# การผลิตเอนไซม์และฤทธิ์ต้านเชื้อราของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces cavourensis* BUU135

# Enzyme Production and Antifungal Activity of Antagonistic Bacterium *Streptomyces cavourensis* BUU135

**อภิญญา บุญเขียน[1,2] วิทวัส แจ้งเอี่ยม[1] โยธิน ตีไธสง[2] และ มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร[2*]**
Apinya Bunkhean[1,2], Witawat Jangiam[1], Yothin Teethaisong[2] and Marut Tangwattanachuleeporn[2*]

*[1]สาขาวิศวกรรมชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี 20131*
*[1]Bioengineering Program, Faculty of Engineering, Burapha University, Chon Buri 20131, Thailand*
*[2]สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี 20131*
*[2]Medical Sciences Program, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chon Buri 20131, Thailand*
**Corresponding author: Email: marutt@go.buu.ac.th*

*(Received: 1 February 2023; Accepted: 25 April 2023)*

**Abstract:** *Streptomyces* spp. can produce an excellent source of secondary metabolites including antibiotics. This study aimed to evaluate *Streptomyces cavourensis* BUU135's extracellular enzyme production and its anti-fungal activities using a dual culture assay. The *S. cavourensis* BUU135 was found capable of phosphate solubilizing and producing cellulase, amylase, urease, chitinase, protease, catalase and siderophore. Furthermore, *S. cavourensis* showed anti fungal activity against *Phytophthora palmivora*, *Fusarium decemcellulare* and *Lasiodiplodia theobromae* (percent of inhibitions of 44.3, 41.5 and 61.1, respectively). These results indicate that *S. cavourensis* is a great producer of secondary metabolites that act on other microorganisms especially fungi, exercising its role as biological control. *S. cavourensis* can effectively control various soilborne fungal diseases of plants.

**Keywords:** *Streptomyces cavourensis*, extracellular metabolites, anti-phytopathogenic fungal activity


Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

**บทคัดย่อ**: *Streptomyces* spp. สามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิและสารปฏิชีวนะหลายชนิด นำไปสู่วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อทดสอบความสามารถของ *Streptomyces cavourensis* BUU135 ในการผลิต extracellular enzyme และประเมินความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา จากผลการศึกษาพบว่า *S. cavourensis* สามารถละลายฟอสเฟต และผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส ยูรีเอส ไคติเนส โปรตีเอส แคทาเลส และไซเดอร์โรฟอร์ได้ นอกจากนี้ *S. cavourensis* ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช ได้แก่ *Phytophthora palmivora*, *Fusarium decemcellulare* และ *Lasiodiplodia theobromae* (การยับยั้ง 44.3, 41.5 และ 61.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) จากผลการศึกษาเหล่านี้บ่งชี้ได้ว่า *S. cavourensis* เป็นผู้ผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยเฉพาะเชื้อราได้เป็นอย่างดี และมีแนวโน้มในการใช้เพื่อควบคุมราโรคพืชในดินได้หลากหลาย

**คำสำคัญ**: *Streptomyces cavourensis* สารเมแทบอไลต์ที่ผลิตสู่นอกเซลล์ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

## คำนำ

แบคทีเรียกลุ่ม *Streptomyces* spp. มีความสำคัญในการเป็นผู้ผลิตสารปฏิชีวนะ ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม *Streptomyces* แต่ละสายพันธุ์สามารถสังเคราะห์สารประกอบ สารเมแทบอไลต์ และเอนไซม์ที่มีโครงสร้างทางเคมีได้หลากหลาย (Hwang *et al*., 2014; Quinn *et al*., 2020) กลไกการทำงานของสารออกฤทธิ์ย่อมมีประสิทธิภาพที่ต่างกันออกไป (Lacey and Rutledge, 2022; Le *et al*., 2021)

