วและมีการสะสมสารมัธยันต์ (intermediate) บางชนิดซึ่งเชื้อจุลินทรีย์จะมีกระบวนการเปลี่ยนให้เกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ (จีรพรรณ์, 2545 : 7)

สารปฏิชีวนะที่ได้จากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้แตกต่างกัน และถึงแม้ว่าจะเป็นสารชนิดเดียวกันแต่วิถี (pathway) ในการสังเคราะห์ก็อาจแตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยเพื่อพยายามหาจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย รา หรือ ยีสต์ ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะซึ่งอาจมีการค้นพบสารชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติที่จำเพาะต่อการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดผลกระทบด้านสุขภาพ โภชนาการ หรือด้านเกษตรกรรม ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในอดีตที่ผ่านมานักวิจัยได้มีการศึกษาค้นหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะอย่างมากมาย โดยเฉพาะจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีส เนื่องจากเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในดิน และมีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศน์ในฐานะผู้ย่อยสลาย (decomposer) สารปฏิชีวนะที่สำคัญที่มีการค้นพบ เช่น colubricidin A, lactonamycin และ rubiginone มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Kong *et al.*, 1999 : 9219 ; Matsumoto *et al.*, 1999 : 269 ; Puder and Zeeck, 2000 : 329) pyrronamycin A และ B ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ (Asai *et al.*, 2000 : 66) เป็นต้น

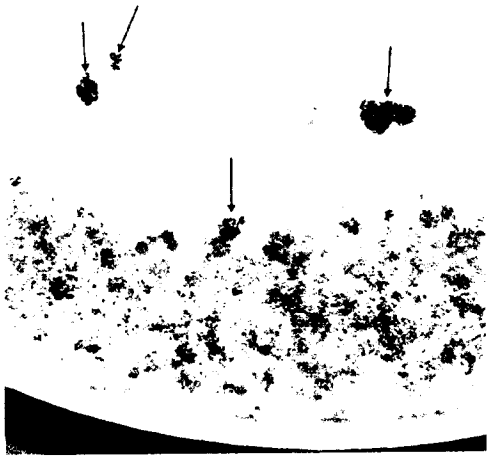
2.1.5 แอคติโนมัยซีส (Actinomycetes)

แอคติโนมัยซีส (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการเจริญเป็นเส้นสาย หรือเป็นเส้นใย (hypha) แอคติโนมัยซีสสามารถสร้างเส้นใยใต้ผิวอาหาร เรียกว่า substrate mycelium ซึ่งจะเกิดขึ้นก่อนเพื่อการนำสารอาหารไปใช้ในการเจริญ และการสร้างเส้นใยเหนือผิวอาหาร เรียกว่า aerial mycelium จะเกิดขึ้นมาภายหลังเพื่อการสืบพันธุ์ ในสภาวะแวดล้อมที่จำเพาะ เช่นในภาวะที่ขาดสารอาหาร น้ำ หรือมีการสะสมของสารเมตาบอไลท์ เป็นต้น

แอคติโนมัยซีสจัดเป็นแบคทีเรียที่แท้จริง คือ ผนังเซลล์ประกอบไปด้วย peptidoglycan มีสาร muramic acid และ diaminopimelic acid (DAP) ไม่มี chitin และ เซลลูโลส สร้างสปอร์หรือ โคนิเดียที่ไม่เคลื่อนที่ ในธรรมชาติเชื้อแอคติโนมัยซีสมีบทบาทที่สำคัญหลายด้าน คือ เป็นผู้ย่อยสลายซากพืชและซากสัตว์ให้มีขนาดโมเลกุลของสารเล็กลง ช่วยควบคุมสมดุลของประชากรจุลินทรีย์ จากการที่แอคติโนมัยซีสบางชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ นอกจากนี้เชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีสบางชนิด เช่น *Streptomyces scabies*, *Streptomyces ipomoeae* และ *Nocardia asteroides* อาจเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ในมนุษย์และสัตว์ได้

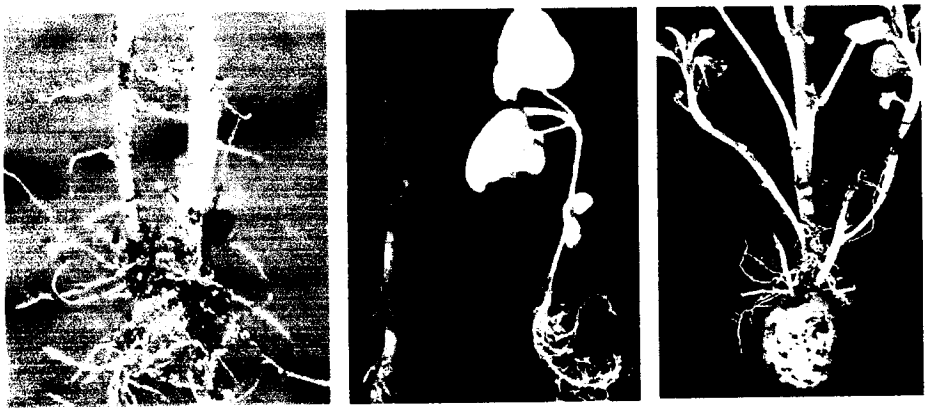
2.1.6 *Rhizoctonia solani*

จัดเป็นเชื้อราในกลุ่ม Basidiomycetes ซึ่งไม่สร้างสปอร์หรือโคนิเดียในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และจะสร้างเฉพาะ sexual spore หรือ basidiospore เท่านั้น ในธรรมชาติเชื้อ *R. solani* จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศซึ่งจะปรากฏในรูปของ sclerotia (ภาพที่ 4) ไม่เหมือนกับเชื้อราในกลุ่ม Basidiomycete ทั่วไป ที่ basidiospore อยู่ภายใน fruiting body หรือ เห็ด ซึ่งไม่ใช่โครงสร้างที่ปิดและสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมได้ ปัจจุบันระยะการเจริญของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อ *R. solani* ได้ใช้ชื่อเป็น *Thanatephorus cucumeris* เชื้อ *R. solani* เป็นเชื้อโรคที่พบได้ทั่วไปในดินและสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชได้หลายชนิด (ภาพที่ 5) โดยสามารถมีชีวิตรอดอยู่ในดินหรือเนื้อเยื่อของพืชได้เป็นเวลาหลายปี โดยการสร้างโครงสร้างขนาดเล็กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-3 มิลลิเมตร สีน้ำตาลจนถึงดำ (sclerotia) เช่น *R. solani* ที่ทำให้เกิดโรคในข้าวสามารถพัฒนาตัวเองโดยการสร้าง sclerotia ที่มีเยื่อหุ้มด้านนอกที่เหนียวทำให้สามารถลอยไปตามกระแสน้ำ และมีชีวิตอยู่รอดในน้ำได้ นอกจากนี้ *R. solani* ยังสามารถมีชีวิตรอดได้ในรูปของเส้นใยโดยยึดเกาะกับสารอินทรีย์ที่อยู่ในดินคล้ายกับพวก saprophytes (จุลินทรีย์ในกลุ่มผู้ย่อยสลาย) ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม sclerotia หรือ mycelium สามารถที่จะงอกออกเป็นเส้นใย (hyphae) ที่สามารถเข้าทำลายผลผลิตอย่างกว้างขวางได้ในเวลาต่อมา



ภาพที่ 4 sclerotia ของเชื้อ *Rhizoctonia* spp.

