b.174739

สัญญาเลขที่ 28 / 2550
รหัสโครงการวิจัย 5003050028

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การควบคุมเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. โดยชีววิธี

Biocontrol of *Lasiodiplodia* spp.

โดย

ผศ.ดร.เอกชัย ชูเกียรติโรจน์
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ประจำปี พ.ศ.2550

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อุราภรณ์ สอาดสุด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดหาเชื้อราสายพันธุ์ *Lasiodiplodia* และขอขอบคุณ ดร. สยาม ภพลือชัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง สำหรับความช่วยเหลือในการทดลองหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ผศ.ดร.เอกชัย ชูเกียรติโรจน์
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
กุมภาพันธ์ 2554

บทสรุปผู้บริหาร

เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. เป็นเชื้อราก่อโรคที่สำคัญในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด อาทิ ลำไย กล้วย เงาะ และแอปเปิล ในปัจจุบัน วิธีการป้องกันและควบคุมการเกิดโรคจากเชื้อราดังกล่าวนิยมใช้สารเคมี เช่น เบนโนมิล และจากการใช้สารเคมีได้ทำให้เกิดผลเสียตามมา ได้แก่ การกลายพันธุ์ของเชื้อราที่มีความรุนแรงและสามารถต้านทานการใช้สารเคมีได้ นอกจากนี้ ปริมาณของสารเคมีที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์ยังเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคอีกด้วย ดังนั้น ผู้วิจัยได้นำเสนองานวิจัยนี้เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้วิธีทางธรรมชาติที่สามารถควบคุมเชื้อราก่อโรคชนิดนี้ ชีววิธี (หรือ Biocontrol) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจ และน่าจะเป็นวิธีที่มีความปลอดภัยต่อเกษตรกร และผู้บริโภค เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทดลองแยก และคัดกรองเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าว จากการทดลอง พบว่า สามารถแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 43 ไอโซเลท จากตัวอย่างถั่วเน่า ดิน บริเวณรากพืช และเปลือกของลำไย จากการตรวจสอบในขั้นต้นพบว่าเป็นแบคทีเรียทั้งหมด จากนั้นได้ทำการคัดกรองแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด คือ สายพันธุ์ TN79, RS5 และ CMU2 มาศึกษาต่อในด้านของการผลิตและความเสถียรของเมทาบอไลท์ จากการศึกษา พบว่า สารเมทาบอไลท์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่ pH 7.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ สารเมทาบอไลท์ที่ได้ยังมีความเสถียรต่อเอนไซม์โปรตีเนส เค และการได้รับรังสี UV สำหรับการระบุชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน สมบัติทางเคมี และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus subtilis* / *B. amyloliquefaciens*

ผลการทดลองที่ได้มีความเป็นไปได้สูงที่น่าจะนำไปใช้ในภาคสนาม หากได้รับการศึกษาและทดลองต่อ เนื่องจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จัดเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม GRAS (Generally Regarded As Safe) อย่างไรก็ตาม ควรมีการตรวจสอบถึงชนิดของสารเมทาบอไลท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราตลอดจนความเป็นพิษของสารด้วย

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยได้ทำการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* จากแหล่งธรรมชาติสามแหล่งคือ ถั่วเน่า ดินบริเวณรากพืชสมุนไพร และ ผิวของผลลำไย จำนวนทั้งหมด 284 ไอโซเลท จากการทดสอบขั้นต้นโดยใช้เทคนิค dual culture test พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 43 ไอโซเลท โดยมีร้อยละของการยับยั้งอยู่ระหว่าง 25.0 - 67.5 จากนั้นได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ดีที่สุด คือ TN79, RS5 และ CMU2 มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ ค่า pH 7

สำหรับขั้นตอนต่อมา ผู้วิจัยได้ทำการสกัดสาร secondary metabolite ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อราโดยใช้สารสกัดหยาบดังกล่าว พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ร้อยละ 31.82 - 37.60 และยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 50.85 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า มีความเสถียรต่อ proteinase K (1 mg/ml) แสงอัลตราไวโอเลต (254 นาโนเมตร) อุณหภูมิในช่วงกว้าง (37 - 80 องศาเซลเซียส) แต่ไม่สามารถรักษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เมื่อนำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclaving) นอกจากนี้สารสกัดจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสามไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์อื่นได้อีก และจากการวิเคราะห์สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า มีสารประกอบมากกว่าห้าสิบชนิด อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกสารบริสุทธิ์มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้

จากการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 ด้วยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี ทดสอบด้วยชุดทดสอบแบคทีเรีย API 50 CHB/E kits (bioMérieux) และ BLAST search โดยใช้ลำดับของ 16S rRNA gene พบว่า แบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีความใกล้เคียงกับ *B. amyloliquefaciens* มากที่สุดที่ร้อยละ 99.9 ส่วนแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 และ CMU2 นั้น เมื่อดูจากผลการ BLAST จะเห็นได้ว่ามีความใกล้เคียงกับ *B. subtilis* มากถึงร้อยละ 96.17 และ 99.6 ตามลำดับ

Abstract

A total of 284 bacterial isolates were screened from *thua nao*, rhizosphere soil and surface of Longan fruit to test for their antagonistic ability against *Lasiodiplodia theobromae*. Of these, 43 strains of bacteria were capable of inhibiting mycelium growth (25 - 67.5%) by using dual culture plate test. The antagonistic activity of 43 strains was further tested by using supernatant collected from nutrient broth culture of bacteria (pH 7, 37°C). Interestingly, only the culture supernatants that still had bacterial cells were able to inhibit mycelial growth of the fungal strain (0 - 52.4%) In addition, it was showed that the filter-sterilized culture supernatants could not inhibit the fungal mycelium. Due to superior inhibitory activity, the bacteria strains TN79, RS5 and CMU2 were selected for further study. For optimal condition, it was found that pH 7 and 37°C were the most effective condition.

Subsequently, the antifungal compounds of TN79, RS5 and CMU2 were extracted from the 2-week nutrient agar culture using phosphate buffer pH 7.0. The extracts could inhibit mycelial growth of *L. theobromae* (31.82 - 37.60%) and other strains including LP1, LP2, LG2 and type strain No.1120 (17.39 - 33.33%). Besides, the extracts also affected conidial germination of *L. theobromae* up to 50.85% (RS5). The extracts remained active when exposed to UV light (254 nm) up to 1 hour and to proteinase K (1mg/ml). In addition, the extracts were active over a wide range of pH (6 - 9) and temperature (37 - 80°C). However, autoclaving treatment (121°C, 15 min) completely destroyed the antifungal activity. When analyzed by GC-MS, total ion chromatogram showed more than 50 compounds present in bacterial metabolites.

For bacterial identification, based on bacterial morphological characteristic, biochemical characteristic and API 50 CH kit, TN79, RS5 and CMU2 were identified as *Bacillus subtilis* / *B. amyloliquefaciens*. Based on BLAST search of 16S rRNA genes sequencing, TN79 was closely related to *B. amyloliquefaciens* (99.90%). RS5 and CMU2 were most closely related to *B. subtilis* (96.17 and 99.6%)

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ 1

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับ 2

บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร

2.1 เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* 3

2.2 โรคที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* และการเข้าทำลาย 6

2.3 การควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของเชื้อรา *L. theobromae* 8

2.4 การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* ด้วยชีววิธี 8

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1 เชื้อรา *L. theobromae* 10

3.2 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย 10

3.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยแบคทีเรีย 10

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของแบคทีเรีย 11

3.5 การสกัดสารยับยั้งเชื้อราจากแบคทีเรียโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง 11

3.6 การทดสอบความเสถียรของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย 11

3.7 การตรวจสอบชนิดของสารสกัดจากแบคทีเรียโดยใช้เครื่อง GC-MS 12

3.8 การบ่งชี้ชนิดแบคทีเรีย 13

บทที่ 4 การคัดกรองจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae*

4.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ของแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่า ดินบริเวณรากพืชสมุนไพรและ แบคทีเรียจากผิวของผลลำไย 15

4.2 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ต่างสายพันธุ์ 20

4.3 ความสามารถในการผลิตสารของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างต่าง ๆ กัน 22

4.4 อภิปรายผล 23

บทที่ 5 การทดสอบความเสถียรและการตรวจสอบชนิดของสารสกัดจากแบคทีเรีย

5.1 การทดสอบความเสถียรของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย 27

5.2 การทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* โดยใช้สารสกัดจากแบคทีเรีย 32

5.3 การตรวจสอบชนิดของสารสกัดจากแบคทีเรียด้วยวิธี gas chromatography – mass spectrometry 34

5.4 อภิปรายผล 35

บทที่ 6 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TN79, RS5 และ CMU2

6.1 การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา 38

6.2 การตรวจสอบทางชีวเคมี 39

6.3 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux) 40

6.4 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ 16S rRNA gene sequence 42

6.5 อภิปรายผล 44

บทที่ 7 สรุปผลการทดลอง 47

บรรณานุกรม 49

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย

เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl (synonym *Botryodiplodia theobromae*) เป็นเชื้อราที่พบในเขตร้อนและกึ่งร้อน มักพบในผลไม้เน่าเสียและรอยด่างที่เปลือกของต้นไม้ (Summerbell *et al.*, 2004) เชื้อรานี้ก่อให้เกิดโรคในพืชได้มากกว่า 500 ชนิด (Cedeno *et al.*, 1996) และที่สำคัญยังทำให้เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวของพืชเศรษฐกิจในเขตร้อนและเขตอบอุ่นหลายชนิด อาทิ โรค crown rot ของกล้วย (Mortuza and Ilag, 1999) โรคเน่าของ มะม่วง พืชในตระกูลส้ม (Singh, 2000) เงาะ (ทัศนวรรณ ศรีวะอุไร และคณะ, 2547) ทุเรียน (สมศิริ แสงโชติ และคณะ, 2539) ลิ้นจี่ และ ลำไย (ประพันธ์ โอสถาพันธุ์ และคณะ, 2544) เป็นต้น

ในปัจจุบันการป้องกันและการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ ทำได้โดยการใช้สารเคมีบางชนิด เช่น acetaldehyde (วรุณรักษ์ ราศีนวล, 2539) และ sulphur dioxide (พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ, 2546) มาชุบผลลำไยหลังการเก็บเกี่ยว อย่างไรก็ตามพบว่ามีปัญหาเรื่องพิษตกค้างของสารเคมี ผลกระทบต่อกลิ่นและรสชาติของผลไม้ นอกจากนี้ผลกระทบที่สำคัญอีกประการหนึ่ง ก็คือ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคที่มีการต้านทานต่อสารเคมี