*Streptomyces* spp. มีประสิทธิภาพในการใช้ควบคุมโรคพืช สามารถยับยั้งการงอกของเส้นใยและสปอร์เชื้อราก่อโรคพืช (Pacios-Michelena *et al*., 2021) บางสายพันธุ์เจริญได้อย่างรวดเร็ว ทนทาน มีการสร้างสปอร์ สามารถยึดครองพื้นที่ และแย่งใช้แหล่งคาร์บอนหรือเหล็กจากเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ดี (Ghanem *et al*., 2022) โดย *Streptomyces* เพียงสายพันธุ์เดียวมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้มากกว่า 3 ชนิด (Kaur *et al*., 2019) และยังเป็นแหล่งผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สำคัญ อาทิ เอนไซม์ที่ส่งผลให้ฟอสเฟตอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ หรือสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ตลอดจนโปรตีเอส เป็นต้น (González *et al*., 2022) โดยเฉพาะ *Streptomyces cavourensis* ได้รับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (genome sequence) ซึ่ง Nguyen *et al*. (2018) เผยว่า *S. cavourensis* YBQ59 ที่แยกได้จากรากของต้นอบเชย (*Cinnamomum cassia* Presl) ในประเทศเวียดนาม มียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราได้ อาทิ bafilomycin D, nonactic acid, prelactone B และ 5,11-epoxy-10-cadinanol สำหรับรายงานการศึกษาในประเทศไทย Tangwattanachuleeporn *et al.* (2021) ได้ศึกษาอณูชีววิทยา ของ *S. cavourensis* BUU135 ซึ่งแยกได้จากดินในพื้นที่สวนผลไม้เขตร้อน จังหวัดจันทบุรี ประเทศไทย พบว่า มียีนที่เกี่ยวข้องต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ อาทิ nebramycin 5' เป็นต้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมุ่งศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกสู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) และความสามารถในการต้านเชื้อรา (antifungal activity) ได้แก่ *Phytophthora palmivora, Fusarium decemcellular* และ *Lasiodiplodia theobromae* ของเชื้อ *S. cavourensis* BUU135 ที่แยกได้จากดินในพื้นที่สวนผลไม้เขตร้อน จังหวัดจันทบุรี ประเทศไทย การศึกษาในครั้งนี้สามารถสนับสนุนการคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสาร extracellular enzyme และสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้อย่างจำเพาะ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันหรือกำจัดโรคพืชทางการเกษตรได้ในอนาคต

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อราก่อโรค

โคโลนีบริสุทธิ์ของเชื้อ *S. cavourensis* BUU135 (Tangwattanachuleeporn *et al*., 2021) ได้รับการอนุเคราะห์จากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งแยกได้จากดิน ในพื้นที่สวนผลไม้เขตร้อน จังหวัดจันทบุรี และนำไปกระตุ้นบนอาหาร International Streptomyces Project medium no. 2 (ISP2) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ก่อนนำไปศึกษาคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของโรคพืชต่อไป (Singh *et al*., 2006)

เชื้อราตัวแทนในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ *P. palmivora, F. decemcellulare* และ *L. theobromae* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยแยกได้จากโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน ในอำเภอแกลง จังหวัดระยอง จากนั้นเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นระยะเวลา 7 วัน ก่อนนำไปทำการศึกษา

### ศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟต

นำชิ้นวุ้นของเชื้อ *S. cavourensis* BUU135 ที่เจาะด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร วางลงบนอาหาร Pikovsakaya's agar (PVA) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 7 - 14 วัน หาก *S. cavourensis* สามารถละลายสารอนินทรีย์ฟอสเฟตได้ จะพบ clear zone รอบโคโลนีที่เชื้อเจริญ รายงานผลการทดสอบเป็น positive และหากไม่พบ clear zone รายงานผลเป็น negative ดำเนินการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ (Pragya *et al*., 2012)

### ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

นำชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของ *S. cavourensis* BUU135 ซึ่งเจาะด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร วางลงบนอาหาร carboxy methyl cellulose agar (CMC) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 7-14 วัน การอ่านผลใช้ Congo red visualization method โดยเตรียมสารละลาย Congo red เข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลาย Congo red ลงบนผิวหน้าอาหารให้ทั่วจาน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ล้างด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้น 1 M นาน 15 นาที บริเวณที่เซลลูโลสถูกย่อยสลาย จะไม่ติดสี Congo red และปรากฏ clear zone รายงานผลการทดสอบเป็น positive และหากไม่พบ clear zone รายงานผลเป็น negative ดำเนินการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ (Pragya *et al*., 2012)

### ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

นำชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของ *S. cavourensis* BUU135 ซึ่งเจาะด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร วางลงบนอาหาร starch agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 - 14 วัน การสร้างเอนไซม์อะไมเลสสังเกตได้จาก clear zone รอบโคโลนีเมื่อหยดสารละลายไอโอดีน รายงานผลการทดสอบเป็น positive และหากไม่พบ clear zone รายงานผลเป็น negative ดำเนินการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ (Kafilzadeh and Dehdari, 2015)

### ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส

นำชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของ *S. cavourensis* BUU135 ซึ่งเจาะด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร วางลงบนอาหาร urea base agar ที่เติม urea เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7-14 วัน ความสามารถของเชื้อในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส สังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีส้ม ไปเป็นสีชมพู รายงานผลการทดสอบเป็น positive และหากสีของอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลง รายงานผลเป็น negative ดำเนินการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ (Morou-Bermudez and Burne, 2000)

### ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนส

นำชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของ *S. cavourensis* BUU135 ซึ่งเจาะด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง

0.6 เซนติเมตร วางลงบนอาหาร GYM Streptomyces medium ที่เติม colloidal chitin 1 เปอร์เซ็นต์ และ bromocresol purple 0.015 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเท่ากับ 4.7 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่ปราศจากแสง เป็นระยะเวลา 7-14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยไคตินได้จะปรากฏวงสีม่วงรอบโคโลนี รายงานผลการทดสอบเป็น positive และหากสีของอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลง รายงานผลเป็น negative ดำเนินการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ (Agrawal and Kotasthane, 2012)

**ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส**

นำชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของ *S. cavourensis* BUU135 ซึ่งเจาะด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร วางลงบนอาหาร skim milk agar จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่ปราศจากแสง เป็นระยะเวลา 7 - 14 วัน หากเชื้อสามารถย่อยโปรตีนได้จะปรากฏ clear zone รอบโคโลนี รายงานผลการทดสอบเป็น positive และหากไม่พบ clear zone รายงานผลเป็น negative ดำเนินการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ (Alnahdi, 2012)

**ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคตาเลส**

ขีดเชื้อ *S. cavourensis* BUU135 บนอาหาร ISP2 ด้วยเทคนิค cross streak จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง หยดสารละลาย $H_2O_2$ เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หากเชื้อมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส พบว่ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นทันที รายงานผลการทดสอบเป็น positive และหากไม่มีการปรากฏของฟองแก๊ส รายงานผลเป็น negative ดำเนินการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ (Manullang and Chuang, 2020)

**ศึกษาความสามารถในการสร้างสารไซเดอร์โรฟอร์**

นำชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของ *S. cavourensis* BUU135 ซึ่งเจาะด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร วางลงบนอาหาร Chrome Azurol S (CAS) agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่ปราศจากแสง เป็นระยะเวลา 7 - 14 วัน หากเชื้อมีการสร้างสารไซเดอร์โรฟอร์ จะเกิด clear zone สีส้มบริเวณรอบโคโลนี รายงานผลการทดสอบเป็น positive และหากไม่พบ clear zone สีส้ม รายงานผลเป็น negative ดำเนินการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ (Sultana *et al*., 2021)

**ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora*, *F. decemcellulare* และ *L. theobromae***

ศึกษาแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยทำการขีดเชื้อ *S. cavourensis* BUU135 ลงบนผิวหน้าอาหารด้านหนึ่งห่างจากขอบเพลท 2 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อให้ *S. cavourensis* BUU135 มีการปรับตัวและผลิตสารสำคัญ จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร ตัดบริเวณ hyphal tip ของเชื้อรา *P. palmivora*, *F. decemcellulare* และ *L. theobromae* ที่มีอายุ 7 วัน จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยราวางอีกด้านของเพลท ห่างจากขอบเพลทเป็นระยะ 2 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ชุดควบคุม คือ ชิ้นวุ้นของเชื้อราบริสุทธิ์ที่วางบนอาหาร PDA เท่านั้น ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เมื่อชุดควบคุมเจริญเต็มเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำการวัดขนาดรัศมีของโคโลนีของเชื้อราก่อโรค เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Ghanem *et al*., 2022)

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากผลการศึกษาความสามารถของ *S. cavourensis* BUU135 ในการละลายฟอสเฟตเบื้องต้น เป็นระยะเวลา 14 วัน ปรากฏ clear zone รอบโคโลนีที่เชื้อเจริญ (Table 1, Figure 1a) เป็นผลมาจากสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นกรดอินทรีย์ (organic acid) ชนิดต่าง ๆ อาทิ กรดออกซาลิก (oxalic acid) กรดมาลิก (malic acid) กรดกลูโคนิก (gluconic acid) กรดซิตริก (citric acid) กรดซัคซินิก (succinic acid) และเอนไซม์

ฟอสฟาเทส (phosphatase) เป็นต้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนรูปอนินทรีย์ฟอสเฟตซึ่งเป็นรูปที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปไดและโมโนเบสิกฟอสเฟต ($HPO_4^{2-}$และ $H_2PO_4^-$) ที่พืชสามารถดูดซึมไปใช้ได้ (Pradhan *et al*., 2017)

สำหรับการทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า บริเวณโดยรอบของเชื้อ *S. cavourensis* BUU135 ขณะเจริญบนอาหาร CMC agar เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ปรากฏ clear zone เมื่อตรวจสอบด้วย Congo red visualization method (Table 1, Figure 1b) ซึ่งเกิดจากการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสรวมไปถึงเอนไซม์ อื่น ๆ เช่น β-1,4-endoglucanase, cellobiohydrolase และ β-glucosidase ทำให้เซลลูโลสถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคส เป็นต้น (Wilson, 2009)

จากนั้นได้ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เป็นระยะเวลา 7 วัน จึงตรวจวัดการย่อยสลายแป้งด้วยสารละลายไอโอดีน พบว่า มีการปรากฏของ clear zone บริเวณโดยรอบโคโลนี (Table 1, Figure 1c) กระบวนการย่อยแป้งให้มีโมเลกุลที่เล็กลงได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส เพื่อให้เชื้อสามารถนำไปใช้สร้างพลังงานแก่เซลล์ได้ (Nimisha *et al*., 2019)

เมื่อศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสพบว่า เชื้อ *S. cavourensis* BUU135 สามารถเปลี่ยนสีของอาหาร urea base agar ที่เติม urea เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ให้เป็นสีชมพูได้ ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดยสีของอาหารจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีชมพูจากบริเวณรอบโคโลนี จนกระทั่งกลายเป็นสีชมพูทั้งหมดภายในระยะเวลาการบ่ม 7 วัน (Table 1, Figure 1d)

จากการศึกษาคุณสมบัติในการสร้าง extracellular enzyme เหล่านี้ อาทิ การย่อยสลายเซลลูโลส การย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส และการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส สอดคล้องต่องานวิจัยของ Sheik *et al*. (2020) ซึ่งศึกษา *S. cavourensis* DW102 ให้ผลการทดสอบดังกล่าวเป็นบวกทั้งหมด

นอกจากนี้ การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสเบื้องต้น พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีม่วง โดยเริ่มจากบริเวณรอบโคโลนีจนกระทั่งเป็นสีม่วงทั่วทั้งเพลท (Table 1, Figure 1e) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee *et al*. (2012) รายงานว่า *S. cavourensis* SY224 สามารถผลิต lytic enzymes อาทิ ไคติเนส ได้มากกว่า 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 9 วัน โดยมีการผลิตสูงสุดในวันที่ 3 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร modified nutrient (MN) เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ไคติน นอกจากนี้ Malviya *et al*. (2018) รายงานว่า *S. cavourensis* NEA5 ที่แยกได้จากพื้นที่แปลงเกษตรที่มีการเผาทำไร่เลื่อนลอย ในประเทศอินเดีย มีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสสูงสุด 0.138 ± 0.006 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 6 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเอนไซม์ไคติเนสเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้ *S. cavourensis* NEA5 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค อาทิ *Rhizoctonia solani* และ *Cladosporium* sp. ได้ เนื่องด้วยไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่พบมากในธรรมชาติ รวมถึงเป็นองค์ประกอบหลักในโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อรา

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส พบว่า เมื่อเลี้ยง *S. cavourensis* BUU135 ลงบนอาหาร skim milk agar เป็นระยะเวลา 14 วัน เกิด clear zone บริเวณโดยรอบโคโลนี (Table 1, Figure 1f) แสดงถึงความสามารถของเชื้อในการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับวิจัยของ Sirikun and Thaochan (2018) รายงานว่าแอคติโนมัยซีสจำนวน 8 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นพืชในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ได้แก่ PSUAc001, PSUAc009, PSUAc014, PSUAc015, PSUAc016, PSUAc017, PSUAc032 และ PSUAc034 สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสภายในระยะเวลา 7 วัน โดยมีค่าดัชนีการสร้างเอนไซม์อยู่ระหว่าง 2.06 - 3.42 และสำหรับการทดสอบเอนไซม์แคตาเลส เมื่อหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนโคโลนีของ *S. cavourensis* BUU135 พบว่า เกิดฟองอากาศขึ้นในทันที (Table 1, Figure 1g) สามารถบ่งชี้ได้ว่าเชื้อมีความสามารถในผลิตเอนไซม์แคตาเลส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sheik *et al*. (2020) รายงานว่า *S. cavourensis* DW102 ที่แยกได้จากดินของประเทศซาอุดิอาระเบียมีความสามารถในผลิตเอนไซม์แคตาเลสเช่นเดียวกัน

