

การใช้แอกติโนมัยซีทจากดินเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉียวของมะเขือเทศ

Using of Soil Actinomycetes to Inhibit *Ralstonia solanacearum* Causal Agent of Tomato Wilt Disease

อรอุมา เรืองวงษ์^{1/*} และ เบญจวรรณ ใจจันทร์^{1/}
On-Uma Ruangwong^{1/*} and Benjawan Jaijanthra^{1/}

^{1/}ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

^{1/}Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: On-uma.r@cmu.ac.th

(Received: 15 August 2016; Accepted: 18 November 2016)

Abstract: Actinomycetes were isolated from soil surrounding tomato root which collected from tomato plantation areas of Inthanon Royal Agricultural Station and Khun Wang Royal Project Development Center. A total of 126 actinomycetes isolates were obtained and used for evaluation of antagonistic activity against *Ralstonia solanacearum* (causes bacterial wilt disease of tomato) by using dual culture method on NA medium. Seventeen actinomycetes isolates demonstrated an ability to inhibit growth of *R. solanacearum*. The highest antagonistic activity are shown by T-11 isolate with 16.50 mm of inhibition zone. Moreover, T-11 isolate could produce siderophore and cellulase enzyme under agar plate assay. Identification of isolate T-11 based on 16S rRNA gene sequencing was analyzed to confirm the species. The result showed that partial gene sequencing of T-11 isolate was 96% homology with *Streptomyces mirabilis*.

Keywords: Wilt disease, tomato, actinomycetes

บทคัดย่อ: การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณรอบรากของต้นมะเขือเทศในแปลงปลูกของสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง สามารถแยกเชื้อได้จำนวน 126 ไอโซเลท เมื่อคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศ ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร NA พบแอคติโนมัยซีทที่เป็นปฏิปักษ์ จำนวน 17 ไอโซเลท โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค คือ ไอโซเลท T-11 ซึ่งมีความกว้างบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 16.50 มิลลิเมตร เมื่อนำไอโซเลท T-11 มาตรวจสอบการสร้างสารสำคัญบางชนิด พบว่าไอโซเลท T-11 สามารถสร้างสาร siderophore และสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารทดสอบได้ และเมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของไอโซเลท T-11 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลท T-11 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวเหมือนกับเชื้อ *Streptomyces mirabilis* ถึง 96 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: โรคเหี่ยวเฉา มะเขือเทศ แอคติโนมัยซีท

คำนำ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae มะเขือเทศมีการเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนและเขตอบอุ่น (สุชีลา และคณะ, 2552) แหล่งผลิตมะเขือเทศสดแหล่งใหญ่ในประเทศไทย คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือซึ่งมีสภาพภูมิอากาศเหมาะสมสำหรับการปลูก (มณีฉัตร, 2554) โรคสำคัญที่พบเข้าทำลายมะเขือเทศ คือ โรคเหี่ยวเฉา (bacterial wilt) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 200 ชนิด และอยู่รอดในดินได้เป็นเวลานาน (Prior *et al.*, 1998) เมื่อเชื้อแบคทีเรียนี้เข้าสู่พืชทางช่องเปิดบริเวณราก จากนั้นเจริญไปตามระบบท่อลำเลียงน้ำ (xylem) มีการเพิ่มจำนวน และแพร่กระจายไปทั่วต้น ขณะเดียวกันเชื้อแบคทีเรียขับสารในกลุ่ม exopolysaccharide (EPS) ออกมาในปริมาณมาก จึงทำให้เกิดการอุดตันในระบบท่อลำเลียงน้ำ ส่งผลให้ต้นพืชขาดน้ำ และแสดงอาการเหี่ยวตายทั้งต้น โดยที่ต้นและใบยังเขียวอยู่ (Saile *et al.*, 1997) นอกจากนี้เชื้อสาเหตุยังแพร่ระบาดไปกับน้ำได้ จึงเป็นการยากที่จะทำการป้องกันกำจัดโรค การปลูกมะเขือเทศบนพื้นที่สูง มักพบปัญหาการระบาดของโรคเหี่ยวเฉา เมื่อพบการระบาดของโรค และมีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด ซึ่งหากนำมาใช้อย่างไม่ถูกต้องและถูกวิธี อาจเป็นอันตรายต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค และอาจยังปนเปื้อนหรือตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้

ในการลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธีชีวภาพหรือชีววิธี (biological control หรือ biocontrol) เป็นวิธีที่นำสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวมทั้งจุลินทรีย์มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (จิระเดช, 2546) จากวิธีการดังกล่าวจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับนำมาใช้ควบคุมโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศ เนื่องจากปลอดภัยต่อการนำไปใช้และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

เชื้อแอคติโนมัยซีท (actinomycetes) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีลักษณะคล้ายเชื้อรา พบอาศัยอยู่ในดิน หรือในต้นพืช (endophyte) หรือเป็น saprophyte อยู่บริเวณรอบรากพืช (Coombs and Franco, 2003) เชื้อแอคติโนมัยซีท สามารถผลิตสารได้หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ และสารยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา เช่น nikkomycin และ polyoxin (Nolan and Cross, 1988) และเชื้อแบคทีเรีย เช่น oleandomycin (Swan *et al.*, 1994) จึงมีความสำคัญทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม (Boudjella *et al.*, 2006) ในด้านการเกษตร ได้มีการศึกษาและนำเชื้อแอคติโนมัยซีทมาทดลองใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช ได้แก่ Sadeghi *et al.* (2006) นำ *Streptomyces* จำนวน 2 ไอโซเลท (S2 และ C) ที่แยกจากดินบริเวณที่ปลูกข้าวสาลี มาใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคเน่าคอดินของ sugar beet ได้ ในขณะเดียวกัน Sharifi *et al.* (2007) ได้ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดิน จำนวน 178 ไอโซเลท และพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน

43 ไอโซเลท ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่า โคนเน่าของแตงได้นอกจากนี้ Ko et al. (2010) ได้แยกเชื้อ *Streptomyces* strain TKA-5 จากดิน โดยเชื้อมีความสามารถในการย่อยสลายเศษพืชผัก และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคใบไหม้ของพริก และเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดใน spoon cabbage ได้ จากที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินที่มีการปลูกมะเขือเทศบนพื้นที่สูงเพื่อนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาในมะเขือเทศ

นำต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวเฉามาทำการแยกเชื้อ โดยตัดส่วนของลำต้นบริเวณติดกับรากมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ใช้ใบมีดที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ตัดบริเวณส่วนเหนือโคนต้น หั่นให้ละเอียดและหยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที จากนั้นใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงใน suspension และ streak ลงบนอาหาร TZC (tetrazolium chloride agar; peptone 1 กรัม, glucose 0.5 กรัม, pancreatic digest of casein 0.1 กรัม, 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride solution 10 มิลลิกรัม, distilled water 990 มิลลิกรัม, agar 17 กรัม) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีสีขาวขุ่น ตรงกลางโคโลนีมีสีชมพู มา streak อีกครั้งบนอาหาร TZC เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บไว้ใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

2. การตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค และการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลันของพืชต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร NA (nutrient agar; peptone 5 กรัม, beef extract 3 กรัม, agar 20 กรัม, distilled water 1 ลิตร) และ TZC โดยวิธี streak plate บ่มเชื้อไว้ 24-48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบสีและรูปร่างลักษณะโคโลนี นอกจากนี้นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ข้างต้นนำมาย้อมสีตามวิธีของ Gram เพื่อศึกษาปฏิกิริยาการติดสีของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลันของพืชต่อเชื้อ *R. solanacearum* โดยการนำเชื้อมาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี streak บนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเตรียม bacterial suspension โดยการชุดโคโลนีของเชื้อ *R. solanacearum* ที่เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหารแล้วนำไปใส่ลงในปิเปตที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิกรัม จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (O.D. = 0.2) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิกรัม (cfu/ml) จากนั้นนำ bacterial suspension ปริมาตร 1 มิลลิกรัม ฉีดเข้าไปในช่องว่างระหว่างเซลล์ของใบยาสูบใบเล็ก (*Nicotiana rustica*) อายุ 1 เดือน โดยฉีดอย่างช้า ๆ บริเวณข้างเส้นใบทางด้านใต้ใบ และฉีดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับข้างต้นในอีกฝั่งของใบเดียวกัน เพื่อเป็นชุดเปรียบเทียบ แล้วตรวจสอบผลภายใน 48 ชั่วโมง