การควบคุมเชื้อราด้วยชีววิธีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ควรจะให้ความสำคัญและเร่งศึกษาวิจัยถึงความเป็นไปได้ในการใช้เป็นมาตรการป้องกันและควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อประโยชน์และความปลอดภัยของผู้บริโภค ด้วยเหตุนี้เองการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถผลิตสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรค จึงเป็นอีกมาตรการหนึ่งที่สมควรศึกษาวิจัย และพัฒนาเพื่อใช้ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวแทนการใช้สารเคมี ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมามีรายงานการวิจัยจำนวนมากที่ได้ศึกษาถึงการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวในพืชหลายชนิด (Janisiewicz and Korsten, 2002; Fravel, 2005) อย่างไรก็ตาม การควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* ด้วยชีววิธีนั้น ยังมีการศึกษาและวิจัยอยู่จำกัด อาทิ งานของอุดมและคณะ (2548) ที่ใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมการเกิดโรคจากเชื้อราในเงาะ งานของสมศิริ แสงโชติ และคณะ (2548) ที่ใช้เชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคขั้วหวีเน่าบนกล้วยหอมทอง และการใช้เชื้อ *Trichoderma* sp. ในการควบคุมโรคเน่าของกล้วยเช่นกัน (Mortuza and Ilag, 1999) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาเพิ่มเติมในการตรวจหาเชื้อปฏิปักษ์ตามธรรมชาติที่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. theobromae* เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาแทนการใช้สารเคมีหรือยาฆ่าเชื้อราได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย

เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และศึกษาสมบัติบางประการของสารสกัดจากจุลินทรีย์ดังกล่าว

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ได้แก่ ดินบริเวณรากพืชสมุนไพร จุลินทรีย์ที่ได้จากผิวของผลลำไย และตัวอย่างอาหารหมักดอง เช่น ถั่วเน่า ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *L. theobromae* จากนั้นจึงคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารอินทรีย์ หรือสารเคมีที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *L. theobromae* ได้ดีที่สุด นำมาตรวจสอบว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดใด ทำการทดสอบความเสถียรของสารสกัดจากจุลินทรีย์ รวมถึงการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากจุลินทรีย์นั้นๆ

1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับ

ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ตลอดจนทราบข้อมูลพื้นฐานของสภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพของสารสกัดและชนิดของสารดังกล่าว

บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร

2.1 เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

อนุกรมวิธานของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ยังค่อนข้างสับสนและไม่ชัดเจน มีความซับซ้อนในการตั้งชื่อ และเมื่อสืบค้นจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า มีผู้วิจัยตั้งชื่อไว้หลายชื่อ ทั้งนี้เนื่องจาก เชื้อราชนิดนี้มีรูปร่างได้หลายแบบ (pleomorphism) และยังก่อให้เกิดโรคในพืชได้หลายชนิดกระจายทั่วไปในเขตร้อน อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันลำดับขั้นทางอนุกรมวิธานของเชื้อราที่นิยมกล่าวอ้าง ได้แก่ระบบของ Sutton (1980) และ Barnett and Hunter (1987) ดังภาพที่ 2.1

Kingdom Fungi

Division Amastigomycota

Subdivision Deuteromycotina

Class Deuteromycetes

Subclass Coelomycetidae

Order Sphaeropsidales

Family Sphaeropsidaceae

Genus *Lasiodiplodia*

Species *Lasiodiplodia theobromae*

ภาพที่ 2.1 อนุกรมวิธานของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

ในปี 2006 Crous และคณะ ได้ทำการศึกษาและแสดงให้เห็นว่าเชื้อราใน Family Botryosphaeriaceae นี้ยังมีความแตกต่างกันอยู่มากในระดับของ phylogenetic lineages ซึ่งเกี่ยวข้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการสืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา จากผลการศึกษาทำให้ Genus *Botryosphaeria* ถูกจำกัดให้มีเชื้อราเพียง 2 ชนิด คือ *B. dothidea* (Moug. : Fr.) Ces. & De Not. และ *B. corticis* (Dermaree & M.S. Wilcox) Von Arx & E. Müll. แสดงให้เห็นว่าเชื้อราใน Genus *Botryosphaeria* ไม่น่าจะเป็น teleomorph state ของเชื้อรา *L. theobromae* อีกต่อไป ดังนั้นในปี 2008 Alves และคณะที่ได้ทำการศึกษาด้าน สัณฐานวิทยา และ อณูพันธุศาสตร์ของเชื้อรา *L. theobromae* จึงได้ระบุชื่อเชื้อรา และ synonyms ของเชื้อราไว้ดังต่อไปนี้

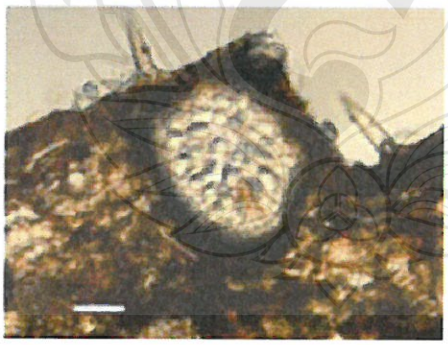
Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maubl., Bull. trimest. Soc. Mycol. Fr. 25: 57 (1909)

≡ *Botryodiplodia theobromae* Pat., Bull. Soc. Mycol. Fr. 8: 136 (1892).

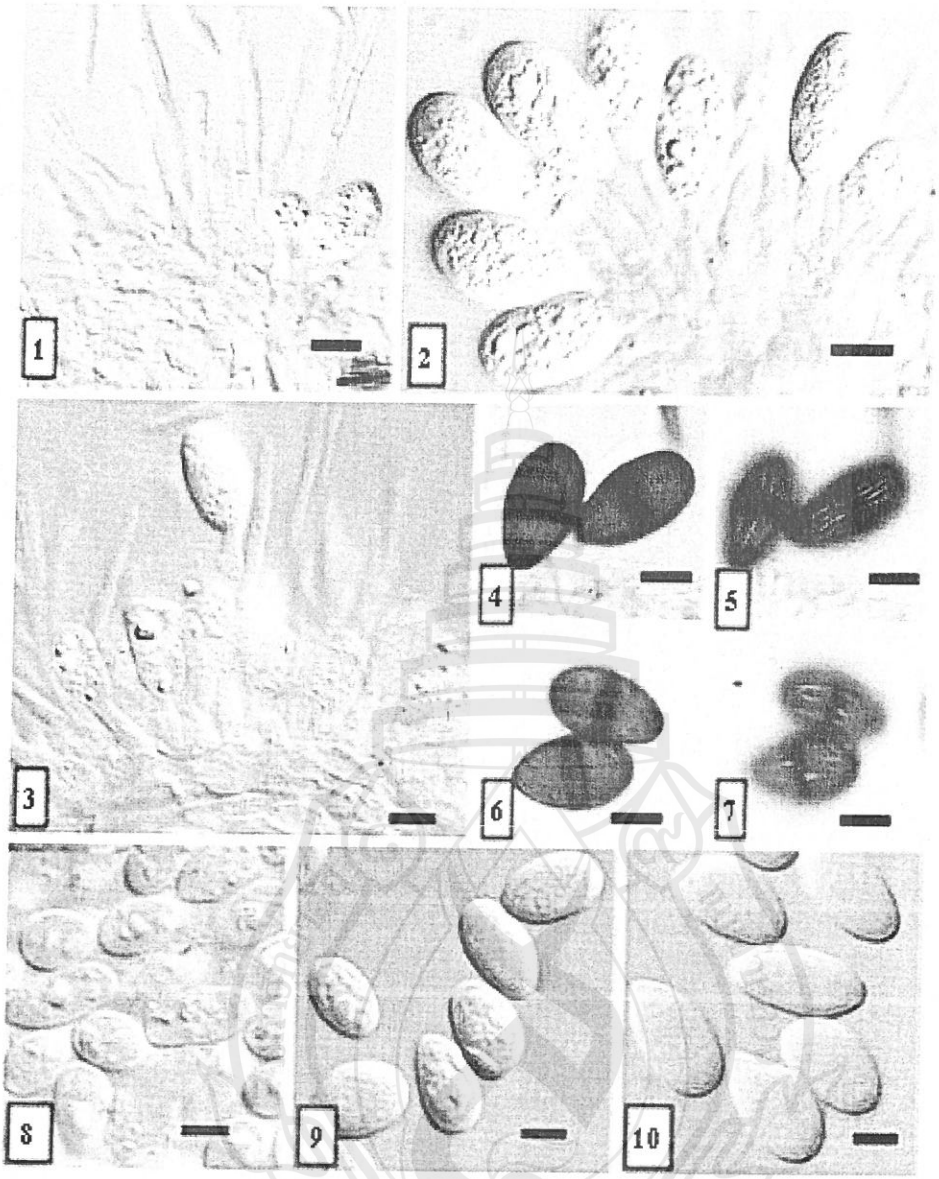
= *Diplodia gossypina* Cooke, Grevillea 7: 95 (1879).

นอกจากเชื้อ *L. theobromae* แล้ว เชื้อราในจีนัส *Lasiodiplodia* ยังมีการค้นพบเพิ่มขึ้นอีกหลายสปีชีส์ เช่น ในปี 2004 Palvic และคณะได้รายงานเชื้อราที่ค้นพบใหม่ในชื่อ *L. gonubiensis* sp. nov. และในปี 2008 Alves และคณะก็ได้รายงานเพิ่มมาอีกสองสปีชีส์คือ *L. pseudotheobromae* sp. nov. และ *L. parva* sp. nov. โดยดูจากความแตกต่างของลักษณะของสปอร์ของเชื้อรารวมลักษณะทางพันธุศาสตร์ด้วย

เชื้อรา *L. theobromae* เจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar เส้นใยเมื่อยังอายุน้อยมีสีขาวละเอียดและค่อนข้างฟู ซึ่งจะเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน เมื่อโคโลนีแก่เส้นใยจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเทาดำ เส้นใยมีผนังกั้น มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยเส้นใยของเชื้อราเมื่ออายุมากจะสร้าง fruiting body ที่เรียกว่า conidiomata แบบ pycnidia ซึ่งอาจมีช่องเดียวหรือหลายช่องก็ได้ (ภาพที่ 2.2) (Singh, 2000) ภายในประกอบด้วยเส้นใย paraphyses ใสไม่มีสี (hyaline) รูปร่างเป็นทรงกระบอก (cylindrical) มีผนังกั้น (septate) บางครั้งอาจพบว่ามีการแตกกิ่งก้านสาขา มี conidiogenous cells ใสไม่มีสีเช่นกัน ผนังเซลล์บางและเรียบ รูปร่างเป็นทรงกระบอก มีการแบ่งเซลล์แบบ holoblastic อาจมีการจัดเรียงเซลล์แบบเป็นปล้อง 1 - 2 ปล้อง (annellations) หรือเรียงตัวในระนาบเดียวกันเพื่อให้มีความหนาแน่นมากขึ้น (periclinal thickenings) (Alves *et al.*, 2008; Cilliers *et al.*, 1993) โดย conidiogenous cells จะมีหน้าที่ในการสร้าง conidia ซึ่งเป็น asexual spores โดยสร้างอยู่บนปลายของ conidiophores (Stover, 1972) ลักษณะของ conidia เมื่ออ่อนจะมีเพียงเซลล์เดียว ใสไม่มีสี รูปร่างค่อนข้างรีจนถึงค่อนข้างกลม (subovoid to ellipsoid - ovoid) ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย บริเวณที่กว้างที่สุดของตัวเซลล์คือช่วงกลาง ไม่มีผนังกั้น ผนังเซลล์หนาและประกอบไปด้วย granular และผนังเซลล์จะยังคงไม่มีสีไปจนกว่าจะถูกปล่อยออกมาจาก pycnidia จากนั้น conidia จึงจะเริ่มสร้างเม็ดสี สีน้ำตาลเข้ม และสร้างผนังกั้น (septum) 1 ชั้นตรงกลาง ทำให้แบ่งออกเป็น 2 เซลล์ มีรูปร่างรีคล้ายไข่ มีขนาดประมาณ 26.2 - 27 x 14 - 14.4 ไมโครเมตร ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเห็นเป็นริ้วในแนวยาว (ภาพที่ 2.3) (Alves *et al.*, 2008; Cilliers *et al.*, 1993)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะของ Pycnidium ของเชื้อรา *L. theobromae* (บาร์เท่ากับ 40 ไมโครเมตร) (Sato *et al.*, 2007)