ที่มา : http://www.apsnet.org



ภาพที่ 5 พืชที่ถูกทำลายโดยเชื้อ *Rhizoctonia* spp.

ที่มา : http://www.viarural.com

เชื้อราจับกับพืชได้โดยการกระตุ้นจากสารเคมีชนิดหนึ่งที่ถูกปล่อยออกมา โดยเซลล์ของพืชที่กำลังเจริญ หรือจากเศษพืชที่กำลังถูกย่อยสลาย กระบวนการเข้าจับกับพืชเริ่มต้นโดยเส้นใยจะเข้าไปสัมผัสกับผิวด้านนอกของพืช หลังจากการจับเชื้อราจะเจริญที่ผิวด้านนอกของพืชและเกิดเป็นสาเหตุของโรคโดยการสร้างโครงสร้างพิเศษ (appresorium หรือ infection cushion) ที่สามารถแทรกเข้าสู่เซลล์พืช และทำให้สารอาหารออกมาจากเซลล์พืชเพื่อให้เชื้อราเจริญและพัฒนาต่อไป การติดเชื้อมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์หลายชนิดซึ่งจะช่วยย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช (cellulose, cutin และ pectin) หลังจากที่เชื้อราได้ทำลายเซลล์พืชแล้ว เส้นใยยังสามารถ

สามารถที่จะเจริญต่อไปบนเนื้อเยื่อของพืชที่ตายแล้วซึ่งปกติจะอยู่ในรูปของ sclerotia และเริ่มวงจรชีวิตใหม่เมื่อมีแหล่งอาหารใหม่ที่เหมาะสมต่อไป

2.1.7 ปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizers)

การผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้ในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง จากในอดีตที่การใช้ปุ๋ยชีวภาพเพื่อประโยชน์ในด้านการปรับปรุงโครงสร้างของดินแล้ว จากการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องยังพบว่าการใช้ปุ๋ยชีวภาพยังให้ประโยชน์ในด้านอื่นที่มีประโยชน์ต่อการทำเกษตรกรรมด้วยเช่นกัน โดยพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการผลิตปุ๋ยชีวภาพ ซึ่งจุลินทรีย์บางชนิดมีส่วนช่วยควบคุมประชากรของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่อพืชได้เป็นอย่างดี ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวถือเป็นข้อได้เปรียบมากกว่าการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างมาก เนื่องจากช่วยประหยัดต้นทุนในแง่การใช้สารเคมีควบคุมโรค แต่อย่างไรก็ตามการผลิตปุ๋ยชีวภาพให้มีธาตุอาหารเพียงพอต่อความต้องการของพืชนั้นยังต้องมีการศึกษาต่อไป

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาการผลิตเอนไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีสมีกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มากในดิน และมีคุณสมบัติสามารถสร้างเอนไซม์ได้ดี จากการที่เชื้อดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของผู้ย่อยสลาย (decomposer) ในระบบนิเวศน์ โดยนักวิจัยมีความคาดหวังว่าจะพบเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการกำจัดของเสียต่างๆที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบซึ่งพบมากในการทำเกษตรกรรมทั่วโลก Amira และคณะ (1989) ได้ทำการศึกษาหาเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดินประเทศอิรักพบว่าเชื้อ *Streptomycetes* สายพันธุ์ AT7 สามารถสร้าง cellulase ได้ดี (Amira *et al.*, 1989 : 109) และมีการศึกษาประชากรของเชื้อแอคติโนมัยซีสจากแหล่งดินที่ประเทศอินเดีย และจีน พบว่าในพื้นที่เกี่ยวกับการเลี้ยงสัตว์จะพบเชื้อแอคติโนมัยซีสได้มากและพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะและสารต้านมะเร็งที่หายากได้ นอกจากนี้บางสายพันธุ์ยังสามารถผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมได้ (Balagurunathan *et al.*, 1996 : 89)

Crawford และคณะ (1993) ได้ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดินบริเวณรอบๆรากพืช (rhizosphere) และจากดินบริเวณอื่น และศึกษาคุณสมบัติในการต้านทานต่อเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคของรากพืช พบว่าสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสได้หลายชนิด โดยมีเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 5

ไอโซเลต สามารถต้านทานการเจริญของเชื้อ *Pythium ultimum* ได้ดีมากจากการทดสอบบนอาหาร cornmeal agar (Crawford *et al.*, 1993 : 3899) Yuan และ Crawford (1995) ได้ศึกษาการใช้แอคติโนมัยซีสในการควบคุมเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในรากพืช พบว่าเชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC108สามารถสร้างสารต้านทานเชื้อรา *Pythium ultimum* หรือ *Rhizoctonia solani* ได้ (Yuan and Crawford, 1995 : 3119) นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Streptomyces lydicus* WYEC108 ยังมีอิทธิพลต่อการเพิ่มการเกิดปมรากของถั่ว (pea) ซึ่งเป็นผลดีต่อการทำเกษตรกรรม (Tokala *et al.*, 2002 : 2161) Chung และคณะ (1999) ได้ค้นพบแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ใหม่ คือ *Kitasatospora cheerisanensis* ที่แยกได้จากดินซึ่งสามารถผลิตสารต้านเชื้อราที่มีคุณสมบัติคล้าย bafilomycin ได้ (Chung *et al.*, 1999 : 753) และจากการศึกษาของ Chamberlain และ Crawford (2000) พบว่าสามารถใช้เชื้อ *Streptomycetes* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ cellulase, xylanase และ peroxidase ในการควบคุมประชากรของเชื้อราได้ (Chamberlain and Crawford, 2000 : 550)

Lee และ Hwang (2002) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สร้างสารต้านเชื้อราจากแหล่งดิน พบว่ามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากแหล่งดินส่วนใหญ่ และโคลนทะเลสาบ จัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* และแอคติโนมัยซีสที่แยกได้สามารถต้านทานเชื้อราในกลุ่ม *Alternalia mali*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* f.sp. cucumerinum และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งพบในดินของไร่ปลูกพริกไทย นอกจากนี้ยังสามารถต้านทานต่อเชื้อ *Magnaporthe grisea* และ *Phytophthora capsici* (Lee and Hwang, 2002 : 407)

นอกจากเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินแล้วยังมีการศึกษาค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีสจากแหล่งธรรมชาติอื่นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืชต่างๆ โดย Cao และคณะ (2004) ได้ทำการแยกเอนโดไฟต์ในกลุ่ม *Streptomyces* จากรากมะเขือเทศเพื่อตรวจสอบหาคุณสมบัติในการสร้างสารต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า 41 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *Streptomyces* ที่พบสามารถสร้างสารต้านทานเชื้อราได้ และมีเชื้อจำนวน 32 เปอร์เซนต์ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อ *R. solani* ได้ (Cao *et al.*, 2004 : 425) และ Taechowisan และคณะ (2005) ได้ศึกษาการสร้างสารทุติยภูมิจาก เชื้อ *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 ซึ่งเป็นเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากรากของ *Zingiber officinale* Rosc. (Zingiberaceae) พบว่าเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 สามารถต้านทานต่อ *Colletotrichum musae* และ *Fusarium oxysporum* ซึ่งสาเหตุของโรค anthracnose ในกล้วย และโรคใบเหี่ยวในข้าวสาลี ซึ่งสารดังกล่าว คือ 5,7-dimethoxy-4-*p*-methoxylphenylcoumarin and และ 5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin ซึ่งถือเป็นการค้นพบเป็นครั้งแรก (Taechowisan *et al.*, 2005 : 1691)