3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

นำเชื้อ *R. solanacearum* มาเพิ่มปริมาณโดยการ streak บนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเตรียม bacterial suspension ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น นำต้นมะเขือเทศที่มีอายุ 30 วัน มาใช้ในการทดสอบ มีการทำแผลที่รากของต้นมะเขือเทศโดยใช้มีดที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% จากนั้นนำมิดดังกล่าวแทงลงไปในดินบริเวณรอบรากของ

ต้นมะเขือเทศ โดยเอียงทำมุม 45 องศา เพื่อตัดรากที่อยู่ใต้ดิน แล้วจึงราด bacterial suspension ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อต้น ในชุดควบคุมราดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นตรวจสอบการเกิดโรคเหี่ยวเฉาทุกวันหลังการปลูกเชื้อ โดยสังเกตอาการเหี่ยวเฉาที่เกิดขึ้นบนใบ

4. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดิน

เก็บดินบริเวณรอบรากของต้นมะเขือเทศที่ไม่เป็นโรคในแปลงปลูกที่มีรายงานการระบาดของโรคเหี่ยวเฉา โดยเป็นแปลงของเกษตรกรที่เป็นสมาชิกของสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ จำนวน 9 ตัวอย่าง และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง จำนวน 10 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างดินทั้งหมดมาตากแดดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ วิธีการนี้จะช่วยลดประชากรเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Jeffrey, 2008) จากนั้นนำตัวอย่างดินที่แห้งแล้วมาแยกเชื้อด้วยวิธี soil dilution plate โดยชั่งดินตัวอย่างละ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ทิ้งให้ตกตะกอนสักครู่ ใช้ micro pipette ดูดสารแขวนลอยดิน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้สารแขวนลอยดินเข้ากันแล้วเจือจางต่อไปแบบเดิม นำสารแขวนลอยดินที่ความเข้มข้น 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปแยกเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA, PDA (potato dextrose agar; มันฝรั่ง 200 กรัม, dextrose 20 กรัม, agar 15 กรัม, distilled water 1 ลิตร) และ IMA-2 (inhibitory mold agar-2; glucose 5 กรัม, soluble starch 5 กรัม, beef extract 1 กรัม, yeast extracts 1 กรัม, NZ-case (enzyme hydrolyzed casein) 2 กรัม, NaCl 2 กรัม, CaCO_3 1 กรัม, agar 15 กรัม, distilled water 1 ลิตร) ที่มีการเติม Bavistin FL (carbendazim) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ในอัตรา 1 ไมโครลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ แยกเชื้อที่เจริญขึ้นบนผิวหน้าอาหาร NA, PDA และ IMA-2 โดย streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่แยกได้ เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บเป็น stock culture นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

5. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวเฉา

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 126 ไอโซเลทจาก stock culture มาเพิ่มปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ 3 วัน เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 cfu/ml การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ใช้วิธี dual culture โดยเทอาหาร NA ปริมาณ 18 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นดูด bacterial suspension หยดลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ย bacterial suspension ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหาร (culture disc) มาวางลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อ *R. solanacearum* โดยวาง culture disc ห่างจากขอบจานอาหารเป็นระยะ 2 เซนติเมตร วางทั้งหมด 4 ซ้ำ ในชุดควบคุมใช้อาหาร NA ที่ไม่มีเชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญอยู่ โดยวางในวิธีการเดียวกัน บ่มเชื้อไว้ 48-72 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) หรือบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