ภาพที่ 2.3 (1) เส้นใย paraphyses, (2-3) Conidiogenous cells และ conidia ที่ยังอ่อนอยู่, (4 - 7) conidia แก่ แสดงให้เห็นริ้วของเม็ดสีชัดเจน (8 - 10) conidia ที่ยังอ่อนอยู่ (บาร์มีค่าเท่ากับ 10 ไมโครเมตร) (Alves *et al.*, 2008)

สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *L. theobromae* มีหลายอย่าง เช่น แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ค่า pH อุณหภูมิ และแสง โดยแหล่งคาร์บอนจะช่วยเร่งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา เส้นใยจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส มอลโตส และแป้ง แต่เจริญได้น้อยในอาหารที่มีน้ำตาลฟรักโตส ไซโลส และเซลลูโลส นอกจากนี้เชื้อรา *L. theobromae* ยังเจริญได้ดีในแหล่งที่มีไนโตรเจนเป็นเคซีนไฮโดรไลเซท โพแทสเซียมไนเตรท และแอลแอสพาราจีน แต่เจริญได้น้อยใน ดีเฟนิลอาลานีน และแอลเมไธโอนีน และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราจะอยู่ในช่วง pH 4 - 5 และ 7.1 (สุมิตรา แสงวนิชย์, 2547)

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 24 - 30 องศาเซลเซียส ในธรรมชาติอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อรา *L. theobromae* สามารถเจริญและก่อให้เกิดโรคในพืชได้ จะเท่ากับ 31.5 องศาเซลเซียส และต่ำสุดคือ 25.9 องศาเซลเซียส (Singh, 2000)

แสงหรือช่วงเวลาในการรับแสงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลมากที่สุดต่อการสร้างหรือไม่สร้าง pycnidia ของเชื้อรา *L. theobromae* เพราะเชื้อรา *L. theobromae* จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อราที่ตอบสนองต่อแสง near UV และแสงสีน้ำเงิน ระยะเวลารับแสงที่ดีที่สุดที่จะทำให้เกิดการสร้าง pycnidia คือ 16 ชั่วโมงต่อวัน และหากได้รับแสงน้อยกว่า 4 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะนานเกิน 23 วันจะทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา (Cilliers, 1993) แสงที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่จะช่วยกระตุ้นการสร้าง pycnidia คือ 15 ฟุตเทียนต่อเนื่องกันเป็นเวลา 4 วัน ทั้งนี้แสงมีผลต่อการสร้าง pycnidia และ สปอร์ของเชื้อรา แต่ไม่มีผลการการเจริญของเส้นใยของเชื้อราแต่อย่างใด (สุมิตรา แสงวนิชย์, 2547)

การสร้างสปอร์หรือ conidia ของเชื้อรา *L. theobromae* เกิดขึ้นได้ยากหรือไม่เกิดขึ้นเลยบนอาหาร PDA ดังนั้น การชักนำให้เกิดการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* เพื่อใช้ตรวจสอบชนิดอาจทำได้โดยการเพาะเลี้ยงราบนผลไม้ที่เป็น host ตามธรรมชาติ เช่นบนผลกล้วย ผลชมพู่ (อุดม ฟ้ารุ่งสาง และคณะ, 2548) และทิ้งไว้จนผลไม้มีลักษณะเป็นมัมมี่ คือผิวแห้ง แข็งและมีสีดำ conidiomata จะถูกสร้างขึ้นและฝังตัวอยู่ใน host เพื่อรอที่จะปล่อย mature conidia ออกมาเมื่อถึงเวลาที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามมีรายงานการชักนำให้เกิดสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้เช่นกัน โดยเติมชิ้นส่วนของ host ของเชื้อราลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Alves (2008) ใช้การเติม poplar twigs ที่ปราศจากเชื้อลงใน 2% water agar บ่มที่อุณหภูมิห้องและให้รับแสงธรรมชาติ Palvic (2004) ชักนำให้เกิดสปอร์โดยการเติม pine needles ที่ปราศจากเชื้อ ลงในอาหาร 2% malt extract agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส และให้รับแสง แบบ near UV light จึงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ได้

2.2 โรคที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* และการเข้าทำลาย

เชื้อรา *L. theobromae* ก่อให้เกิดโรคกับพืชได้มากกว่า 500 ชนิด (Cedeno *et al.*, 1996) พบทั่วทุกภูมิภาคของโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนและกึ่งร้อน (ตารางที่ 2.1) เชื้อราชนิดนี้เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดโรคในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวซึ่งส่วนใหญ่จะอ่อนแอต่อจุลินทรีย์สาเหตุโรคทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางด้านการเกษตรอย่างมาก โรคพืชที่พบหลังเก็บเกี่ยวมักมีสาเหตุจากเชื้อโรคแอบแฝงในระยะแปลงปลูกตั้งแต่ในระยะติดดอกแต่จะยังไม่แสดงอาการให้ปรากฏ ลักษณะอาการของโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวจะปรากฏให้เห็นในขั้นตอนใดก็ได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อโรคนั้นๆ การเข้าทำลายหลังการเก็บเกี่ยวของเชื้อรา *L. theobromae* จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดแผลที่ผิวของผลไม้ โดยเชื้อราจะเข้าทำลายทางบาดแผล สปอร์ของเชื้อราอาจจะติดมากับผิวผลไม้ กิ่ง ก้าน หรือ บริเวณขั้วผลมาตั้งแต่อยู่ในสวนหรือแปลงปลูก และสามารถเข้าทำลายผลไม้ทางรอยตัดบริเวณขั้วผล เมื่อผลไม้เริ่มสุก การลุกลามของเชื้อราจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและลามไปทั่วทั้งผล ทำให้เกิดผลเน่า บางครั้งพบ fruiting body ของเชื้อราเป็นจุดดำบนแผลของผลไม้ (ดนัย บุญเกียรติ, 2534)

นอกจากการโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้ เชื้อรา *L. theobromae* ยังก่อให้เกิดโรคกับส่วนอื่นๆของต้นไม้ได้ เช่น โรคยอดแห้งตาย (die - back) ซึ่งพืชที่ติดเชื้อโรคจะมีอาการแห้งตายที่เริ่มจากปลายยอด ปลายกิ่งหรือปลายก้าน แล้วลุกลามมายังส่วนกิ่งก้านสาขาและลามมาถึงโคนต้นของพืช มักจะเกิดขึ้นในระยะที่ต้นไม้อยู่ในระยะพักตัว พบโรคระบาดนี้ได้ในสวนผลไม้เช่นสวนมะม่วงหรือในต้นไม้ประเภทสน (Srivastava and Mehra, 2004) และยังเป็นสาเหตุให้เกิดโรคยางไหล (gummosis) กับต้นไม้อีกหลายชนิด (Li, 1995)

นอกจากนี้เชื้อรา *L. theobromae* ยังก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ด้วย โดยก่อให้เกิดโรคกระจกตาอักเสบจากเชื้อรา โรคเชื้อราที่เล็บ และโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อรา โดยมีรายงานการติดเชื้อจากการเกิดบาดแผลที่สัมผัสกับส่วนของพืชเช่น ไม้ที่มีเชื้อราอยู่แต่พบได้ไม่มากนัก (Summerbell, 2004)

ตารางที่ 2.1 โรคของพืชที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae*

Hosts	Symptoms and signs	References
Hevea brasiliensis Mull. Arg.	Blue-strained timber,dieback	Fu *et al.* (1988); Narain and Dash (1989)
Pyrus spp.	Canker and dieback	Avtar *et al.* (1990)
Comus spp.	Cankers carrying conidia	Mullen *et al.* (1991)
Platanus occidentalis L.	Production of cankers	Filer (1969); Lewis *et al.* (1978)
Elaeagnus angustifolia L.	Bark, cambium and phloem tissue killed	Peterson (1976)
Aleurites montana Lour.	Canker disease	Large (1948)
Eucalyptus spp.	Root collar canker causing physiological wilting	Sharma *et al.* (1985); Soni *et al.* (1991)
Cajanus cajan. Huth.	Stem end rot	Jagdish and Pathak (1989)
Citrus reticulata. Blanco.	Twig gumming and dieback	Feder and Huchins (1966)
Carica papaya. L.	Fruit rot	Hunter *et al.* (1969)
Citrus aurantifolia Swingle., C. *sinensis* Osbeck	Gummosis and dieback	Singh *et al.* (1971)
Carica papaya. L.	Stem-end rot	Hunter *et al.* (1969)

2.3 การควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของเชื้อรา *L. theobromae*