การผลิตปุ๋ยชีวภาพโดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรคเพิ่มเข้าไปในปุ๋ยชีวภาพด้วยได้มีการศึกษากันมานานแล้ว แต่การนำไปใช้ประโยชน์ยังอยู่ในวงจำกัดไม่แพร่หลาย และยังจำเพาะต่อการป้องกันจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่ผ่านมามีการศึกษาการนำ *Trichoderma viride* และ *T. harzianum* เข้ามาควบคุมเชื้อ *R. solani* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในข้าว โดยเชื้อ *T. viride* ทั้งสองสายพันธุ์สามรถผลิตเอนไซม์ chitinase ซึ่งจะเข้าไปย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อ *R. solani* และยับยั้งการเจริญได้ และยังมีการนำ *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma* และ *Bacillus* spp. เข้ามาป้องกันการติดเชื้อ *R. solani* ได้ สำหรับการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีสเข้ามาใช้ร่วมกับการผลิตปุ๋ยชีวภาพกำลังเป็นที่น่าสนใจ โดยมีการศึกษานำเชื้อแอคติโนมัยซีสเข้าไปย่อยสลายของเสียจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ปีก โดยผลจากการใช้จุลินทรีย์ดังกล่าวนอกจากเข้ามาช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (ภายใน 17 วัน) แล้วยังช่วยในด้านของการลดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ และยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ด้วย (Lyndall and Kurtboke, 2004 : 34)

การควบคุมเชื้อ *R. solani* ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชยังมีการวิจัยในการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพื่อเข้ามาควบคุมอีกมากมาย มีการศึกษาการใช้ *Pseudomonas* sp. DSS73 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณรอบรากของ sugar beet พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถต้านทานต่อเชื้อ *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* ได้ โดยจะผลิตสาร Amphisin ออกมาต้านทาเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค (Andersen *et al.*, 2003 : 37) นอกจากการควบคุมเชื้อ *R. solani* ด้วยจุลินทรีย์แล้วยังมีการศึกษาประยุกต์ใช้ essensial oil ที่ได้จาก mustard เข้ามาควบคุมเชื้อ *R. solani* ด้วย จากการศึกษาพบว่า essensial oil จะเข้าไปลดอัตราการเข้าไปจับกับสับสเตรทของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Dhingra *et al.*, 2004 : 683)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากมูลสัตว์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อชีวภาพ

3.1.1 เก็บตัวอย่างมูลสัตว์ คือ มูลไก่ มูลสุกร มูลวัว จากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ในเขตจังหวัดอุตรดิตถ์ และจังหวัดพิษณุโลก โดยนำมูลสัตว์ที่เก็บได้ใส่ในถุงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและนำมาบ่มให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.2 นำมูลสัตว์ที่ผ่านการอบแห้งมาทำการแยกเชื้อโดยนำตัวอย่าง 10 กรัม ละลายน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า (serial ten fold dilution) ให้ค่าการเจือจางอยู่ระหว่าง 10^{-4}-10^{-6} และนำตัวอย่างที่ความเข้มข้นดังกล่าวมาทำการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Actinomycete isolate agar (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน

3.1.3 นำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ปรากฏบนอาหาร Actinomycete isolate agar มา streak เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

3.2 การศึกษาคุณสมบัติการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยซีส เพื่อใช้เพิ่มประสิทธิภาพของปุ๋ยหมักชีวภาพต่อการต้านทานเชื้อ *R. solani*

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากมูลสัตว์แต่ละชนิด แตะบนอาหารทดสอบ (Hickey-Tresner) และนำเชื้อ *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบเพาะพร้อมกับเชื้อแอคติโนมัยซีส (ให้ระยะห่างของเชื้อราและเชื้อแอคติโนมัยซีสประมาณ 3 เซนติเมตร) และตรวจสอบขอบเขตการเจริญของเชื้อทดสอบต่อเชื้อแอคติโนมัยซีส หลังจากเวลาผ่านไป 3-5 วัน ซึ่งเชื้อราทดสอบจะไม่เจริญครอบคลุมเชื้อแอคติโนมัยซีส แสดงว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อทดสอบ

3.3 การศึกษาการสร้างเซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิตสารต้านทานเชื้อ *R. solani* เพื่อใช้เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพ

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถสร้างสารต้านทานเชื้อ *R solani* มาทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยถ่ายเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 2 loop ลงในอาหารสังเคราะห์ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และ

ตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ โดย DNS method (ภาคผนวก ค)

3.4 การศึกษาการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่นำมาใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ

3.4.1 นำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิตสารต้านทานเชื้อ *R. solani* รวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ จากข้อ 3 มาทดสอบการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่จะนำไปใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ โดยนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (เศษหญ้า แกลบ รำอ่อน และใบไม้แห้ง) มาการตากหรืออบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.4.2 นำวัสดุเหลือทิ้งมาบดให้ละเอียด และนำวัสดุเหลือทิ้งแต่ละชนิด ปริมาณ 4 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ

3.4.3 เตรียมหัวเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยถ่ายเชื้อแอคติโนมัยซีสที่เจริญในอาหารวุ้นเอียง (hickey) อยู่เป็นเวลา 3 วัน จำนวน 2 loop ลงในอาหาร NB ที่มีส่วนผสมของสับสเตรทแต่ละชนิดอยู่ปริมาณ 1 %w/v นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และทำการถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารแข็งแต่ละชนิดในปริมาณ 10%v/v เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

3.4.4 สกัดเอนไซม์ออกจากวัสดุเหลือทิ้งที่มีเชื้อเจริญอยู่ โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (0.1 M citrate phosphate buffer pH 5.0) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และกรอง crude enzyme ด้วยกระดาษกรอง (whatman No. 1) และนำส่วนใสมาทำการเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสมาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยทดสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ ด้วยวิธี DNS method

3.5 การศึกษาการติดเชื้อของ *R. solani* ต่อพืชทดสอบ

นำถั่วเขียวจำนวน 100 เมล็ด มาเพาะบนกระดาษทิชชูโดยฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วพอประมาณในกระบะสแตนเลสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำเมล็ดถั่วทิ้งออกไปแช่ใน suspension ของเชื้อ *R. solani* (เพาะเลี้ยง *R. solani* ในอาหารวุ้นเอียงเป็นเวลา 5 วัน และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ loop เขี่ยเชื้อราให้กระจาย) และตรวจสอบอัตราการเจริญของถั่วเขียว โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ถั่วที่ไม่ได้แช่ suspension ของเชื้อ *R. solani*)

3.6 การผลิตปุ๋ยชีวภาพร่วมกับการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีส

3.6.1 นำวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพ คือ มูลสัตว์ (ที่พบเชื้อแอคติโนมัยซีส) เศษพืช (แกลบ เศษหญ้าหรือใบไม้แห้ง) ขี้เถ้าแกลบ รำอ่อน โดยใช้อัตราส่วน 10 : 1 : 1 : 1 มาผสมให้เข้ากัน