Table 1. Test of extracellular enzyme production by *Streptomyces cavourensis* BUU135

| Test | Substrate | Production |
|---|---|---|
| Phosphate solubilization | Tricalcium phosphate | Positive |
| Cellulase | Cellulose | Positive |
| Amylase | Starch | Positive |
| Urease | Urea | Positive |
| Chitinase | Chitin | Positive |
| Protease | Casein | Positive |
| Catalase | Hydrogen peroxide | Positive |
| Siderophore | Ferric iron | Positive |

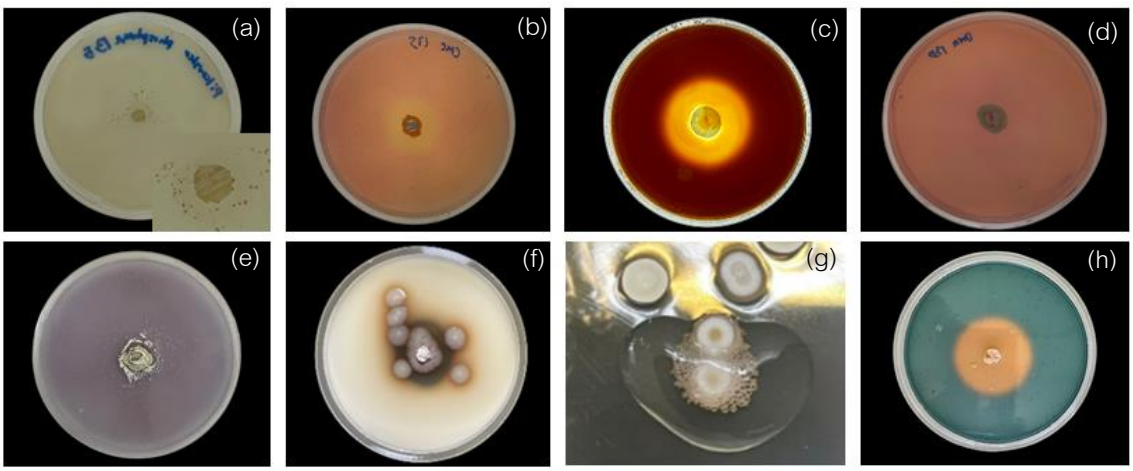


Figure 1. Extracellular enzymes production of active *Streptomyces cavourensis* BUU135, (a) Clear zone of phosphate solubilization on Pikovskaya' s agar plates, (b) Cellulolytic activity on CMC agar plates, (c) Activity of the extra-cellular α-amylase enzyme on starch agar plate, (d) Urease expression, (e) Chitinolytic activity on GYM Streptomyces medium + colloidal chitin 1 % + bromocresol purple 0.015 %, (f) Proteolytic exhibit clear halos zone around the colonies, (g) Degrade hydrogen peroxide into water and hydrogen creating bubbles, (h) The appearance of orange clear zones on CAS agar suggests the activity of siderophore production

ต่อมาได้ทำการศึกษาคุณสมบัติในการสร้างสารไซเดอร์โรฟอร์ พบว่า บริเวณโดยรอบชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของ *S. cavourensis* BUU135 บนอาหาร CAS agar ซึ่งมีสีน้ำเงิน เปลี่ยนเป็นสีส้ม ภายในระยะเวลา 7 วัน (Table 1, Figure 1h) สอดคล้องกับการศึกษาของ Yodpanan and Thapanapongworakul (2019) พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Phytophthora nicotianae* ที่แยกได้จากพื้นที่ปลูกเสาวรส อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ สามารถสร้างไซเดอร์โรฟอร์ได้เช่นเดียวกัน โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตสารไซเดอร์โรฟอร์เหล่านี้สามารถจับยึดธาตุเหล็กในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุโรคพืช ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้

คุณสมบัติในการสร้างสารเมแทบอไลต์หรือเอนไซม์หลากชนิดออกสู่นอกเซลล์ได้ อาจเป็นสาเหตุประการหนึ่งที่ทำให้เชื้อ *S. cavourensis* BUU135 สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั่วโลก อาทิ บริเวณป่าชายเลน (Shrivastava *et al*., 2015) พื้นที่ชายฝั่งมหาสมุทร (Su *et al*., 2013) ดินในพื้นที่การเกษตร รวมไปถึงพื้นที่ที่มีการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่อง และพื้นที่เกษตรอินทรีย์ (Siddharth *et al*., 2020) หรือแม้กระทั่งค้นพบในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (Kaaniche *et al*., 2020) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้มีประโยชน์ต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นเชื้อ *S. cavourensis* จึงควรได้รับการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชต่อไป

สำหรับผลการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora*, *F. decemcellulare* และ *L. theobromae* ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA สามารถประเมินแนวโน้มประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์เบื้องต้นได้ ซึ่งพบว่า *S. cavourensis* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. palmivora* เท่ากับ 44.3 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2a, b) เมื่อทำการทดสอบการยับยั้งต่อเชื้อ *F. decemcellulare* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 41.5 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2c, d) และ *S. cavourensis* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *L. theobromae* เท่ากับ 61.1 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2e, f) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด โดยไม่มีการสัมผัสกันระหว่างเส้นใยของเชื้อราก่อโรคและเชื้อ *S. cavourensis* BUU135 โดย Gottlieb (1967) ได้กล่าวว่า *S. cavourensis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะชื่อว่า flavensomycin สำหรับยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยใช้ความเข้มข้นเพียง 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Fróes *et al.* (2012) รายงานว่าเอนไซม์ที่ *Streptomyces* สร้างขึ้นนั้นมีฤทธิ์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา (cell wall degrading enzyms) อาทิ β-1,3-glucanase และ chitinase ส่งผลให้เส้นใยเชื้อราถูกย่อย หงิกงอและยุบตัวลง จนไม่สามารถเจริญต่อได้ เนื่องด้วยโครงสร้างที่สำคัญของเซลล์เชื้อรา คือ chitins และ glucans นอกจากนี้ การศึกษาของ Tanatip and Kunasakdakul (2017) พบว่า พบเชื้อ-แอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ไอโซเลท DUC2, CINv1, FRA19, CINc1 และ POL2 ส่งผลให้เส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora cactorum* มีลักษณะบิดเบี้ยว ส่วนปลายเส้นใยบวมพอง คาดว่าเกิดจากการสร้างเอนไซม์ β-glucanase ที่เชื้อหลั่งสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายกลูแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราก่อโรคได้

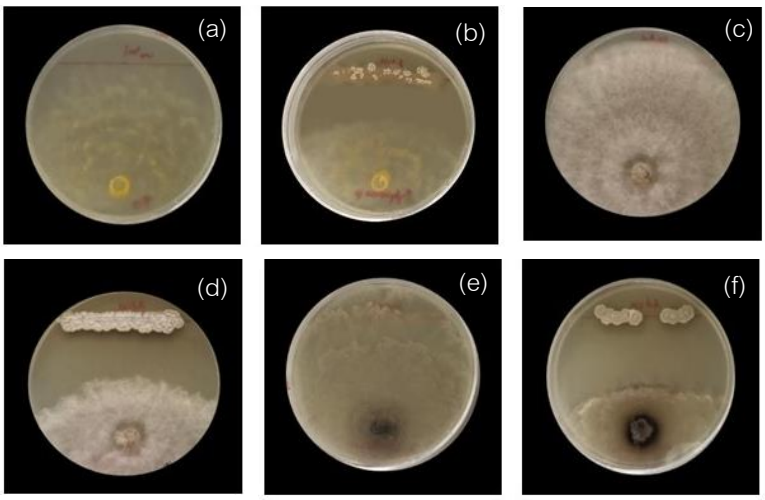


Figure 2. Dual culture between *Streptomyces cavourensis* BUU135 and plant pathogens, (a) *Phytophthora palmivora* (control), (b) *S. cavourensis* antagonistic to *P. palmivora*, (c) *Fusarium decemcellulare* (control), (d) *S. cavourensis* antagonistic to *F. decemcellulare*, (e) *Lasiodiplodia theobromae* (control), (f) *S. cavourensis* antagonistic to *L. theobromae*

## สรุป

*S. cavourensis* BUU135 ซึ่งแยกได้จากดินในพื้นที่สวนผลไม้เขตร้อน จังหวัดจันทบุรี มีความสามารถในการผลิต extracellular enzyme มากถึง 8 ชนิด นอกจากนี้ *S. cavourensis* BUU135 สามารถใช้ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ได้แก่ *P. palmivora*, *F. decemcellulare* และ *L. theobromae* ในห้องปฏิบัติการได้ภายในระยะเวลา 7 วัน อย่างไรก็ตาม สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ *S. cavourensis* BUU135 ซึ่งส่งผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา จำเป็นต้องศึกษาปริมาณความเข้มข้น ระยะเวลาการออกฤทธิ์สูงสุด ตลอดจนชนิดของสารที่ออกฤทธิ์ เพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมเชื้อรา นำไปสู่การใช้ประโยชน์ได้หลากหลายมากยิ่งขึ้น

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *S. cavourensis* BUU135 เชื้อราก่อโรคพืชจำนวนสามสายพันธุ์ *P. palmivora, F. decemcellulare* และ *L. theobromae* รวมถึงให้การสนับสนุนสถานที่ทำการทดลอง อุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ ขอขอบคุณคณะวิศวกรรมศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนทุนผู้ช่วยวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประกาศเลขที่ 031/2563 กระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

Agrawal, T. and A.S. Kotasthane. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. SpringerPlus 1(1): 73, doi: 10.1186/2193-1801-1-73.