2.3.1 การควบคุมป้องกันด้วยวิธีทางกายภาพ

อาจทำได้โดยการควบคุมอุณหภูมิ การฉายรังสี ตลอดจนการรักษาความสะอาดระหว่างการเก็บรักษา ตัวอย่างการควบคุมอุณหภูมิ เช่น การเก็บรักษาผลฝรั่งที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* ได้ อย่างไรตาม หากนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิปกติหรืออุณหภูมิห้อง จะช่วยเร่งอาการเน่าให้เกิดมากขึ้นได้ (Misra, 2004) การเก็บรักษาลำไยที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส จะทำได้เป็นเวลานานถึง 12 วันโดยที่คุณภาพของลำไยยังดีอยู่ (กัลยา วิธี, 2540) อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำมีผลชะลอการเจริญของเชื้อได้ แต่ไม่สามารถกำจัดเชื้อสาเหตุที่ฝังตัวอยู่ในเนื้อเยื่อ การใช้อุณหภูมิสูงในการควบคุม อาจจะใช้อากาศร้อน อากาศชื้นร้อน หรือ น้ำร้อน การใช้น้ำร้อนในการควบคุมการโรคของผลผลิตมีข้อได้เปรียบการใช้สารเคมีคือไม่มีสารพิษตกค้าง เช่น การควบคุมเชื้อรา *L. theobromae* ในผลมะละกอหลังการเก็บเกี่ยวสามารถใช้วิธีการจุ่มน้ำร้อนที่ 48 - 49 องศาเซลเซียสเป็นเวลายี่สิบนาทีก็สามารควบคุมได้ในระดับหนึ่ง (Singh, 2000; Ventura *et al.*, 2004) แต่การใช้น้ำร้อนก็มีข้อเสียเช่นเดียวกับการใช้ความเย็นคือไม่สามารถมีผลในการควบคุมในระยะยาวได้ นอกจากนี้ผลไม้หลายชนิดไม่สามารถจะถูกน้ำได้ภายหลังการเก็บเกี่ยว เพราะจะทำให้เกิดความเสียหาย สำหรับการใช้รังสีในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวนั้นไม่แพร่หลายและมักมีผลข้างเคียงต่อคุณภาพของผลิตผลเช่น การสุกที่ผิดปกติ การใช้รังสีกับผลไม้เมืองร้อนเช่น มะละกอ และมะม่วงให้ผลดีในแง่การป้องกันโรคแต่มักไม่คุ้มค่าเพราะมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

2.3.2 การควบคุมป้องกันด้วยวิธีทางเคมี

การใช้สารเคมีอาจใช้ในรูปของการฉีดพ่น หรือ จุ่มผลไม้ลงในสารเคมี ใช้แว๊กซ์เคลือบ หรือ ใช้การรมด้วยสารเคมีที่อยู่ในรูปก๊าซเป็นต้น การควบคุมโรคที่เกิดจาเชื้อรา *L. theobromae* โดยใช้สารเคมี อาทิ การควบคุมเชื้อราในทุเรียน ใช้สาร imazalil เข้มข้น 500 ppm ชุบนาน 3 นาที จะให้ผลในการควบคุมโรคผลเน่าได้ดีที่สุดโดยลดความเสียหายลดจากร้อยละ 42 ลงมาเหลือเพียงร้อยละ 8 (สมศิริ แสงโชติ, 2539) การควบคุมโรคในฝรั่งหลังจากการเก็บเกี่ยวใช้วิธีจุ่มผลลงชุบสารเคมีเช่นกันโดยใช้สารเคมีสองชนิดคือ ชุบสาร imazalil เข้มข้น ร้อยละ 0.1 ก่อนแล้วจึงตามด้วย benomyl เข้มข้นร้อยละ 0.1 พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้สูงสุด (Singh, 2000) การควบคุมโรคในมะละกอ มีการใช้สารเคมีร่วมกับวิธีทางกายภาพได้แก่ ใช้ลมร้อนที่อุณหภูมิ 48.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานสามถึงสี่ชั่วโมง ร่วมกับการจุ่มหรือชุบผลด้วย thiabendazole (4 กรัม ต่อลิตร) (Singh, 2000) สามารถควบคุมโรคเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวได้ดี

2.4 การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* ด้วยชีววิธี

ทัศวรรณ และคณะ (2547) ทำการแยกจุลินทรีย์จากผิวพืชและสามารถแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (ไม่ระบุชนิด) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ 25 ไอโซเลท และมีจำนวน 10 ไอโซเลทที่มีผลต่อการงอกของสปอร์ของรา จุลินทรีย์จำนวน 7 ไอโซเลททำให้ germ tube ของรามีลักษณะบวมพองผิดรูปร่าง และอีก 3

ไอโซเลททำให้การงอกของสปอร์ลดลง จากร้อยละ 82.2 เป็นร้อยละ 63.2 จากการทดสอบกับผลเงาะพบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคลงได้ร้อยละ 52 - 78 เมื่อปลูกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนแผลของเงาะก่อนปลูกเชื้อรา

อุดม ฟ้ารุ่งสาง และคณะ (2548) ได้แยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติมายับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สาเหตุของโรคเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ โดยทำการศึกษาผลของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* พบว่ามีเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์จำนวน 37 ไอโซเลท จากเชื้อยีสต์ทั้งหมด 721 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 44 - 16/2 เป็นเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดโดยสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราให้ลดลงเหลือร้อยละ 34.97 จากร้อยละ 79.39

สมศิริ แสงโชติ และสุมิตรา แสงวนิชย์ (2548) ได้ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สาเหตุของโรคขั้วหวีเน่าบนกล้วยหอมทอง โดยใช้เชื้อยีสต์ 11 ชนิด ทดสอบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าการใส่เชื้อยีสต์ก่อนเชื้อรา 24 ชั่วโมง สามารถควบคุมโรคหวีเน่าได้ดีกว่าการใส่เชื้อยีสต์พร้อมหรือหลังเชื้อรา 24 ชั่วโมง โดยเชื้อยีสต์ *Endomycosis fibuligera* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมและลดความรุนแรงของโรคได้ถึงร้อยละ 82.7

Mortuza and Ilag (1999) ได้คัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลทมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* โดยใช้เทคนิค dual culture และศึกษาการเป็นปรสิตของเชื้อรา *T. hazainum* และ *T. viride* ต่อ เชื้อรา *L. theobromae* โดยดูจากเกลียวของเชื้อรา *Trichoderma* spp.ที่ขดเป็นเกลียวรอบเส้นใยของ *L. theobromae* ทำให้เกิดความผิดปกติของรูปร่างของเส้นใยเช่นเกิดการบวมโป่งพอง หรือ หดสั้นลง หรือกลมมน เกิด granulation ของ cytoplasm และ เกิดการ disintegration ของผนังเซลล์ของเชื้อรา *L. theobromae* อีกด้วย จากการทดลองกับผลกล้วยพบว่าเชื้อรา *T. viride* สามารถลดการเน่าเสียได้ร้อยละ 29.07 ถึง 65.06 การใส่เชื้อ *T. viride* กับผลกล้วยเป็นเวลา 14 ชั่วโมงก่อนเชื้อรา *L. theobromae* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากกว่าการใส่ไปพร้อมกันหรือ หลังจากใส่เชื้อรา *L. theobromae* ไปแล้ว 14 ชั่วโมง

Sivakumar *et al.* (2000) แยกเชื้อราปฏิปักษ์ *T. hazainum* (TrH 40) ได้จากผิวพืชในสวนเงาะ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคสามชนิด รวมถึงเชื้อรา *L. theobromae* ที่เป็นสาเหตุของโรค stem end rot ในเงาะ สามารถลดการเจริญของเส้นใยได้ถึงร้อยละ 68 โดยการยับยั้งเกิดขึ้นทั้งในแบบเป็นปรสิตแท้และการสร้างสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อก่อโรคโดยการทำลายผนังเซลล์ คือ glucanase และ chitinase ผลการทดสอบสามารถรักษาคุณภาพ และสีของผลไม้ได้ดี

Swain and Ray (2006) แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* จาก cowdung โดย *B. subtilis* ที่แยกได้นี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* (*B. theobromae*) ที่แยกได้จากแผลเน่าเสียภายหลังการเก็บเกี่ยวของ yam tuber ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยกันแบบ dual culture ได้อย่างสมบูรณ์ เชื้อราก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ กระบวนการยับยั้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์คาดว่า เป็นการแย่งสารอาหารและพื้นที่ในการเจริญ โดย *B. subtilis* สามารถเจริญได้รวดเร็วกว่ามากและเจริญเต็มพื้นที่ของจานอาหารเลี้ยงเชื้อจนทำให้เชื้อรา *L. theobromae* ไม่สามารถเจริญได้

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1 เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

ได้ตัวอย่างเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์ต่าง ๆ จากสถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเชื้อรา *L. theobromae* type strain 1120 จากกรมวิชาการเกษตร โดยใช้อาหาร potato dextrose agar ในการเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 2 วัน สำหรับการเก็บรักษาสายพันธุ์ทำได้โดยเพาะเชื้อราบนอาหาร PDA slant เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

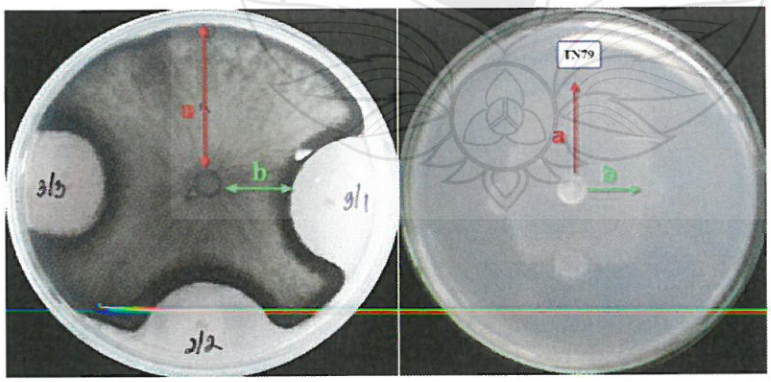
3.2.1 แบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่า จำนวนทั้งหมด 170 ไอโซเลท

3.2.2 แบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรากพืชสมุนไพร จำนวนทั้งหมด 111 ไอโซเลท

3.2.3 แบคทีเรียที่แยกได้จากผิวของผลลำไย จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 3 ไอโซเลท

3.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยแบคทีเรีย

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรีย ที่ต้องการทดสอบไว้ด้วยกันบนอาหาร โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียให้มีระยะห่างจากเชื้อรา ประมาณ 3 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน บันทึกผลการเจริญของเส้นใยของเชื้อราด้านที่ไม่ได้เพาะเชื้อแบคทีเรีย (a) เทียบกับการเจริญของเส้นใยของเชื้อราด้านที่เพาะเชื้อแบคทีเรีย (b) เป็นมิลลิเมตร แล้วคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งโดยใช้สูตรตามสมการ % inhibition = {(a) – (b) / (a)} x 100 (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 การวัดการเจริญของเส้นใยของเชื้อราในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราที่ 48 ชั่วโมง (ซ้าย) และ 18 ชั่วโมง (ขวา)

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของแบคทีเรีย

3.4.1 อุณหภูมิ

เลือกแบคทีเรียที่มีผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดมาเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ culture broth ที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน flask ขนาด 150 มิลลิลิตรที่มี NB อยู่ 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30, 37, 45, 55, 70 และ 80 องศาเซลเซียสตามลำดับเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ culture broth ที่ได้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออก โดยใช้ความเร็ว 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบการยับยั้งเชื้อรา ตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยการบันทึกรัศมีการเจริญของเชื้อราในแต่ละไอโซเลทของแบคทีเรีย ทำการทดลอง ไอโซเลท ละ 3 ซ้ำ