3.6.2 เตรียมหัวเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยนำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลว (nutrient broth) (ภาคผนวก ข) ที่มีส่วนผสมของวัสดุเหลือทิ้งที่เหมาะสม จากข้อ 4.3 (1%w/v) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.6.3 นำหัวเชื้อแอคติโนมัยซีส (5% v/w) ที่เตรียมไว้รดบนกองวัสดุที่มีการผสมเข้ากันแล้ว ทำการคลุกเคล้าให้เข้ากัน และตักใส่กระสอบ มัดปากกระสอบให้แน่น ตั้งทิ้งไว้ห่างกันพอประมาณ เป็นเวลา 7 วัน โดยจะทำการกลับกระสอบปุ๋ยทุก 2 วัน นำปุ๋ยชีวภาพที่ผลิตได้ไผศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *R. solani* ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่าในพืชตัวอย่างต่อไป

3.7 การศึกษาประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพต่อการเจริญของพืช และการยับยั้งการเข้าทำลายพืชของเชื้อ *R. solani*

การทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ

ชุดที่ 1 ประกอบด้วยปุ๋ยหมักที่ผลิตได้จากการทดลอง ข้อ 5 โดยเทียบอัตราส่วนของการใช้ปุ๋ยชีวภาพจากพื้นที่จริง คือ 100, 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ (ปริมาณปุ๋ยที่เทียบใช้ในการทดลองเท่ากับ 3.5, 6.5, 9.5 และ 12.5 กรัมต่อพื้นที่ทดลองเท่ากับ 5600, 5200, 5066, 5000 ตารางเซนติเมตรตามลำดับ)

ชุดที่ 2 ประกอบด้วยปุ๋ยหมักที่ผลิตได้จากการทดลองข้อ 5 ที่ไม่มีหัวเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยเทียบอัตราส่วนของการใช้ปุ๋ยชีวภาพจากพื้นที่จริง คือ 100, 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ (ปริมาณปุ๋ยที่เทียบใช้ในการทดลองเท่ากับ 3.5, 6.5, 9.5 และ 12.5 กรัมต่อพื้นที่ทดลองเท่ากับ 5600, 5200, 5066, 5000 ตารางเซนติเมตรตามลำดับ)

นำพืชทดสอบ (ถั่วเขียวที่ผ่านการเพาะเป็นเวลา 2 วัน) มาแช่ใน suspension ของเชื้อ *R. solani* (เลี้ยงเชื้อราในอาหารวุ้นเอียงเป็นเวลา 7 วัน และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไป ใช้ loop เขี่ยเชื้อราให้กระจาย) และนำไปเพาะในปุ๋ยชีวภาพที่เตรียมไว้ในชุดที่ 1 และ 2 และมีชุดควบคุม คือดินที่ไม่ใส่ปุ๋ย

ทั้ง 2 ชุดการทดลองทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และดินที่ใช้ในแต่ละการทดลองได้ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อลดผลกระทบจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่พบในดิน ทำการตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของพืชทดสอบ ระหว่างชุดทดลองกับชุดควบคุม

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากมูลสัตว์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อชีวภาพ

จากการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์ คือ มูลวัว มูลสุกร และมูลค้างคาว ในจังหวัดพิษณุโลก เพื่อนำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีส บนอาหาร Actinomycetes isolate agar (ภาพที่ 6) พบว่า สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสได้จำนวน 146 ไอโซเลต (ตารางที่ 1)

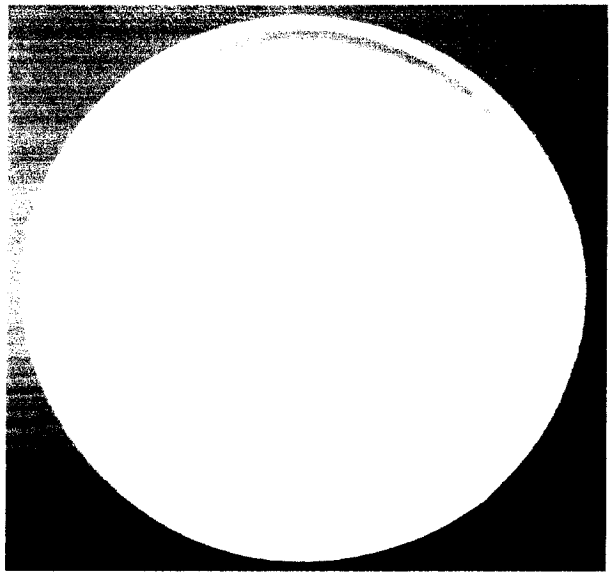
ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากตัวอย่างมูลสัตว์

ตัวอย่างมูลสัตว์	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีส (ไอโซเลต)
มูลสุกร	32
มูลสุกร	22
มูลวัว	29
มูลวัว	25
มูลค้างคาว	20
มูลค้างคาว	18
รวม	146

ภาพที่ 6 เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากมูลสัตว์

4.2 ผลการศึกษาคุณสมบัติการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยซีส เพื่อใช้เพิ่มประสิทธิภาพของปุ๋ยหมักชีวภาพต่อการต้านทานเชื้อ *R. solani*

จากการทดสอบคุณสมบัติการสร้างสารปฏิชีวนะต้านทานเชื้อโรคบนอาหาร PDA โดยใช้เชื้อ *R. solani* ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากมูลสัตว์ โดยวิธี dual culture method พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 6 ไอโซเลต คือ B6, B10, P16, B4, B41 และ B15 สามารถต้านทานเชื้อทดสอบได้โดยให้วงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) เท่ากับ 22, 26, 19, 20, 30 และ 26 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 7) โดยเชื้อ B4 แยกได้จากมูลสุกร



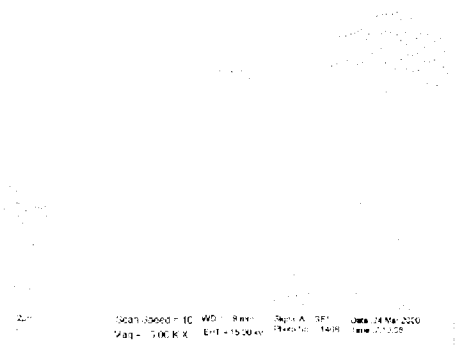
ภาพที่ 7 การต้านทานการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีส รหัส B4 ต่อเชื้อรา *R. solani*

4.3 ผลการศึกษาการสร้างเซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิตสารต้านทานเชื้อ *R. solani* เพื่อใช้เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพ

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส (B6, B16, B16P, B4, B41 และ B15) ที่สามารถสร้างสารต้านทานเชื้อทดสอบ โดยนำเชื้อแอคติโนมัยซีสมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี carboxymethylcellulose เป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ข) เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน และนำน้ำเลี้ยงมาทำการตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS method พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีส B6, B10, B16F,

B4, B41 และ B15 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.242, 0.204, 0.242, 0.337, 0 และ 0.197 unit/ml. ตามลำดับ

เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีส B4 มาทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 8 A และ B) พบว่าเซลล์มีลักษณะกลมต่อกันเป็นสาย ติดสีแกรมบวก และเมื่อทำการจัดจำแนกโดย Bergey manual พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีส B4 อยู่ในกลุ่ม *Streptomycetes* sp.