Alnahdi, H.S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new Isolated *Bacillus* sp. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2(9): 71-74.

Fróes, A., A. Macrae, J. Rosa, M. Franco, R. Souza, R. Soares and R. Coelho. 2012. Selection of a *Streptomyces* strain able to produce cell wall degrading enzymes and active against *Sclerotinia sclerotiorum*. The Journal of Microbiology 50(5): 798-806.

Ghanem, G.A.M., D.A.S. Gebily, M.M. Ragab, A.M. Ali, N.E.D. Soliman and T.H. Abd El-Moity. 2022. Efficacy of antifungal substances of three *Streptomyces* spp. against different plant pathogenic fungi. Egyptian Journal of Biological Pest Control 32: 112, doi: 10.1186/s41938-022-00612-9.

González, V., M.J. Vargas-Straube, W.O. Beys-da-Silva, L. Santi, P. Valencia, F. Beltrametti and B. Cámara. 2022. Enzyme bioprospection of marine-derived actinobacteria from the Chilean coast and new insight in the mechanism of keratin degradation in *Streptomyces* sp. G11C. Marine Drugs 18(11): 537, doi: 10.3390/md18110537.

Gottlieb, D. 1967. Flavensomycin. pp. 617-620. *In*: D. Gottlieb and P.D. Shaw (eds.). Antibiotics Volume 1: Mechanism of Action. Springer-Verlag, Berlin.

Hwang, K.-S., H.U. Kim, P. Charusanti, B.Ø. Palsson and S.Y. Lee. 2014. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. Biotechnology Advances 32(2): 255-268.

Kaaniche, F., A. Hamed, L. Elleuch, A. Chakchouk-Mtibaa, S. Smaoui, I. Karray-Rebai, I. Koubaa, G. Arcile, N. Allouche and L. Mellouli. 2020. Purification and

characterization of seven bioactive compounds from the newly isolated *Streptomyces cavourensis* TN638 strain via solid-state fermentation. Microbial Pathogenesis 142: 104106, doi: 10.1016/j.micpath.2020.104106.

Kafilzadeh, F. and F. Dehdari. 2015. Amylase activity of aquatic actinomycetes isolated from the sediments of mangrove forests in south of Iran. The Egyptian Journal of Aquatic Research 41(2): 197-201.

Kaur, T., R. Rani and R.K. Manhas. 2019. Biocontrol and plant growth promoting potential of phylogenetically new *Streptomyces* sp. MR14 of rhizospheric origin. AMB Express 9(1): 125, doi: 10.1186/s13568-019-0849-7.

Lacey, H.J. and P.J. Rutledge. 2022. Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species. Molecules 27(3): 887, doi: 10.3390/molecules27030887.

Le, K.D., J. Kim, H.T. Nguyen, N.H. Yu, A.R. Park, C.W. Lee and J-C. Kim. 2021. *Streptomyces* sp. JCK-6131 protects plants against bacterial and fungal diseases via two mechanisms. Frontiers in Plant Science 12: 726266, doi: 10.3389/fpls.2021.726266.

Lee, S.Y., H. Tindwa, Y.S. Lee, K.W. Naing, S.H. Hong, Y. Nam and K.Y. Kim. 2012. Biocontrol of anthracnose in pepper using chitinase, β -1,3 glucanase, and 2-furancarboxaldehyde produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. Journal of Microbiology and Biotechnology 22(10): 1359-1366.

Malviya, M.K., P. Trivedi and A. Pandey. 2018. Chitinase and glucanase activities of antagonistic *Streptomyces* spp. isolated from fired plots under shifting cultivation in northeast India. Journal of Advanced Research in Biotechnology 3(1): 1-7.

Manullang, W. and H. Chuang. 2020. *Streptomyces* sp. mitigates abiotic stress response and promotes plant growth. Journal of Plant Protection Research 60(3): 263-274.

Morou-Bermudez, E. and R.A. Burne. 2000. Analysis of urease expression in *Actinomyces naeslundii* WVU45. Infection and Immunity 68(12): 6670-6676.