3.4.2 ค่าความเป็นกรดด่าง

นำ culture broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ขนาด 150 มิลลิลิตร ที่มี NB อยู่ 25 มิลลิลิตรโดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหาร NB ให้มีค่าเท่ากับ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง culture broth ที่ได้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออก โดยใช้ความเร็ว 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบการยับยั้งเชื้อรา ตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยการบันทึกรัศมีการเจริญของเชื้อราในแต่ละไอโซเลท ของแบคทีเรีย ทำการทดลอง ไอโซเลท ละ 3 ซ้ำ

3.5 การสกัดสารยับยั้งเชื้อราจากแบคทีเรีย โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่บนอาหาร NA ที่เตรียมไว้โดยเลี้ยงเชื้อให้เต็มพื้นที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ นำจานอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไว้มาขูดเชื้อแบคทีเรียออก จากนั้นใช้มีดซอยชิ้นวุ้นที่เหลืออยู่ให้ละเอียด แบ่งใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ให้มีปริมาณเท่า ๆ กัน เติม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7 (0.144% Na_2HPO_4 : 0.024 % KH_2PO_4) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปใน centrifuge tube เขย่าโดยใช้เครื่องเวอร์เท็กซ์ มิกเซอร์ ให้สารในอาหารวุ้นออกมาละลายในบัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกวุ้นออกจากสารสกัดโดยใช้ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำ supernatant หรือ สารสกัดที่ได้ไปกรองเอาเชื้อแบคทีเรียที่เหลือออก โดยใช้แผ่นกรองที่ปราศจากเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร (1-2 มิลลิลิตร) เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 การทดสอบความเสถียรของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย

3.6.1 ค่าความเป็นกรดด่าง

เตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปรับให้มี ค่า pH ให้เท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 นำไปสกัดสารละลายจากอาหารวุ้นแข็งตามวิธีในข้อ 3.5 นำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยเทคนิค agar spot methodโดยใช้ปริมาณสารสกัดในการหยดแต่ละครั้งเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ทำการทดลอง ไอโซเลทละ 3 ซ้ำ

3.6.2 อุณหภูมิ

แบ่งสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย 150 ไมโครลิตรใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้พาราฟิล์มปิดเพื่อไม่ให้เกิดการระเหยออกไป นำไปให้ความร้อนด้วย water bath ที่ อุณหภูมิ 37, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยเทคนิค agar spot method ใช้ปริมาณสารสกัดในการหยดแต่ละครั้งเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.3 Autoclave (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที)

แบ่งสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย 150 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรใช้พาราฟิล์มพันบริเวณฝาปิดเพื่อไม่ให้เกิดการระเหยออกไป นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ใช้ปริมาณสารสกัดในการหยดแต่ละครั้งเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.4 เอนไซม์ proteinase K

การทดสอบนี้ใช้เอนไซม์ proteinase K มาทำการทดสอบ โดยเตรียม stock เอนไซม์ proteinase K ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย 95 ไมโครลิตรใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ proteinase K จาก stock ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร (ให้ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ใช้ปริมาณสารสกัดในการหยดแต่ละครั้งเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.5 รังสีอัลตราไวโอเลต

การทดสอบนี้ใช้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยให้สารสกัดได้รับแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยให้มีระยะห่างจากต้นกำเนิดแสงประมาณ 15-20 เซนติเมตร จากนั้นนำสารสกัดไปทดสอบกับเชื้อรา ใช้ปริมาณสารสกัดในการหยดแต่ละครั้งเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.7 การตรวจสอบสารสกัดจากแบคทีเรียด้วยวิธี Gas Chromatography – Mass spectrometry (GC-MS)

ตรวจสอบสารสกัดจากแบคทีเรียด้วยเครื่องมือ GC (Agilant Technologies 6890N Network GC system) ซึ่งต่ออยู่กับเครื่อง MS (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector) โดยมีสภาวะการทดลอง ดังนี้ เครื่อง GC ใช้คาปิลลารีคอลัมน์ HP-5MS ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร และความหนาของฟิล์มเท่ากับ 0.25 ไมโครเมตร (Agilent 19091S-433) อุณหภูมิเริ่มต้นที่ช่องปล่อยสาร 250 องศาเซลเซียส ในระบบสปลิทเลสโหมด อุณหภูมิเริ่มต้นของโอเว่นเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และค่อยๆเพิ่มขึ้นเป็น 230 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพาที่อัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อนาที ความดัน 8.81 psi จำแนกองค์ประกอบของสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับสเปกตราในฐานข้อมูล National Institute of Standards and Technology (NIST) Library Rev.D.03.00

3.8 การบ่งชี้ชนิดแบคทีเรีย

3.8.1 การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

ตรวจสอบรูปร่าง ลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ตลอดจนขนาด รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยการย้อมสีแกรม ตรวจสอบการมีหรือไม่มีเอนโดสปอร์ และตำแหน่งของเอนโดสปอร์ โดยการย้อมสีสปอร์ ตรวจสอบการมีหรือไม่มีแคปซูลโดยวิธี wet Indian-ink film

3.8.2 การตรวจสอบทางชีวเคมี

ตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาตาเลส การย่อยแป้ง การใช้ซิเตรท การสร้างอินโดล การเจริญบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 7.5% การสร้างกรดจากน้ำตาล 4 ชนิด คือ กลูโคส แมนนิทอล ไซโลส และอาราบิโนส

3.8.3 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้ API50 CHB/E kits

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 – 20 ชั่วโมง เก็บเชื้อไปทดสอบโดยใช้สำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อกวาดเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหน้าอาหาร นำไปเขย่าในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารแขวนลอยเชื้อลงใน API 50 CHB/E medium โดยปรับให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ 2 แมคฟาร์แลน จากนั้นจึงนำไปหยอดลงใน API50 CH strip บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อ่านผลการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ 2 ครั้งที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แปรผลการทดสอบเทียบกับตารางของ API50 CHB/E kits

3.8.4 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้ 16S rRNA sequence analysis

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 3 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง นำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 14,000 rpm 3 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติม STE buffer 450 ไมโครลิตร (100 มิลลิโมล โซเดียมคลอไรด์, 1 มิลลิโมล อีดีทีเอ pH 8, 10 มิลลิโมล ทริส pH7.5) และ เอนไซม์ lysozyme (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม เอนไซม์ proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร และ 20% เอสดีเอส 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มอีกครั้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลลาร์ ปริมาตร 70 ไมโครลิตร และ คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 630 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อให้โปรตีนที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ตกตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 14,000 rpm 10 นาที ถ่ายเอาสารละลายที่มี จีโนมิคดีเอ็นเอไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วจึงเติมไอโซโพรพานอลไปในปริมาณหนึ่งเท่าตัวผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 rpm 5 นาที จากนั้นจึงเทน้ำด้านบนทิ้งไป จะได้ ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่อัดแน่นที่ก้นหลอด เติมเอทานอลที่แช่ไว้ที่อุณหภูมิเยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส) ลงไป 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 14000 rpm 5 นาที เทเอทานอลทิ้งไป ปล่อยให้แห้ง ประมาณ 10 - 15 นาที จนเห็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นสีขาว เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 50 ไมโครลิตร เก็บรักษา DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

การทำ 16S rRNA sequencing ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.สยาม ภพลือชัย สำหรับ primer ที่ใช้ในการ amplified 16S rRNA genes คือ pA (8F) (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′) และ pH′(1542R) (5′-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3′) (Edwards *et al.*, 1989; Pantos *et al.*, 2003) เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับ 16S rRNA genes sequences ในฐานข้อมูลของ GenBank และ EMBL โดยใช้เครื่องมือ Basic Local Alignment Search Tool หรือ BLAST search และวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียจากการทำ phylogenetic dendrogram

บทที่ 4 การคัดกรองจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae*

4.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ของแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่า ดินบริเวณรากพืชสมุนไพร และผิวของผลลำไย

จากการทดสอบแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างทั้งสามแหล่งด้วยเทคนิค dual culture test รวมทั้งหมด 284 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรียจากถั่วเน่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้จำนวน 39 ไอโซเลท (22.94%) โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ TN11 สามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 67 ซึ่งเป็นค่าสูงที่สุด สำหรับแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้จำนวน 2 ไอโซเลท (1.8%) โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ RS5 สามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 50 และแบคทีเรียที่แยกจากผิวของผลลำไย พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 2 ไอโซเลท (66.67%) โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ CMU2 สามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 50 (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากแบคทีเรียทั้งสามแหล่งในการทดสอบขั้นต้น

แหล่งที่มา	จำนวนเชื้อทั้งหมด (ไอโซเลท)	จำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ไอโซเลท)	การยับยั้งการเจริญ [a] (%)
ถั่วเน่า	170	39 (22.94%)	25.0 - 67.5
ดินบริเวณรากพืชสมุนไพร	111	2 (1.8%)	45.0 - 50.0
ผิวเปลือกของลำไย	3	2 (66.67%)	45.9 - 50.0

หมายเหตุ: [a] ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เป็นร้อยละจากค่าต่ำสุดถึงสูงสุด

จากผลการทดสอบขั้นต้น ผู้วิจัยได้นำแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* จำนวนทั้งหมด 43 ไอโซเลท มาทดสอบอีกครั้ง แต่เปลี่ยนจากการใช้เชื้อมาใช้น้ำเลี้ยงเชื้อแทน โดยเตรียมแบคทีเรียทดสอบในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออก โดยใช้ความเร็วรอบ 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบการยับยั้งเชื้อรา บันทึกผลการเจริญของเส้นใยของเชื้อราแล้วคำนวณหาร้อยละของการยับยั้ง

อย่างไรก็ตาม การทดสอบด้วยวิธีนี้ไม่สามารถกำจัดเซลล์ของแบคทีเรียให้หมดไปได้ ดังจะเห็นได้จากการปรากฏของโคโลนีแบคทีเรียภายหลังการบ่มเชื้อ จากการทดลอง พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้จำนวน 36 ไอโซเลท โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ TN79 สามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 52.00 ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลท TN5, TN9 และ TN59 ไม่สามารถยับยั้ง

การเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ แบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชสมุนไพรยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทั้ง 2 ไอโซเลท โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ RS5 สามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 52.40 ซึ่งเป็นค่าการยับยั้งที่สูงที่สุดเมื่อเปลี่ยนมาใช้ น้ำเลี้ยงเชื้อ และแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวของผลลำไย พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทั้ง 2 ไอโซเลท แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลง โดยเฉพาะ CMU3 ประสิทธิภาพลดลงมากโดยเหลือเพียงร้อยละ 1.30 เท่านั้น (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL เป็นร้อยละโดยใช้เซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่แยกได้จาก ถั่วเน่า ดิน และผิวของผลลำไยโดยวิธี dual culture test จากแบคทีเรียที่คัดเลือกมาแล้วจากการทดสอบขั้นต้น 43 ไอโซเลท