(A) (B)

ภาพที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีส

A) ลักษณะของเซลล์ภายใต้ SEM

B) ลักษณะของเซลล์ภายใต้ Light microscope

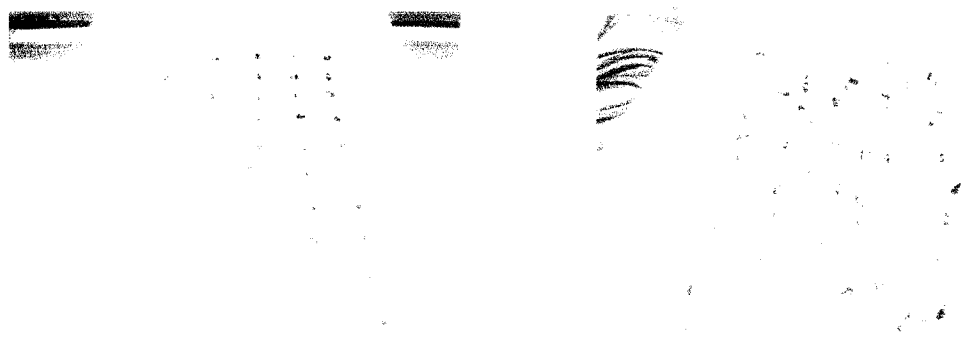
4.4 ผลการศึกษาการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ B4

จากการศึกษาการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ B4 โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 4 ชนิด คือ หญ้าแห้ง แกลบ รำอ่อน และใบไม้แห้ง และทำการเพาะเชื้อในสับสเตรทเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง และนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ B4 สามารถย่อยสลายเศษหญ้าแห้งได้ดีที่สุดโดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 3.5 Unit/g.substrate ในขณะที่วัสดุเหลือทิ้งชนิดอื่นไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ B4 สามารถย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่จะนำมาใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพได้ และสามารถนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตปุ๋ยชีวภาพโดยมีวัสดุเหลือทิ้งเช่นหญ้าแห้งเป็นส่วนประกอบด้วยต่อไป

75531

4.5 ผลการศึกษาการติดเชื้อของ *R. solani* ต่อพืชทดสอบ

จากการทดสอบการติดเชื้อของ *R. solani* ต่อพืชทดสอบ คือ ถั่วเขียว โดยการนำถั่วเขียวจำนวน 100 เม็ด ที่ผ่านการเพาะเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไปแช่ใน suspension ของเชื้อ *R. solani* (เพาะเลี้ยง *R. solani* ในอาหารวุ้นเอียงเป็นเวลา 5 วัน และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ loop เขี่ยเชื้อราให้กระจาย) พบว่าอัตราการงอกของถั่วเขียวลดลง 50เปอร์เซ็นต์ และการเจริญของถั่วเขียวช้ากว่าปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ถั่วเขียวที่ไม่แช่ suspension ของเชื้อรา) (ภาพที่ 9)



A B

ภาพที่ 9 การเจริญของถั่วเขียวหลังจากที่แช่ใน suspension ของเชื้อ *R. solani*

A) ระยะเวลา 2 วัน

B) ระยะเวลา 4 วัน

4.6 ผลการผลิตปุ๋ยชีวภาพร่วมกับการใช้เชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ B4

เมื่อดำเนินการผลิตปุ๋ยชีวภาพจากการทดลอง ข้อ 5 โดยนำเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ B4 เข้าไปช่วยส่งเสริมการย่อยสลายสารประกอบในกลุ่มเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือทางการเกษตร หลังจากการหมักปุ๋ยเป็นเวลา 7 วัน พบว่าลักษณะทางกายภาพของปุ๋ยที่ปรากฏ คือ สี และความร่วนซุย มีความคล้ายคลึงกัน โดยในการทดลองไม่ได้ทดสอบหาองค์ประกอบของแร่ธาตุที่จำเป็น (N,P,K) รวมถึงสัดส่วนของแร่ธาตุอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชซึ่งจะดำเนินการในการทดลองขั้นสูงต่อไป

4.7 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพที่มีเชื้อต่อการยับยั้งเชื้อ *R. solani* ในพืชทดลอง

จากการทดลองการนำปุ๋ยชีวภาพไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *R. solani* โดยทำการนำถั่วเขียว (การทดลองละ 25 ต้น) ที่แช่ใน suspension ของเชื้อรา *R. solani* มาเพาะปลูกในดิน (นำปุ๋ยใส่ในดินก่อนทำการเพาะปลูกเป็นเวลา 2 วัน) ที่มีการใส่ปุ๋ยชีวภาพที่เตรียมไว้(จากการทดลองข้อ 5.0 ใส่เชื้อ *Streptomycetes* สายพันธุ์ B4 ปริมาณ 10%v/w) โดยมีการเตรียมอัตราส่วนของปุ๋ยชีวภาพต่อพื้นที่ทดลอง คือ 100, 200, 300 และ400 กิโลกรัมต่อไร่ (เมื่อเทียบอัตราส่วนต่อพื้นที่ทดลองคือกระบะอลูมิเนียมจะใช้ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพเท่ากับ 3.5, 6.5, 9.5 และ 12.5 กรัมต่อพื้นที่ทดลอง) โดยชุดควบคุมจะแบ่งเป็น 2 ชุด คือ ดิน (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) ที่ใช้เพาะถั่วเขียวที่ผ่านการแช่ suspension ของเชื้อรา และดินที่ใช้เพาะปลูกถั่วเขียวที่ไม่ได้แช่ suspension ของเชื้อรา *R. solani* โดยผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 10 ถั่วเขียวที่ผ่านการแช่ suspension ของเชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้และมีอัตราการรอดเพียง 16 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

จากผลการทดลองพบว่าการเพิ่มอัตราส่วนของปุ๋ยชีวภาพต่อพื้นที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการ ยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *R. solani* ต่อต้นถั่วเขียวได้ดีขึ้น (ตารางที่2, ภาพที่ 11) โดยพบว่าเมื่อใช้ปุ๋ยชีวภาพที่มีเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ B4 ร่วมด้วยปริมาณ 3.5, 6.5, 9.5 และ 12.5 กรัมต่อพื้นที่ทดลอง (หรือเทียบได้เท่ากับ 100, 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่) อัตราการรอดชีวิตของถั่วเขียวเท่ากับ 36, 64, 80 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ถั่วเขียวที่เจริญในชุดการทดลองที่ใช้ปุ๋ยชีวภาพที่ไม่มี *Streptomyces* สายพันธุ์ B4 อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 22 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (B) (ภาพที่ 10) และแนวโน้มการรอดชีวิตของถั่วเขียวในดินที่มีการเติมปุ๋ยชีวภาพทั้งใส่และไม่ใส่เชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ B4 มีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกัน(ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของถั่วเขียวที่ผ่านการแช่ suspension ของเชื้อ *R. solani* เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในดินที่มีปุ๋ยชีวภาพที่เติมและไม่เติมเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ B4