6. การทดสอบการสร้างสาร siderophore และการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (จากผลการทดสอบวิธีที่ 5) มาตรวจสอบการสร้าง siderophore ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Loudon *et al.* (2011) โดยนำใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ มาวางลงบนผิวหน้าอาหาร chrome azurol S (CAS; chrome azurol S 60.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 50 มิลลิลิตร, hexadecyltrimethyl ammonium bromide 72.9 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 40 มิลลิลิตร, King's medium B base 42.23 กรัม, distilled water 900 มิลลิลิตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารที่เกิดขึ้น สำหรับการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hankin and Anagnostakis (1977) ทำโดยขีดเชื้อแอคติโนมัยซีท

ปฏิบัติการบนอาหาร carboxymethylcellulose (CMC; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 กรัม, MgSO_4 1 กรัม, CaCl_2 1 กรัม, MnSO_4 1 กรัม, carboxyl methyl cellulose 10 กรัม, yeast extract 1 กรัม, glucose 10, Agar 18 กรัม, distilled water 1 ลิตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการย้อมสี โดยนำสารละลาย Congo red 1 เปอร์เซ็นต์ เทให้ท่วมผิวหน้าอาหาร เขย่าให้ทั่ว บ่มไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างสารละลายออกด้วยโซเดียมคลอไรด์ (1 N NaCl) สังเกตลักษณะ clear zone ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ เชื้อ หากพบ clear zone แสดงว่าเชื้อทดสอบมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้

7. การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (จากผลการทดสอบวิธีที่ 6) มาศึกษาลักษณะทางพื้นฐานวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ การเจริญ ลักษณะโคโลนี รูปร่าง สีและขนาด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2

8. จัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีท

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิบัติการ (จากผลการทดสอบวิธีที่ 7) โดยสกัดดีเอ็นเอของเชื้อด้วย DNA extraction kit (FavorPreP Tissue Genomic DNA Extraction (FAVORGEN)) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ด้วย primer 27F/1492R (27F: 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3', 1492R: 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่อง PCR thermocycle (GeneAmp® PCR System 9700) และตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1%

agarose gel การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequence) จาก PCR product ข้างต้นทำโดยการสกัดแยกดีเอ็นเอหลังจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วย GF-1 ambiclean kit และจากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานไว้ใน GenBank จาก The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อใช้จัดจำแนกชนิดของเชื้อ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาในมะเขือเทศ

การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการเหี่ยวเฉา โดยที่ใบและลำต้นยังเป็นสีเขียวอยู่ โดยวิธี streak plate บนอาหาร TZC พบว่าโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะสีชมพู ขอบโคโลนีสีขาว โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือก ผิวมัน (ภาพที่ 1)

2. การตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค และการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลันของพืชต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum*

การศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ TZC โดยวิธีการ streak plate เพื่อศึกษาลักษณะ สีและโคโลนีของเชื้อ พบว่าโคโลนีของเชื้อบนอาหาร TZC มีโคโลนีรูปร่างรี สีชมพู ขอบโคโลนีมีสีขาว โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือก ผิวมัน และโคโลนีของเชื้อบนอาหาร NA มีลักษณะรี สีขาวขุ่น โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือก ผิวมัน ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวตรงกับลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์รุนแรง ตามการรายงานของ



Figure 1. Colonies of *Ralstonia solanacearum* on TZC agar medium

Kelman (1954) จากการทดสอบการย้อมสีแกรม (Gram's stain) เพื่อดูลักษณะการย้อมติดสีแกรมของเชื้อสาเหตุโรคพบว่าเชื้อแบคทีเรียย้อมติดสีแดง แสดงว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น (rod shape) หัวและท้ายมน การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองแบบเฉียบพลันของยาสูบต่อเชื้อ *R. solanacearum* พบว่าเชื้อแบคทีเรียทำให้ใบยาสูบเกิดอาการเหลืองที่ใบบริเวณที่ปลูกเชื้อ ซึ่งต่อมาเกิดอาการตายของเนื้อเยื่อภายใน 48 ชั่วโมง หลังจากการปลูกเชื้อ ซึ่งยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ตามการรายงานของ Schaad (1988)

3. การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคด้วยการรด bacterial suspension บริเวณโคนต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 30 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้ต้นมะเขือเทศแสดงอาการเหี่ยวในวันที่ 3 หลังจากการปลูกเชื้อ โดยที่ต้นมะเขือเทศเกิดอาการเหี่ยว ใบร่วงลงในขณะที่ใบยังเขียวอยู่ (ภาพที่ 2a) จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น และการทดสอบความสามารถในการก่อโรค สามารถสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้ในการทดลองนี้เป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคกับมะเขือเทศได้ ดังนั้น จึงนำเชื้อดังกล่าวนี้ไปใช้ในงานทดลองต่อไป



Figure 2. Wilt symptom of tomato seedling at 3 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum* (a) when compared with non-inoculated tomato seedling (b)

4. การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดิน

การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินรอบรากของต้นมะเขือเทศบนอาหาร NA, PDA และ IMA-2 ที่เติมสารฆ่าเชื้อรา carbendazim พบว่าสามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินรวมทั้งหมด 126 ไอโซเลท โดย 39 ไอโซเลท ได้จากแปลงเกษตรกรรมของสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ และ 87 ไอโซเลท จากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง โดยใน 126 ไอโซเลทนี้ พบบนอาหาร NA จำนวน 42 ไอโซเลท, PDA จำนวน 26 ไอโซเลท และ IMA-2 จำนวน 68 ไอโซเลท การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทบนอาหารต่างชนิดกัน โดยการประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อราแทนการเติมสารแอนติไบโอติก เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราอาหารแต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้แตกต่างกัน จากการทดลองเห็นได้ว่า อาหาร IMA-2 สามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้มากที่สุด ในขณะที่อาหาร NA และ PDA ก็สามารถนำมาใช้แยกกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทในดินได้เช่นกัน แต่ได้ปริมาณที่น้อยกว่า

5. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวเหี่ยว

การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทปฏิปักษ์ ด้วยวิธี dual culture พบเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เป็นปฏิปักษ์ จำนวน 17 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) ได้แก่ ไอโซเลท T-1, T-2, T-4, T-5, T-6, T-7, T-8, T-10, T-11, T-12, T-13 และ T-17

Table 1. Inhibition zone by 17 antagonistic actinomycetes isolates against *Ralstonia solanacearum* by dual culture method

Antagonistic actinomycetes isolate	Inhibition zone (mm)
T-1	10.00 ^{bcd1}
T-2	7.25 ^d
T-3	9.00 ^{bcd}
T-4	6.75 ^d
T-5	5.75 ^d
T-6	13.25 ^{ab}
T-7	8.75 ^{bcd}
T-8	8.25 ^{cd}
T-9	6.00 ^d
T-10	7.50 ^d
T-11	16.50 ^a
T-12	6.50 ^d
T-13	12.50 ^{abc}
T-14	7.75 ^{cd}
T-15	7.25 ^d
T-16	10.25 ^{bcd}
T-17	15.25 ^a
control	0.00 ^e
CV (%)	20.94

^{1/} Means followed by the same letter within columns are not significantly different at 95% confidence level using least significant difference (LSD)

ที่ได้จากการแยกเชื้อบนอาหาร PDA, ไอโซเลท T-3, T-9, T-14, T-15 และ T-16 ได้จากการแยกเชื้อบนอาหาร IMA-2 ทั้งนี้ทุกไอโซเลทขึ้นเชื้อที่แยกได้จากดินในแปลงเกษตรกรรมของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์นั้นพบ inhibition zone เกิดขึ้น ซึ่งบริเวณดังกล่าวมีความกว้างแตกต่างกัน โดยพบว่าไอโซเลท T-11 แสดงผลการยับยั้งมากที่สุด โดยมี inhibition zone เท่ากับ 16.50 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3b) รองลงมาคือ ไอโซเลท T-17 และ ไอโซเลท T-6 มีความกว้างบริเวณยับยั้งเท่ากับ 15.25 (ภาพที่ 3c) และ 13.25 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3d) ตามลำดับ ซึ่ง inhibition zone ที่พบนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่