สายพันธุ์แบคทีเรีย [a]	ร้อยละของการยับยั้ง (น้ำเลี้ยงเชื้อ) [c]	ร้อยละของการยับยั้ง (เซลล์) [b]
RS5	**52.4 ***	50.0
TN112	52.0	40.0
TN79	**52.0 ***	60.0
TN117	51.2	37.5
TN142	49.4	27.5
TN133	47.6	60.0
TN3	46.2	45.0
TN2	45.7	32.5
TN119	45.3	30.0
TN129	44.0	25.7
TN188	44.0	37.5
TN107	43.9	25.0
TN6	42.7	37.5
CMU2	**42.4 ***	50.0
TN5	41.0	50.0
TN9	41.0	27.5
TN92	41.0	45.0
TN59	40.0	37.5
TN153	38.7	27.5
TN147	38.3	27.5
TN130	37.2	37.1
TN168	36.1	50.0
RS3	35.7	45.0

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL เป็นร้อยละโดยใช้เซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่แยกได้จาก ถั่วเน่า ดิน และผิวของผลลำไยโดยวิธี dual culture test จากแบคทีเรียที่คัดเลือกมาแล้วจากการทดสอบขั้นต้น 43 ไอโซเลท (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย [a]	ร้อยละของการยับยั้ง (น้ำเลี้ยงเชื้อ) [c]	ร้อยละของการยับยั้ง (เซลล์) [b]
TN68	34.7	50.0
TN125	34.6	55.0
TN121	33.3	30.0
TN16	33.3	45.0
TN101	30.8	30.0
TN28	29.6	50.0
TN134	28.0	48.6
TN8	28.0	32.5
TN11	26.9	67.5
TN114	26.7	27.5
TN149	21.3	48.6
TN126	20.3	37.5
TN141	20.3	30.0
TN148	17.9	45.0
TN144	17.3	30.0
TN122	7.2	42.9
CMU3	1.3	45.9
TN103	0.0	37.5
TN25	0.0	30.0
TN90	0.0	37.5

หมายเหตุ [a] TN หมายถึง เชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่า
RS หมายถึง เชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพืชสมุนไพร
CMU หมายถึง เชื้อแบคทีเรียจากผิวของผลลำไย

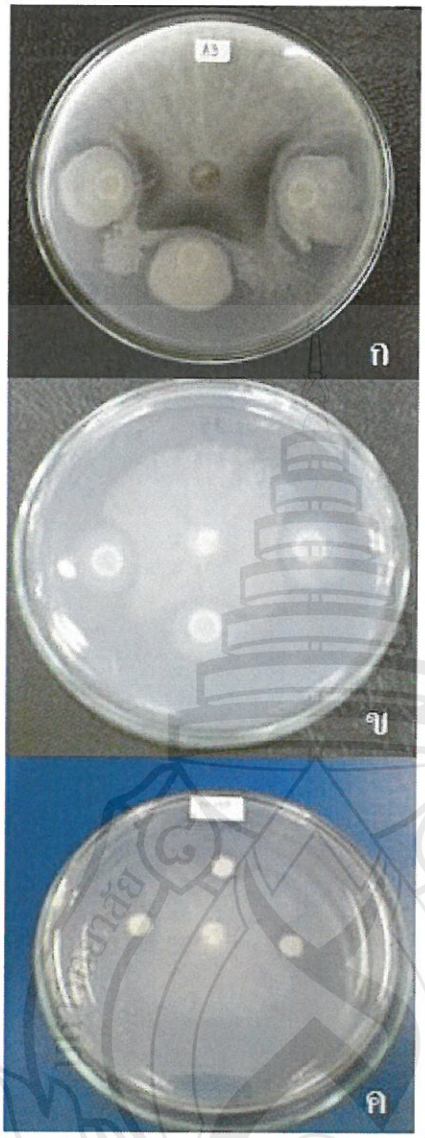
[b] ร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราโดยใช้เซลล์แบคทีเรีย

[c] ร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ

• ค่าการยับยั้งสูงสุดของแบคทีเรียตัวแทนจากถั่วเน่า ดินจากรากพืช และ ผิวของผล ลำไย

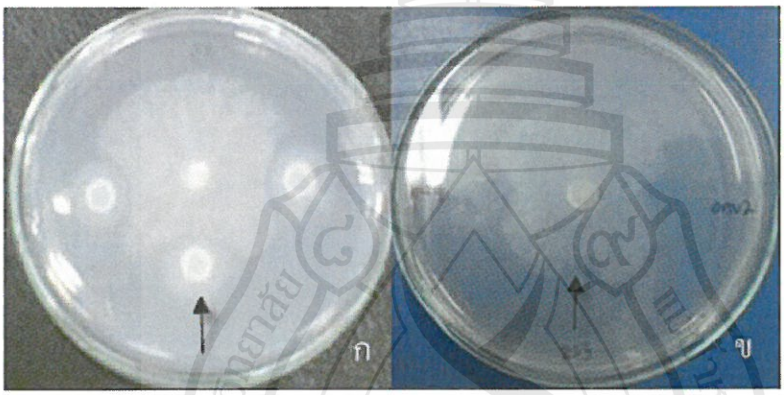
นอกจากนี้การทดสอบโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียหลงเหลืออยู่ (ภาพที่ 4.1 ก) จึงได้ทดสอบซ้ำด้วยเทคนิค paper disc diffusion โดยแบ่งเป็นสามการทดลอง ได้แก่ หนึ่งใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออก สองใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที และ สามใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตรเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่เหลืออยู่ให้หมด ผลการทดลองพบว่า paper disc diffusion ที่ใช้ น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปั่นแยกเซลล์ออกยังคงพบการเจริญของเซลล์แบคทีเรียอยู่และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ได้ แต่ในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการต้มให้เดือดจะพบการเจริญของเซลล์บ้างเล็กน้อย และพบว่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเกิดขึ้นได้เฉพาะใน disc ที่ยังคงมีเชื้อแบคทีเรียหลงเหลืออยู่เท่านั้น ในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียโดยการกรอง พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ได้โดยสิ้นเชิง ดังนั้นในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราจึงไม่สามารถใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้ (ภาพที่ 4.1)

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจะเห็นได้ว่าการยับยั้งเกิดจากเซลล์แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง จึงคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราที่สูงสุดที่มาจากแต่ละแหล่งคือ TN79 จากถั่วเน่า RS5 จากดินและ CMU2 จากผิวของผลลำไย (ตาราง 4.2) เนื่องจากมีความแข็งแรงและสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้แม้ว่าจะมีจำนวนเซลล์น้อยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและสกัดสารยับยั้งเชื้อราออกมา (ภาพที่ 4.2) เมื่อนำสารสกัดหยาบมาทดสอบพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ และไม่พบว่ามีเซลล์ของแบคทีเรียเจริญอยู่แต่อย่างใด บริเวณจุดที่หยดสารสกัดจากแบคทีเรียลงไปจะเห็นได้ว่าเส้นใยของเชื้อรามีการเว้าอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าเป็นสารที่แบคทีเรียปล่อยออกมาในอาหารวุ้นแข็ง หรือกล่าวได้ว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง extracellular metabolites มายับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ได้จริง สารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ CMU2 สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 37.68 รองลงมาคือ TN79 ยับยั้งได้ร้อยละ 34.78 และ RS5 สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 31.82 (ภาพที่ 4.3 ข) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อบ่มต่อไปเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เส้นใยของเชื้อราก็จะมีการเจริญทับอาหารวุ้นบริเวณที่หยดสารสกัดไปได้ โดยที่บริเวณที่เส้นใยของเชื้อราสัมผัสกับสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียเส้นใยจะมีการเปลี่ยนสีเป็นสีดำเห็นได้อย่างชัดเจน



ภาพที่ 4.1 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *L. theobromae* CMUL เมื่อทดสอบกับ (ก) เซลล์แบคทีเรีย (ข) เมื่อใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ และ (ค) เมื่อใช้น้ำเลี้ยงเชื้อหยดลงใน paper disc

ภาพที่ 4.2 (ก) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อการสกัดสารยับยั้งเชื้อราบนอาหารวุ้นแข็งNA (ข) อาหารวุ้นซอยจนละเอียดก่อนนำไปสกัดสารยับยั้งเชื้อรา



ภาพที่ 4.3 (ก) การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อพบการเจริญของเชื้อ แบคทีเรีย (ข) การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยสารสกัดจากอาหารวุ้นแข็ง ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

4.2 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ต่างสายพันธุ์

จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียTN79, RS5 และ CMU2 กับเชื้อรา *L. theobromae* CMUL แล้วยังได้ทำการทดสอบกับเชื้อรา *L. theobromae* อีกสี่สายพันธุ์คือ LP1, LP2, LG2 จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ type strain 1120 จากกรมวิชาการเกษตร โดยเชื้อราสายพันธุ์ LP1, LP2, LG2 มีการเจริญบนอาหาร PDA ไม่แตกต่างกันกล่าวคือเส้นใยมีลักษณะฟูขาวเมื่อ มีการเจริญออกเป็นรัศมีสม่ำเสมอเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราวางไว้ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 - 3 วันเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ 1120 มีการเจริญจากจุดกึ่งกลางออกไปเป็นรัศมีไม่ค่อยสม่ำเสมอ และ เจริญช้ากว่าอีกสามสายพันธุ์ ใช้เวลามากกว่า 48 ชั่วโมงจึงจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 - 2 วันเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีดำเช่นกันและมีการสร้างรงควัตถุสีแดงมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ จากการทดสอบโดยใช้

เซลล์ของแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งหมดได้ มีร้อยละของการยับยั้งอยู่ระหว่าง 40.00 - 52.17 (ตารางที่ 4.3) ส่วนการใช้สารสกัดจากแบคทีเรียพบว่ายังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสี่สายพันธุ์ได้ แต่ประสิทธิภาพของการยับยั้งลดลงเหลืออยู่ระหว่างร้อยละ 17.39 - 34.78 (ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.4)

ตารางที่ 4.3 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธ์ต่างๆ ด้วยเซลล์ของแบคทีเรีย

สายพันธุ์แบคทีเรีย	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์ต่างๆ (%)			
	LP1	LP2	LG2	1120
TN79	40.00 ± 0.00	50.00 ± 0.00	47.83 ± 0.00	52.17 ± 0.00
RS5	45.00 ± 0.00	52.17 ± 0.00	47.83 ± 0.00	52.17 ± 0.00
CMU2	40.00 ± 1.00	39.13 ± 1.00	47.83 ±1.73	52.17 ± 0.00

ตารางที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธ์ต่างๆ ด้วยสารสกัดจากแบคทีเรีย