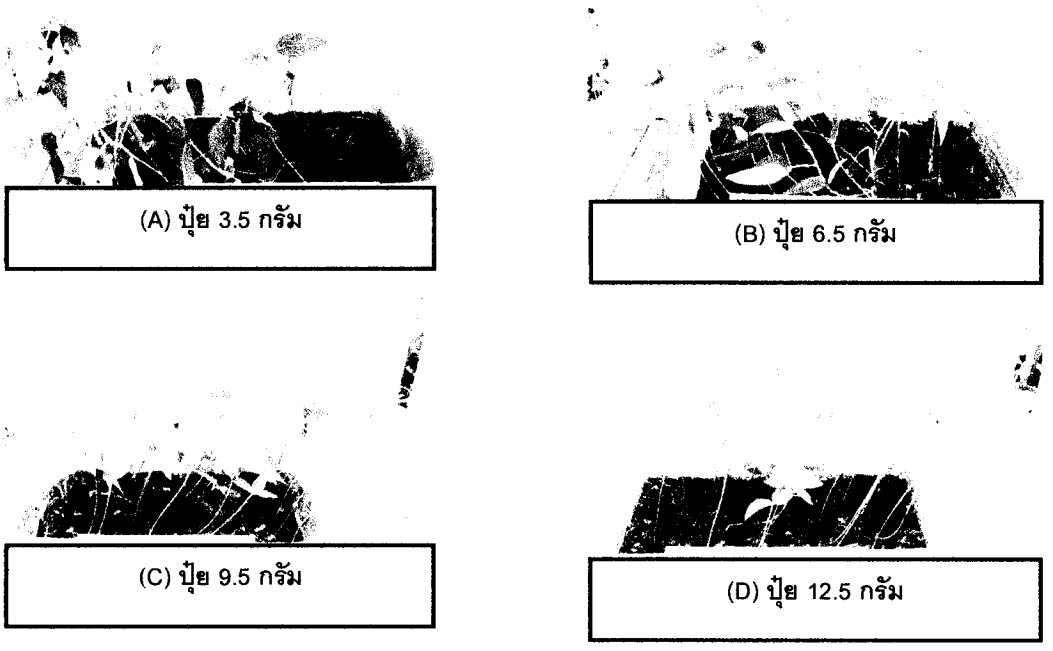
ปริมาณปุ๋ย (กรัม)	อัตราการรอดชีวิตของพืชทดสอบ (%)			
	ปุ๋ยชีวภาพที่ไม่มีหัวเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์ B4		ปุ๋ยชีวภาพที่มีหัวเชื้อ *Streptomyces*สายพันธุ์ B4	
	พืชทดสอบที่ไม่มี *R. solani*	พืชทดสอบที่มี *R. solani*	พืชทดสอบที่ไม่มี *R. solani*	พืชทดสอบที่มี *R. solani*
3.5	100	36	100	52
6.5	100	40	100	64
9.5	100	44	100	80
12.5	100	56	100	88

หมายเหตุ : ผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ

ภาพที่ 10 ชุดการทดลองควบคุม (ดินไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพ)

A) ถั่วเขียวที่ไม่ได้แช่ suspension ของเชื้อรา *R. solani* (อัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์)

B) ถั่วเขียวที่ผ่านการแช่ suspension ของเชื้อรา (อัตราการรอดชีวิต 16 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 11 อัตราการอดชีวิตของถั่วเขียว เมื่อใช้ปุ๋ยชีวภาพที่มี *Streptomyces* B4 ปริมาณเท่ากับ 3.5, 6.5, 9.5 และ 12.5 กรัม ต่อพื้นที่ทดลอง

(A) อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย เท่ากับ 13 ต้น คิดเป็น 52 เปอร์เซ็นต์

(B) อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย เท่ากับ 16 ต้น คิดเป็น 64 เปอร์เซ็นต์

(C) อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย เท่ากับ 20 ต้น คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์

(D) อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย เท่ากับ 22 ต้น คิดเป็น 88 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 5

สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการพัฒนาการผลิตปุ๋ยชีวภาพร่วมกับการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีสจากมูลสัตว์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีสยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani* ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าในถั่วเขียว โดยจากการทดลองพบว่าสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากมูลสัตว์ตัวอย่างจำนวน 146 ไอโซเลต โดยเชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ B4 ที่แยกได้จากมูลสุกรสามารถสร้างสารปฏิชีวนะต้านทานเชื้อ *R. solani* โดยให้วงใสเท่ากับ 30 มิลลิลิตร และเมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ B4 มาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า คือ เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces* sp.

5.2 อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองเชื้อแอคติโนมัยซีสซึ่งแยกได้จากมูลสุกร สามารถที่จะให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด และสามารถสร้างสารต้านทานการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุด จึงได้มีการนำเชื้อราดังกล่าวมาจำแนกพบว่าอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* sp. มีการศึกษาหาเชื้อแอคติโนมัยซีสในมูลสัตว์ปีก เพื่อนำมาใช้พัฒนาผลิตปุ๋ยชีวภาพซึ่งเชื้อที่พบสามารถย่อยสลาย keratin และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ (Lyndal and Kurtböke, 2004 : 34) จากการศึกษานี้ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B4 สามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งในกลุ่มของหญ้าแห้งได้ดีที่สุดโดยให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 3.5 Unit/g ซึ่งมีการศึกษาพบว่าเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบของพืชมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และมีส่วนสำคัญต่อการชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ (Palonen, 2004 : 11) ในขณะที่วัสดุเหลือทิ้งอื่นที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลสอยู่เช่นกัน (แกลบ รำอ่อน และใบไม้แห้ง)แต่ไม่สามารถชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์โดยเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B4 ได้นั้นอาจเป็นเพราะโครงสร้างของเซลลูโลสซึ่งรวมกับโมเลกุลอื่นๆ ที่อยู่ในเนื้อเยื่อของพืช เช่น เฮ-มิเซลลูโลส และลิกนิน รวมตัวกันและมีความซับซ้อนมาก ยากแก่การเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Palonen, 2004 : 11) ดังนั้นเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B4 ซึ่งสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ และเอนไซม์เซลลูเลสจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ร่วมกับการผลิตปุ๋ยชีวภาพ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในขณะที่

เกิดกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ ในขณะเดียวกันสามารถให้ผลต้านทานการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้

จากผลการทดสอบการติดเชื้อของ *R. solani* ต่อพืชทดสอบ คือ ถั่วเขียว พบว่าเชื้อ *R. solani* สามารถยับยั้งการเจริญของพืชทดสอบได้ โดยมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 16 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani* ต่อพืชทดสอบนั้นอาจมีหลายสาเหตุ มีการศึกษาพบว่าเมื่อเส้นใยของเชื้อ *R. solani* จับกับผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อพืชและเจริญ ในเวลาต่อมาจะสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า appresorium เพื่อแทรกผ่านเข้าสู่เซลล์ของพืช สารอาหารที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ของพืชจะเป็นอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อรา และเชื้อ *R. solani* สามารถเจริญบนเนื้อเยื่อพืชที่ตายแล้ว และสร้าง sclerotia เพื่อเริ่มวงจรชีวิตใหม่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อไป ดังนั้นจากการทดลองจึงนำถั่วเขียวมาใช้เป็นพืชทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพที่มีการเติมหัวเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากมูลสัตว์ต่อการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *R. solani*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพที่มีการเติม *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B4 เปรียบเทียบกับปุ๋ยชีวภาพที่ไม่มีการเติม *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B4 พบว่าปุ๋ยชีวภาพที่มีเชื้อ ปุ๋ยชีวภาพที่มีการเติม *Streptomyces* สายพันธุ์ B4 นั้นสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของพืชทดสอบได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 2) โดยจากการทดลองทำการแช่เมล็ดถั่ว (เพาะให้มีการงอก 1-2 วัน) ใน suspension ของเชื้อ *R. solani* ก่อนที่จะนำไปเพาะในดิน (ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) ที่มีการใส่ปุ๋ยชีวภาพแล้วเป็นเวลา 2 วัน จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อรา *R. solani* ถูกยับยั้งการเจริญเมื่อมีการเตรียมดินด้วยปุ๋ยชีวภาพทั้ง 2 แบบ (ใส่และไม่ใส่หัวเชื้อ) ผลการยับยั้งที่เกิดขึ้นอาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ที่อยู่ในปุ๋ยชีวภาพมีคุณสมบัติที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *R. solani* โดยจากการทดลองแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากมูลสัตว์ก็พบว่ายังมีแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์อื่นที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani* ได้เช่นเดียวกับกับ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B4 ดังนั้นในปุ๋ยชีวภาพที่มีการเติม *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B4 เพิ่มเข้าไปอาจช่วยเพิ่มให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *R. solani* มีมากขึ้น นอกจากผลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญของ *R. solani* และเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่เชื้อจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพผลิตขึ้นมาอาจส่งผลกระทบต่อเชื้อ *R. solani* ได้เช่นกัน โดยมีการศึกษาพบว่าเชื้อใน*กลุ่ม* *Streptomyces* spp. สามารถที่จะสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม cellulase, hemicellulase, chitinase, amylase, glucanase และอีกหลายชนิด เข้าไปย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งมีองค์ประกอบของเซลลูโลสและไคติน (Yuan and Crawford, 1995 :3119 ; Chamberlain and Crawford, 2000 : 550)