พบการเกิดบริเวณยับยั้ง (ภาพที่ 3a) ในขณะที่เชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ไอโซเลทอื่น ๆ มีค่าเฉลี่ยการยับยั้งอยู่ในช่วง 5.75-12.50 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับรายงานโดย Jeffrey (2008) ที่แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดิน และพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 37 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้

6. การทดสอบการสร้างสาร siderophore และการสร้างเอนไซม์ cellulase

การตรวจสอบการสร้างสาร siderophore ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลท T-11 บนอาหาร chrome azurol S พบว่าหลังจากบ่มไว้ในที่มีด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบการเปลี่ยนสีอาหารจากสีฟ้าเป็นสีส้มรอบ

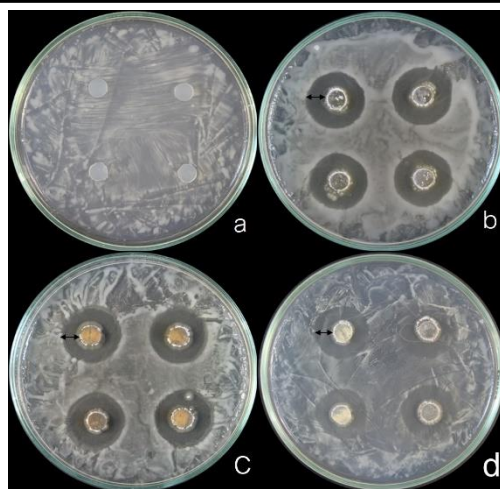


Figure 3. Inhibition zone of actinomycetes isolates on NA against growth of *Ralstonia solanacearum* compared with control (a); inhibition zone by isolate T-11 (b), T-17 (c) and T-6 (d)

ชิ้นส่วนของไอโซเลท T-11 เจริญอยู่ แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท T-11 มีการสร้างสาร siderophore ซึ่ง siderophore เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) สามารถสร้างได้โดยเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และพืช มีความจำเพาะเจาะจงกับธาตุเหล็กสูง เชื้อราและแบคทีเรียมักจะสร้างขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนหรือไม่มีธาตุเหล็ก และจะปล่อย siderophore ออกมานอกเซลล์ และจะไปแย่งจับเหล็กของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เพื่อแยกเอาเหล็กที่จับได้นำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งผลจากการขาดธาตุเหล็กอาจทำให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่าง ๆ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เช่น เชื้อ *Streptomyces* หลายสปีชีส์สามารถผลิตสาร desferrioxamine siderophores (Challis and Hopwood, 2003) จากเหตุผลดังกล่าวจึงอาจเป็นไปได้ว่า siderophore ที่สร้างโดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลท T-11 นี้ อาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศได้

นอกจากนี้ ไอโซเลท T-11 มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่มีการปล่อยออกมาบนอาหาร CMC โดยพบว่าหลังจากบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และเมื่อย้อมด้วยสี Congo red นั้น พบลักษณะของ clear zone เกิดขึ้นรอบไอโซเลท T-11 แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท T-11 มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Abdulla and El-Shatoury (2006) ที่แยกเชื้อ

แอคติโนมัยซีทจากดิน ในกลุ่ม *Kibdelosporangium*, *Micromonospora*, *Streptomyces* และ *Nocardioides* โดยเชื่อดังกล่าวมีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่สามารถย่อยสลายฟางข้าวได้เนื่องจากมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบของเซลล์พืช

7. การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีท

การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท T-11 บนอาหาร IMA-2 พบโคโลนีของเชื้อมีรูปร่างกลม โคโลนีมีสีน้ำตาลเข้ม ขนาดเล็ก เฉลี่ย 1-3 มิลลิเมตร ขอบหยัก ตรงกลางของโคโลนีมีลักษณะนูนขึ้นคล้ายไข่ดาว เมื่อทิ้งไว้นานบนอาหารจะพบการสร้างผงแป้งสีขาวบนเทาบนโคโลนี และเชื้อจะเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำตาลเข้ม-ดำ (ภาพที่ 4) การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื่อดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการรายงานโดย Mendez *et al.* (1985) ที่กล่าวว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทมีการสร้างเส้นใยใต้ผิวอาหาร และสามารถสร้างรงควัตถุที่เป็นชนิดละลายน้ำ และไม่ละลายน้ำ จึงทำให้สีของอาหารเปลี่ยนแปลงไปได้ โดยสีที่เกิดขึ้นอาจมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กักระยะเวลาการเจริญของเชื้อและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อได้

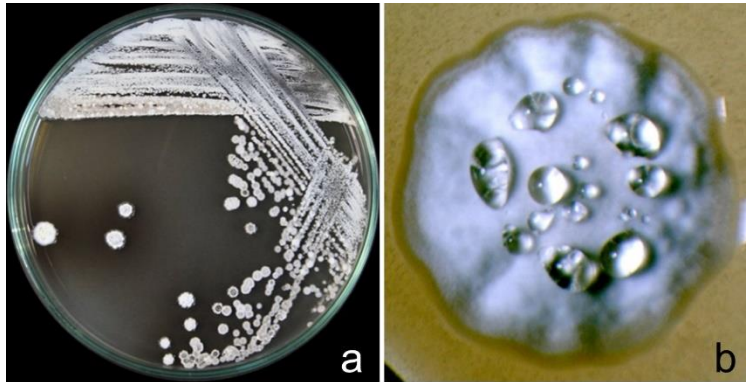


Figure 4. Actinomyces isolate T-11 on IMA-2 medium for 7 days (a) and single colony (b)

8. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีท

การตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลท T-11 ในบริเวณ 16S rRNA gene ด้วยไพรเมอร์ 27F/1492R พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,500 bp และเมื่อนำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rRNA gene ได้โดยมีขนาด 1,241 bp เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือน (sequence alignment) ในฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท T-11 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Streptomyces mirabilis* strain 3662 (Accession no. EF371431.1), *S. mirabilis* strain NBRC 13450 (Accession no. NR041137.1) และ *S. mirabilis* strain CSSP107 (Accession no. NR115357.1) โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันถึง 96% ซึ่งจากผลการวิจัยครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับรายงานของ Xie *et al.* (2010) ที่แยกเชื้อ *S. mirabilis* strain DUT001 จากดินได้ ในขณะเดียวกันก็พบว่า strain DUT001 มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารในกลุ่ม nitropolycyclic aromatic และ polynitrated aromatic ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวเป็นสารพิษและเป็นสารก่อมะเร็งที่ได้จากการผลิตพลาสติก สารกำจัดศัตรูพืช หรืออุตสาหกรรมผลิตยา เป็นต้น นอกจากนี้ El-Sayed (2012) รายงานว่า ได้แยกเชื้อ *S. mirabilis* strain NSQu-25 จากดิน และเชืวดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ได้ แต่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้น้อย

สรุป

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินรอบรากของมะเขือเทศเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเฉาของมะเขือเทศในห้องปฏิบัติการ สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ ไอโซเลท T-11 นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท T-11 สามารถสร้างสาร siderophore และเอนไซม์เซลลูเลสได้ และจากการจำแนกชนิดโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลท T-11 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rRNA gene ที่เหมือนกับเชื้อ *S. mirabilis* อย่างไรก็ตามควรนำเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท T-11 นี้ไปศึกษาต่อในการหาสารที่เหมาะสมต่อการเจริญ และกระตุ้นการสร้างสารที่มีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* หรือหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับนำไปทดสอบในสภาพโรงเรือนทดลอง หรือในแปลงปลูกมะเขือเทศบนพื้นที่สูงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนงบประมาณจากทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2556 ขอขอบคุณ ผศ.ดร. อังสนา อัครพิศาล สำหรับอุปกรณ์ต่างๆ ขอขอบคุณ คุณกาญจนา วิจิตระกุลถาวร ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง และขอขอบคุณ ผศ.ดร. วสุ