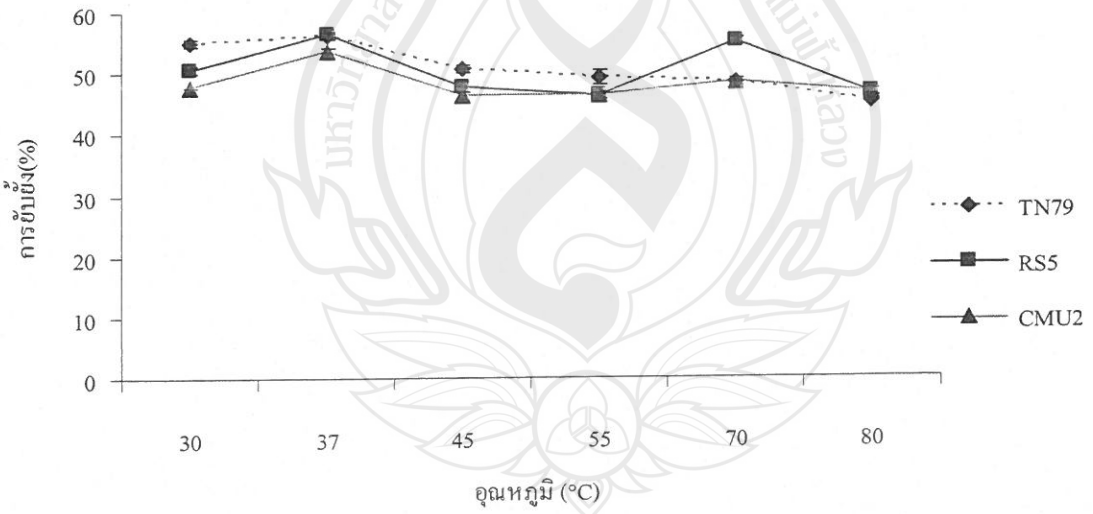
สายพันธุ์แบคทีเรีย	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์ต่างๆ (%)			
	LP1	LP2	LG2	1120
TN79	17.39 ± 0.50	26.09 ± 0.00	34.78 ± 0.00	12.50 ± 0.00
RS5	26.09 ± 0.00	26.09 ± 0.00	26.09 ± 0.00	12.50 ± 0.00
CMU2	26.09 ± 0.00	30.43 ± 1.00	17.39 ± 0.00	33.33 ± 0.00

ภาพที่ 4.4 (ก) การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 1120 ด้วยเซลล์ของแบคทีเรียยับยั้งได้สูงสุดที่ร้อยละ 52.17 (ข) การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา LG2 ด้วยสารสกัดจากแบคทีเรีย TN79 ยับยั้งได้สูงสุดที่ร้อยละ 34.78

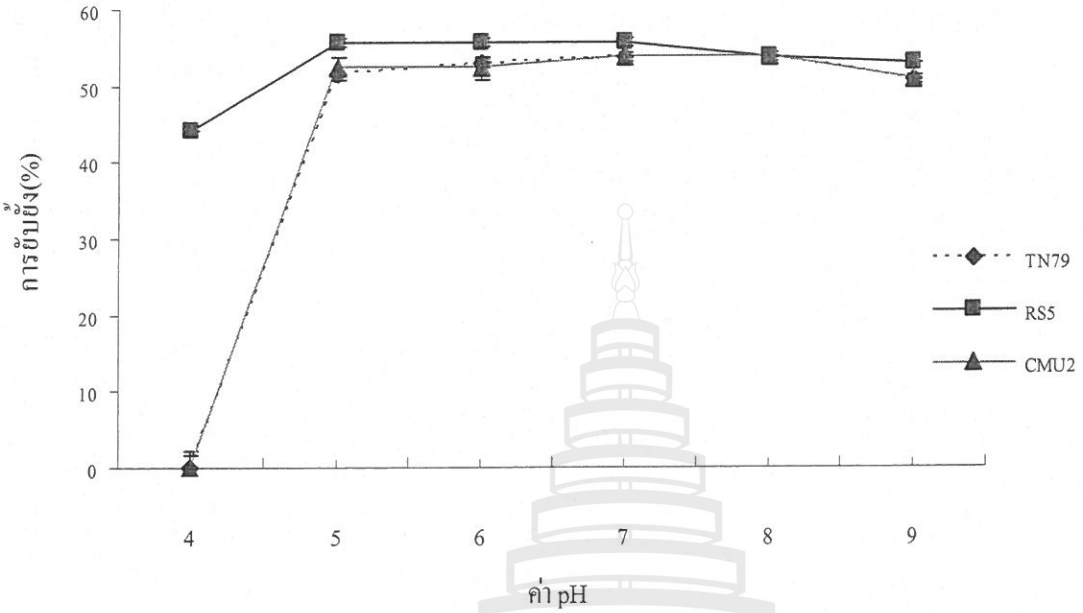
4.3 ความสามารถในการผลิตสารของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างต่างๆกัน

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสูงที่สุดของแต่ละแหล่งที่มา คือ TN79, RS5 และ CMU2 มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร25 มิลลิลิตรบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเชื้อแบคทีเรียจากดินรากพืชสมุนไพร RS5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากที่สุดคือ ร้อยละ 56.52 เชื้อแบคทีเรียยังสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างและยังคงประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ (ภาพที่ 4.5)

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงที่สภาวะความเป็นกรดด่างต่างๆกันในอาหาร NB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 4 - 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 5 - 9 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ไม่ต่างกันมากนัก แต่จะดีที่สุดในช่วง pH 7 -8 แต่อย่างไรก็ตาม ที่ค่า pH 4 มีเฉพาะแบคทีเรียไอโซเลท RS5 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.5 ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นร้อยละเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวช่วงอุณหภูมิที่ต่างกัน



ภาพที่ 4.6 ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นร้อยละ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่มีค่าความเป็นกรดด่างในช่วง pH 4 - 9

4.4 อภิปรายผล

เชื้อรา *L. theobromae* เป็นเชื้อราที่โดยมากพบในเขตร้อนและกึ่งร้อน มักจะแยกเชื้อรานี้ได้จากผลไม้ที่มีอาการเน่าเสียและแผลที่เปลือกของต้นไม้ (Richard *et al.*, 2004) เชื้อรานี้สามารถก่อให้เกิดโรคในพืชได้มากกว่า 500 ชนิด (Cedeno *et al.*, 1996) โดยเฉพาะโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของพืชเศรษฐกิจในเขตร้อนและเขตอบอุ่น อาทิ กล้วย (Mortuza and Ilag, 1999; Anthony *et al.*, 2004) มะม่วงและส้ม (Singh, 2000) ทุเรียน (สมศิริ แสงโชติ, 2539) ลิ้นจี่ และลำไย (ประพันธ์ โอสถาพันธุ์ และคณะ, 2544) เป็นต้น การเข้าทำลายผลไม้ของราเป็นแบบแอบแฝงที่เกิดขึ้นได้ทุกขณะ เมื่อมีสภาวะเหมาะสมเชื้อราจะงอกและเข้าทำลาย อาจเกิดในระยะขนส่งหรือเก็บรักษา

การควบคุมเชื้อราก่อโรคนิยมกระทำทั้งในแง่ทางฟิสิกส์ เช่น การควบคุมอุณหภูมิ การฉายรังสี และการใช้สารเคมี สำหรับงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยเลือกที่จะศึกษาการควบคุมด้วยชีววิธี ที่น่าจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีศักยภาพ โดยไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และไม่เป็นอันตรายต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค มีรายงานการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *L. theobromae* เช่น การใช้เชื้อรา *Trichoderma viride* ในการควบคุมโรคขั้วหวีเน่าในกล้วย สามารถลดการเกิดโรคได้ถึงร้อยละ 29.07 - 65.06 เมื่อปลูกเชื้อรา *T. viride* บนผลกล้วยก่อนเชื้อรา *L. theobromae* เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Mortuza and Ilag, 1999) การใช้เชื้อแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CM1 และ CM3 ที่แยกได้จาก Cowdung สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกัน

บนอาหาร PDA (Swain and Ray, 2006) และในประเทศไทย มีรายงานการใช้เชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* มาควบคุมโรคขั้วหวีเน่า พบว่า สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ถึงร้อยละ 82.7 เมื่อใส่เชื้อยีสต์ก่อนปลูกราเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สมศิริ แสงโชติ และ สุมิตรา แสงวนิชย์, 2548) จะเห็นได้ว่ามีความพยายามในการคัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติมาทดสอบการยับยั้งการเจริญและควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* มาบ้างแล้ว แต่เป็นการใช้สปอร์ของเชื้อรา เซลล์ของแบคทีเรีย และยีสต์โดยตรง ส่วนการใช้สารสกัดจากจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรานั้น มีรายงานว่าการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ หรือ สารกรอง (culture filtrate) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ เชื้อยีสต์ที่มีชีวิตเท่านั้นที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (สุมิตรา, 2547) ในรายงานของ Swain and Ray (2006) กล่าวว่า *Bacillus subtilis* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้อย่างสมบูรณ์ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นเพราะสามารถเจริญได้รวดเร็วกว่าเชื้อรา มีความสามารถในการแย่งอาหารและพื้นที่ในการเจริญได้มากกว่าการปล่อย secondary metabolite มายับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังนั้นการใช้เชื้อ *B. subtilis* มาควบคุมเชื้อรา *L. theobromae* จึงใช้วิธีจุ่มผลไม้ลงใน cell suspension (Singh, 2000) แทนการใช้สารสกัดจากแบคทีเรีย ในการทดลองนี้เราจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติที่ สามารถสร้าง extracellular metabolites และสกัดออกมาเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ เพื่อให้เป็นแนวทางในการควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติ จากสามแหล่ง คือ ถั่วเน่า ดินบริเวณรากพืชสมุนไพร และผิวของผลลำไย โดยการคัดเลือกจุลินทรีย์จากถั่วเน่า เนื่องจากถั่วเน่าเป็นอาหารที่เกิดจากการหมักถั่วเหลือง โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในตระกูล *Bacillus* ซึ่งนับได้ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สูงและครอบคลุมเป็นวงกว้าง ส่วนการแยกคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวของผลลำไยนั้นก็เป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่า จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชสุขภาพดีเป็นจุลินทรีย์เจ้าถิ่น สามารถเจริญได้บนผิวของผลไม้อยู่แล้ว จึงคาดว่าจุลินทรีย์นั้น ๆ จะมีคุณสมบัติการควบคุมโรคได้ดี และสำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินบริเวณรากพืชสมุนไพรนั้น เนื่องจากเป็นแหล่งรวมของแร่ธาตุ และสารอาหารที่จากการย่อยสลายของชิ้นส่วนของพืช โดยคาดว่าเป็นแหล่งที่มีจุลินทรีย์อุดมสมบูรณ์ มีความหลากหลายสูง นอกจากนี้การได้รับสารอาหารบางอย่างจากพืชยังอาจทำให้จุลินทรีย์นั้น ๆ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชมากขึ้นด้วย (Noveriza and Quimio, 2004)