จากการทดลองสรุปได้ว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B4 ที่แยกได้จากมูลสุกรซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะต้านทานเชื้อ *R. solani* รวมถึงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่

สามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้ง คือ หญ้าแห้ง สามารถนำมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพต่อการป้องกันการติดเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าในพืชทดสอบ คือ ถั่วเขียวได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ยังไม่ได้มีการควบคุมปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani* โดยสมบูรณ์ ซึ่งจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายิ่งเพิ่มปริมาณปุ๋ยมากขึ้นผลการยับยั้งจะมีมากตามไปด้วย (12.5 กรัมต่อพื้นที่ทดลองหรือ 400 กิโลกรัมต่อไร่ สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของพืชทดสอบได้ 88 เปอร์เซ็นต์) ถ้ามีการศึกษาหาวิธีการเตรียมหัวเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมอาจช่วยลดอัตราการใช้ปุ๋ยชีวภาพลงและช่วยลดต้นทุนในการดำเนินการ รวมถึงเพิ่มพื้นที่ในการนำปุ๋ยชีวภาพไปใช้ได้ต่อไป

การทดลองทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani* ไม่ได้มีการควบคุมปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และแสง ซึ่งส่งผลโดยตรง ต่อการเจริญของพืชทดสอบ ดังนั้นอาจทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน จากการทำการทดลองซ้ำในช่วงเวลาที่ต่างกัน

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

จีรพรรณ์ ใจอินผล. (2545). **การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีสจากดินในถ้ำน้ำลอด จังหวัดแม่ฮ่องสอน ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของฟังไจ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Asai, A., Y. Sakai, H. Ogawa, Y. Yamashita, S. Kakita, K. Ochiai, T. Ashizawa, A. Mihara, T. Mizukami and H. Nakano. (2000). Pyrronamycin A and B, novel antitumor antibiotics containing pyrrole-amide repeating unit produced by *Streptomyces* sp. **Journal of Antibiotics**. 53. 66-69.

Amira, M.Al-Tai., A. Abdul-Nour. Basima and H. Abdul-Razzak. Shatha. (1989). Cellulase production from *Actinomycetes* isolated from Iraqi soils : I Characterization of a cellulolytic Streptomyces sp. strain AT7. **Journal of Islamic Academic of Sciences**. 2:2. 109-112.

Andersen, J.B., B. Koch, T.H. Nielsen, D. Sørensen, M. Hansen, O. Nybroe, C. Christophersen, J. Sørensen, S. Molin and M. Givskov. (2003). Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. **Microbiology**. 149. 37-46.

Balagurunathan, R. L. Xu and C. Jiang. (1996). Diversity of soil *Actinomycetes* from south India and south China. **Actinomycetes**. 4. 89-94.

Cao, L., Z. Qui, J. You, H. Tan and Zhou. (2004). Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Letters in Applied Microbiology**. 39. 425-430.

Chamberlain, K. and D.L. Crawford. (2000). Thatch biodegradation and antifungal activities of two lignocellulolytic *Streptomyces* strains in laboratory cultures and in golf green turfgrass. **Canadian Journal of Microbiology**. 46. 550-558.

Chen, P.J., T.C. Wei, Y.T. Chang and L.P. Lin. (2004). Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Sinorhizobium fredii*. **Botanical Bulletin Acadamia Sinica**. 45. 111-118.

Chung, Y.R., K.C. Sung, H.K. Mo, D.Y. Son, J.S. Nam, J. Chun and K.S. Bae. (1999). *Kitasatospora cheerisanensis* sp. nov., a new species of the genus Kitasatospora that produces an antifungal agent. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 49. 753-758.

Crawford, D.L., J.M. Lynch, J.M. Whipps and M.A. Ousley. (1993). Isolation and characterization of *Actinomycete* antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**. 59. 3899-3905.

Dhingra, O.D, M.L.N. Costa, G.J. Silva, E.S.G. Mizubuti. (2004). Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery. **Fitopatologia Brasileira**. 29. 683-686.

Kong, F., D.Q. Liu, J. Nietsche, M. Tischler and G.T. Carter. (1999). Colubricidin A, a novel macrolide antibiotic from a *Streptomyces* sp.. **Tetrahedral Letters**. 40. 9219-9223.

Lee, J.Y. and B.K. Hwang. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. **Canadian Journal of Microbiology**. 48. 407-417.

Lyndall M.P. and D.I. Kurtböke. (2004). Development of an environmentally friendly biofertilizer with keratin degrading and antiboitic producing actinomycetes. **Actinomycetologica**. 18.34-42.

Matsumoto, N., T. tsuchida, M. Maruyama, N. Kinoshita, Y Homma, H. Iinuma, T. Sawaw, M. Hamada, T. Takeuchi. (1999). Lactonamycin, a new antimicrobial antibiotic produced by *Streptomyces rishiriensis* MJ773-88K4. **Journal of Antibiotics**. 52. 269-275.

Palonen, H. (2004). Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. VTT plubication 520. Finland.

Puder, C. and A. Zeeck. (2000). New biologically active rubiginones from *Streptomyces* sp.. **Journal of Antibiotics**. 53. 329-336.

Taechowisan, T. C. Lu, Y. Shen and S. Lumyong. (2005). Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology.** 151. 1691-1695.

Tokala, R.K., J.L. Strap, C.M. Jung, D.L. Crawford, M.H. Salove, L.A. Deobald, J.F. Bailey and M.J. Morra. (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces*

lydicus WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). **Applied and Environmental Microbiology**. 68. 2161-2171.

Yuan,W.M. and D.L. Crawford. (1995). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. **Applied and Environmental Microbiology**. 61. 3119-3128.