ปฐุมอารีย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับการอนุเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อแอคติโนมัยซีท

เอกสารอ้างอิง

- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2546. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 204 หน้า.
- มณีรัตน์ นิกรพันธุ์. 2554. พริก มะเขือเทศ. โอ. เอส. พรินติ้งเฮาส์, กรุงเทพฯ. 271 หน้า.
- สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร ชานนท์ ลากิจิตร เกศจิตต์ ขาม-คุลา จันทรแรม คำหนู วุฒิพงษ์ ยศหล้า ธงชัย ประสมสวอย และภราดร สีสอมโนธรรม. 2552. การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศรับประทานสดผลเล็ก. วารสารโครงการหลวง 13(2): 2-10.
- Abdulla, H.M. and S.A. El-Shatoury. 2006. Actinomycetes in rice straw decomposition. Waste Management 27(6): 850-853.
- Boudjella, H., K. Bouti, A. Zitouni, F. Mathieu, A. Lebrihi and N. Sabaou. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosprangium* Sg10 isolated from a Saharan soil. Microbiological Research 161(4): 288-298.
- Challis, G.L. and D. Hopwood. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proceedings of the National Academy of Sciences 100 Suppl2: 14555-14561.
- Coombs, J.T. and C.M.M. Franco. 2003. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. Applied and Environmental Microbiology 69(9): 5603-5608.
- El-Sayed, M.H. 2012. Di-(2-ethylhexyl) phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from the culture filtrate of newly isolated soil *Streptomyces* (*Streptomyces murabilis* Strain NSQu-25). World Applied Sciences Journal 20(9): 1202-1212.
- Hankin, L. and S.L. Anagnostakis. 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect C_x cellulase activity of micro-organisms. Journal of General Microbiology 98(1): 109-115.
- Jeffrey, L.S.H. 2008. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. African Journal of Biotechnology 7(20): 3697-3702.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. Phytopathology 44(12): 693-695.
- Ko, W.H., Y.J. Tsou, M.J. Lin and L.L. Chern. 2010. Activity and characterization of secondary metabolites produced by a new microorganism for control of plant diseases. New Biotechnology 27(4): 397-402.
- Louden, B.C., D. Haarmann and A.M. Lynne. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. Journal of Microbiology & Biology Education 12(1): 51-53.
- Mendez, C., A.F. Brana, M.B. Manzanal and C. Hardisson. 1985. Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. Canadian Journal of Microbiology 31(5): 446-450.
- Nolan, R.D. and T. Cross. 1988. Isolation and screening of actinomycetes. pp. 1-32. In: M.

- Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordarski (eds.). Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, San Diego.
- Prior, P., C. Allen and J. Elphinstone. 1998. Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer-Verlag, Berlin. 447 p.
- Sadeghi, A., A.R. Hessian, H. Askari, S. Aghighi and G.H. Shahidi Bonjar. 2006. Biological control potential of two *Streptomyces* isolates on *Rhizoctonia solani*, the causal agent of damping-off of sugar beet. Pakistan Journal of Biological Sciences 9(5): 904-910.
- Saile, E., J.A. McGarvey, M.A. Schell and T.P. Denny. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology 87(12): 1264-1271.
- Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 158 p.
- Sharifi, F., G.H. Shahidi Bonjar, S. Aghighi, P. Rashid Farrokhi, E. Khalesi, M.J. Mahdavi and H. Taraz. 2007. Antagonistic potential of Iranian native *Streptomyces* strains in biocontrol of *Pythium aphanidermatum*. Research Journal of Biological Sciences 2(3): 232-235.
- Swan, D.G., A.M. Rodriguez, C. Vilches, C. Mendez and J.A. Salas. 1994. Characterisation of a *Streptomyces* antibioticus gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence. Molecular and General Genetics 242(3): 358-362.
- Xie, B., J. Yang and Q. Yang. 2010. Isolation and characterization of an efficient nitro-reducing bacterium, *Streptomyces mirabilis* DUT001, from soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26: 855-862.