Nguyen, H.Q., N.T.-H. Vu, H.H. Chu, S.K. Chu, H. Hoang, T.T. Tran, C. Nguyen, L.T.-M Dinh, H.T.-T Trinh and T.Q. Phi. 2018. Draft genome sequence of *Streptomyces cavourensis* YBQ59, an endophytic producer of antibiotics bafilomycin D, nonactic acid, prelactone B, and 5,11-epoxy-10-cadinanol. Microbiology Resource Announcements 7(11): 201056-18, doi: 10.1128/MRA.01056-18.

Nimisha, P., S. Moksha and A.K. Gangawane. 2019. Amylase activity of starch degrading bacteria isolated from soil. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 8(4): 659-671.

Pacios-Michelena, S., C.N. Aguilar González, O.B. Alvarez-Perez, R. Rodriguez-Herrera, M. Chávez-González, R. Arredondo Valdés, J.A. Ascacio Valdés, M. Govea Salas and A. Ilyina. 2021. Application of *Streptomyces* antimicrobial compounds for the control of phytopathogens. Frontiers in Sustainable Food Systems 5: 696518, doi: 10.3389/fsufs.2021.696518.

Pradhan, A., A. Pahari, S. Mohapatra and B.B. Mishra. 2017. Phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: Genetic mechanism and application. pp. 81-97. *In*: T. Adhya, B. Mishra, K. Annapurna, D. Verma and U. Kumar (eds.). Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects. Springer, Singapore.

Pragya, R., A. Yasmin and J. Anshula. 2012. An insight into agricultural properties of actinomycetes. International Journal of Research in Biosciences 1(1): 7-12.

Quinn, G.A., A.M. Banat, A.M. Abdelhameed and I.M. Banat. 2020. *Streptomyces* from traditional medicine: Sources of new innovations in antibiotic discovery. Journal of Medical Microbiology 69(8): 1040-1048.

Sheik, G.B., A.A. Alhumaidy, A.I.A. Abdel Raheim, Z.A. Alzeyadi and M.I. AlGhonaim. 2020. Taxonomic characterizations of soil *Streptomyces cavourensis* DW102 and its activity against fungal pathogens. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences 12(4): 462-467.

Shrivastava, P., R. Kumar, M.S. Yandigeri, N. Malviya and D.K. Arora. 2015. Isolation and characterization of Streptomycetes with plant growth promoting potential from mangrove ecosystem. Polish Journal of Microbiology 64(4): 339-349.

Siddharth, S., R.R. Vittal, J. Wink and M. Steinert. 2020. Diversity and bioactive potential of actinobacteria from unexplored regions of Western Ghats, India. Microorganisms 8(2): 225, doi: 10.3390/microorganisms 8020225.

Singh, L.S., I. Baruah and T.C. Bora. 2006. Actinomycetes of Loktak habitat: Isolation and screening for antimicrobial activities. Biotechnology 5(2): 217-221.

Sirikun, B. and N. Thaochan. 2018. Chitinase and protease production from indigenous insecticidal actinomycetes varieties. Khon Kaen Agriculture Journal 46(Suppl.1): 739-744. (in Thai)

Su, S.-S., L. Tian, G. Chen, Z.-Q. Li, W.-F. Xu and Y.-H. Pei. 2013. Two new compounds from the metabolites of a marine-derived actinomycete *Streptomyces cavourensis* YY01-17. Journal of Asian Natural Products Research 15(3): 265-269.

Sultana, S., S. Alam and M.M. Karim. 2021. Screening of siderophore-producing salt-tolerant rhizobacteria suitable for supporting plant growth in saline soils with iron limitation. Journal of Agriculture and Food Research 4: 100150, doi: 10.1016/j.jafr.2021.100150.

Tanatip, C. and K. Kunasakdakul. 2017. Paper type bioproduct of endophytic actinomycetes for controlling bakanae disease of Riceberry rice in seedling stage. Journal of Agriculture 34(1): 67-75. (in Thai)

Tangwattanachuleeporn, M., P. Ruangsuj, W. Yamprayoonswat, S. Sittihan, W. Jumpathong and M. Yasawong. 2021. Genome sequence of *Streptomyces cavourensis* BUU135, isolated from soil from a tropical fruit farm in Thailand. Microbiology Resource Announcements 10: 19, doi: 10.1128/MRA.01428-20.

Wilson, D.B. 2009. Cellulases. pp. 252-258. *In*: M. Schaechter (ed.). Encyclopedia of Microbiology. Elsevier/Academic Press, Amsterdam.

Yodpanan, P. and P. Thapanapongworakul. 2019. Selection of endophytic actinomycetes against *Phytophthora nicotianae* causing leaf blight and fruit rot of passion fruit. Khon Kaen Agriculture Journal 47 (Suppl. 1): 1633-1638. (in Thai)