Fiber dynamic. [Online]. Available from : http://www.abcbodybuilding.com

Environmental Biotechnology and Enzymes. [Online]. Available from http://www.ibwf.de/ibwf_mainframe_q.htm

The fungus among us (human fungal diseases, mildews). [Online]. Available from http://webs.wichita.edu/mschneegurt/biol103/lecture21/lecture21.html

Plant disease lessons. [Online]. Available from. http://www.apsnet.org

http://www.viarural.com

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อุปกรณ์ และสารเคมี

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

1.2 เครื่องเหวี่ยง (refrigeraration centrifugation)

1.3 ตู้เพาะเชื้อ (incubator)

1.4 เครื่องเขย่า (rotary shaker)

1.5 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

1.6 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave)

1.7 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)

1.8 จานเพาะเชื้อ

1.9 หลอดทดลอง

1.10 ขวดรูปชมพู่

2. สารเคมี

2.1 Carboxymethylcellulose

2.2 3,5-dinitrosalisylic acid

2.3 K-Na-tartrate

2.4 Citric acid

2.5 Na_2HPO_4

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. อาหารแยกเชื้อแอคติโนมัยซีส

Actinomycetes isolate agar (Ronald, 1993)

Sodium propionate	4.0	กรัม
Sodium casemate	2.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
Asparagine	0.1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.001	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.0	

Hickey-Tresner agar

Dextrin	10.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Beef extract	1.0	กรัม
N-zamine	2.0	กรัม
$CaCl_2.6H_2O$	0.02	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.02	

2. อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์

NH_4NO_3	2.0	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.05	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
Yeast extract	0.01	กรัม
Carboxymethylcellulose	10.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

3. อาหารเตรียมหัวเชื้อ

Nutrient broth

Beef extract	5.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันนำไปฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมี

1. DNS reagent

3,5-dinitrosalicylic acid	0.1%
phenol	0.2%
Na_2SO_3	0.05%
NaOH	1.0%

ละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid ในสารละลาย 1.0%w/v NaOH จนเข้ากันก่อน เติม phenol และ Na_2SO_3 ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เก็บในขวดสีชา

2. Na-K tratrate 40% (w/v)

นำ Na-K tratrate 40 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml ให้เข้ากัน

3. Citrate-phosphate buffer

Stock solution

A: 0.1 M citric acid (19.21g ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

B: 0.2 M $Na_2HPO_4.7H_2O$ (53.65 g ในน้ำกลั่น1,000 ml)

Working solution

X ml of A + Y ml of B เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ml

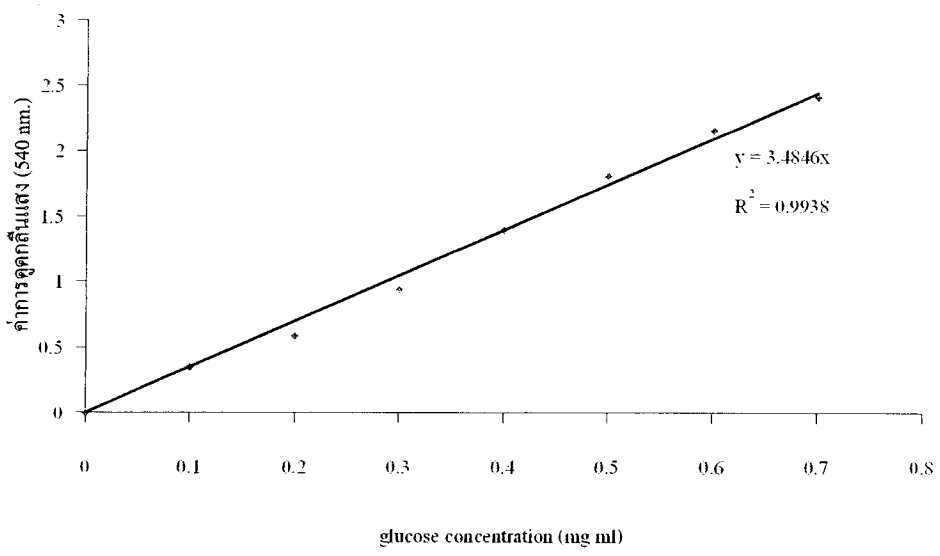
X	Y	พีเอช
44.6	5.4	2.6
42.2	7.8	2.8
39.8	10.2	3.0
37.7	12.3	3.2
35.9	14.1	3.4
33.9	16.1	3.6
32.3	17.7	3.8
30.7	19.3	4.0
29.4	20.6	4.2
27.8	22.2	4.4
26.7	23.3	4.6
25.2	24.8	4.8
24.3	25.7	5.0
23.3	26.7	5.2
22.2	27.8	5.4
21.0	29.0	5.6
19.7	30.3	5.8
17.9	32.1	6.0
16.9	33.1	6.2
15.4	34.6	6.4
13.6	36.4	6.6
9.1	40.9	6.8
6.5	43.6	7.0

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐาน และการวัดปริมาณเอนไซม์

1. การทำกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

1. เตรียม stock solution ของกลุโคสความเข้มข้น 500 μg/ml โดยชั่งกลูโคส 50 mg ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตร เป็น 100 ml โดยใช้ volumetric flask จะได้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 500 μg/ml
2. เตรียมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยการดูดสารละลายกลูโคสจาก stock solution ปริมาตร 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 ml และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 1.0 ml จะทำให้แต่ละหลอดการทดลองมีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 50,100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450และ 500 μg/ml ตามลำดับ
3. เติมสารละลาย DNS หลอดละ 2.0 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที
4. เติมสารละลาย 40% Na-K tratrate ลงไปหลอดละ 1.0 ml
5. ทิ้งไว้ให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 nm
6. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาล กับค่าการดูดกลืนแสง



ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

2. การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (cellulase activity)

การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จะวัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นระหว่างการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรต โดยดูจากสีที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของสารละลาย dinitrosalicylic reagent(DNS) กับน้ำตาลที่เกิดขึ้น

วิธีการทดลอง

1. เตรียมส่วนผสมของสำหรับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรต ดังตาราง

reaction	Reaction mixture		
	enzyme (ml)	1%substrate(ml)	Buffer(ml)
Control(C)	-	-	1.0
Enzyme+substrate(ES)	0.5	0.5	-
Enzyme blank(EB)	0.5	-	0.5
Substrate blank(SB)	-	0.5	0.5

2. นำส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้ง4 ชนิด ไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที
3. เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 2.0 ml เขย่าให้เข้ากันและต้มให้เดือด เป็นเวลา 10 นาที
4. เติมสารละลาย 40% Na-K tratrate ลงไปหลอดละ 1.0 ml
5. ทิ้งไว้ให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

หน่วยการทำงานของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 Unit ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ออกมา 1 μmol ภายใน 1 นาที

ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงสุทธิ (ΔA) ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งมี ΔA=ES-EB-SB

การคำนวณปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส

การทดลองใช้ reaction time เท่ากับ 15 นาที ได้น้ำตาลกลูโคส=X mg

คิดเป็น $X \times 10^3/180$ μmol

(molecular weight ของน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 180)

ดังนั้นใน 1 นาที จะได้ น้ำตาลกลูโคส $=X \times 10^3/(180 \times 15)$

จากการทดลองใช้ปริมาณเอนไซม์ =0.2 ml

ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ $=X \times 10^3/(180 \times 15 \times 0.2\ U/ml)$

ประวัติผู้ทำวิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวจีรพรรณ์ ใจอินผล
หมายเลขบัตรประชาชน	3501500155748
ตำแหน่งปัจจุบัน	อาจารย์ประจำตามสัญญา
หน่วยงาน	โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาสาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
E-mail	jo_jeab@yahoo.com
ประวัติการศึกษา	วท.บ วิทยาศาสตรบัณฑิต จุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาสาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วท.ม วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาสาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ	Applied Microbiology