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* พบว่าแบคทีเรียจากทั้งสามแหล่ง สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ดีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเฉพาะแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่าสามารถยับยั้งการเจริญได้ถึง 39 ไอโซเลท ในขั้นตอนของการทดสอบขั้นต้นจะใช้การ spot เชื้อแบคทีเรียโดยตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบมีจำนวนมาก เมื่อใช้เทคนิคนี้สามารถทำให้การทดสอบเป็นไปได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว แต่ไม่สามารถควบคุมปริมาณของเชื้อตั้งต้นได้ นอกจากนี้อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทยังมีความช้าเร็วต่างกัน ซึ่งเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่เจริญได้อย่างรวดเร็วอาจจะเกิดการเจริญแบบแข่งขันแย่งสารอาหารกับเชื้อรา ทำให้เชื้อราซึ่งเจริญได้ช้ากว่าไม่สามารถเจริญได้และทำให้ผลการคัดเลือกเป็นบวก ดังนั้นเมื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราในขั้นแรกได้แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเหลว NB และใช้น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมาทำการทดสอบแทนโดยคาดว่า เชื้อแบคทีเรียจะสร้างสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ในอาหารเหลว

และปล่อยสารยับยั้งเชื้อราที่สร้างออกมานอกเซลล์ละลายอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ และเมื่อแยกน้ำเลี้ยงเชื้อออกมาทดสอบจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ แต่จากการทดลองพบว่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรานั้นจะเกิดขึ้นได้ต่อเมื่อมีการเจริญของโคโลนีของแบคทีเรียร่วมด้วย เมื่อทำการทดสอบโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองทำให้ปราศจากเซลล์และสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้โดยสิ้นเชิง แสดงให้เห็นว่าการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรานั้นไม่สามารถสร้างได้เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว เช่นเดียวกับการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์ มาทดสอบกับเชื้อรา *L. theobromae* ในรายงานของสุมิตรา แสงวนิชย์ (2547) ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN 79, RS5 และ CMU2 ที่คัดมาเป็นตัวแทนของเชื้อแบคทีเรียของแต่ละแหล่งที่มายังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* อื่น ๆ นอกจากสายพันธุ์ CMUL ได้อีกสี่สายพันธุ์คือ LP1, LP2, LG2 และ type strain 1120 แสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งได้หลาย ๆ สายพันธุ์ที่ได้มาจากแหล่งต่างกัน

นอกจากนี้ในการทดสอบด้วยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง และค่าความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ยังพบว่าแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลท มีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงถึง 80 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างได้ตั้งแต่ pH 5 - 9 อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทคือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH 6 - 7 เพราะในช่วงอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกันนั้นมีจะผลต่อการเจริญและการผลิตสาร secondary metabolite ของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่นเชื้อ *B. subtilis* จะสามารถผลิต biosurfactant ได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในช่วง pH 4.5 - 10.5 (Makkar and Cameotra, 1999) การเพาะเลี้ยงในช่วงอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะช่วยให้แบคทีเรียผลิตสารที่ต้องการในปริมาณมาก และสามารถที่จะพัฒนาเพื่อใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อผลิตสารที่ใช้ควบคุมเชื้อรา *L. theobromae* ได้

เนื่องจากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* แบบ dual culture test บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งเป็นอาหารแข็งในขั้นตอนของการทดสอบขั้นต้น พบว่าเมื่อเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญก็จะปล่อยสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราออกมาได้โดยเส้นใยของเชื้อราที่สัมผัสกับสารนั้นๆจะไม่เจริญต่อและเปลี่ยนเป็นสีดำ จากการสังเกตพบว่ามีบริเวณใสหรือ clear zone เกิดขึ้นระหว่างเส้นใยของเชื้อราที่ถูกยับยั้งการเจริญ และโคโลนีของแบคทีเรียแสดงให้เห็นว่าไม่ใช่ส่วนของเส้นใยที่สัมผัสกับตัวเซลล์ของแบคทีเรียโดยตรง แต่เป็นสารที่แบคทีเรียสร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular metabolites) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ กล่าวคือสภาวะของอาหาร หรือ physical stage of culture medium มีผลโดยตรงต่อการสร้าง secondary metabolite ของเชื้อแบคทีเรีย ความแตกต่างนี้รวมไปถึงอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรีย การเกาะติดบนผิวหน้าอาหารของโคโลนี องค์ประกอบทางด้านชีวเคมีของตัวเชื้อแบคทีเรีย การปรับเปลี่ยนการแสดงออกของยีน (modification of gene expression) และรวมถึงสาร metabolite ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมาด้วย (Lorian, 1989; Holo *et al.*, 2002) ตัวอย่างของเซลล์ที่มีรูปร่างผิดปกติเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสภาวะต่างกันก็คือเชื้อ *Escherichia coli* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและลดอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงลง จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างผิดปกติมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง คุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดก็จะให้ผลต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกันในสภาวะที่แตกต่างกันเช่น สารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus (Enterococcus) feacalis* สามารถจะยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Neisseria gonorrhoeae* ที่

เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Lorian, 1989) ทางด้านความสามารถในการเจริญก็พบความแตกต่างเช่น แบคทีเรีย *Pneumococcus* spp. ที่แยกได้จากเลือดที่ติดเชื้อและมีอัตราการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ พบว่ายังสามารถมีชีวิตรอดและแบ่งตัวเพิ่มขึ้นได้ในอาหารแข็งเมื่อแยกเชื้อมาในขั้นแรกแต่ไม่สามารถเจริญได้เลยเมื่อเพาะเชื้อที่ได้จากเลือดโดยตรงในอาหารเหลว (Gillespie, 1913) และด้านการผลิตสาร metabolite ก็พบว่ามีความแตกต่างเช่นเชื้อแบคทีเรีย *Pneumococcus* และเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* บางชนิด สามารถผลิตสาร beta-hemolysis ได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเท่านั้น (Lorian, 1989)

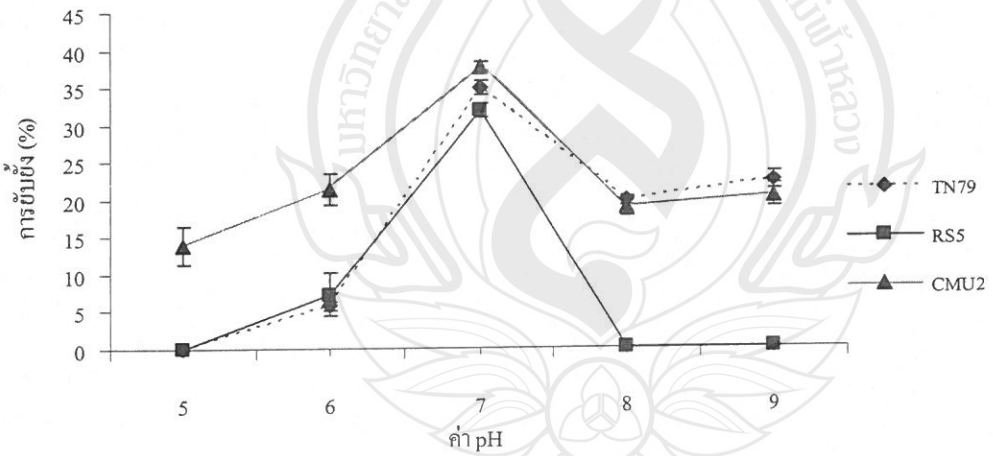
นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอีกสองประการที่มีความเป็นไปได้ คือความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียและการสะสมเพิ่มพูนของสารยับยั้งเชื้อรา เช่น ความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย *Pneumococcus* spp. ในการทดลองของ Gillespie เหตุผลว่าอาจเป็นเพราะการเจริญของ *Pneumococcus* spp. ที่แยกมาจากเลือดในเบื้องต้นจำเป็นจะต้องได้รับสารบางอย่างที่แต่ละเซลล์ผลิตออกมาและช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ใกล้ชิดกัน ดังนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งจึงมีอัตราการรอดชีวิตและแบ่งเซลล์เพิ่มได้มากกว่า ส่วนในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเซลล์มีความหนาแน่นต่ำและสารที่ผลิตออกมาไม่สามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์อื่นๆได้จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (Gillespie, 1913) ในการทดลองนี้ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน เพราะเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทในอาหารเหลวสารยับยั้งเชื้อราที่แบคทีเรียสร้างขึ้นอาจเจือจางลงและสูญเสียไปในระหว่างการบ่มได้ อีกประการหนึ่งคือเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารวุ้นแข็ง จะมีการสะสมสารยับยั้งเชื้อราไว้เป็นจำนวนมาก เนื่องจากการจะซึมผ่านอาหารวุ้นแข็งนั้นเป็นไปได้ช้าทำให้ สารยับยั้งเชื้อรา มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมาก (Lorian, 1989) จนเพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ ดังนั้นการสกัดสารยับยั้งเชื้อราดังกล่าวจึงต้องสกัดจากอาหารวุ้นแข็งเท่านั้น (Holo *et al.*, 2002) และสารสกัดจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลท ก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สายพันธุ์ CMUL, LP1, LP2, LG2 และ type strain 1120 ได้ ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจะลดลงน้อยกว่าการใช้เซลล์ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของสารยับยั้งเชื้อราได้ถูกเจือจางลงไปด้วยหลังถูกสกัดออกมาจากอาหารวุ้นแข็ง

บทที่ 5 การทดสอบความเสถียรและการตรวจสอบชนิดของสารสกัดจากแบคทีเรีย

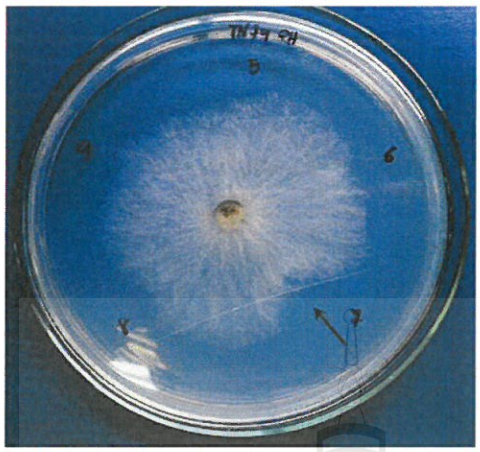
5.1 การทดสอบความเสถียรของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย

5.1.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* เมื่อใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่าง ๆ กัน

จากการสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากแบคทีเรีย TN79, RS5 และ CMU2 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 5, 6, 7 ,8 และ 9 เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL พบว่าสารสกัดหยาบจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ดีที่สุด (ภาพที่ 5.2) โดยสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ร้อยละ 37.68 ไอโซเลทที่ TN79 เท่ากับร้อยละ 34.78 และไอโซเลทที่ RS5 เท่ากับร้อยละ 31.82 (ภาพที่ 5.1) และจะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU 2 สามารถใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 5 - 9 สกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 ไม่สามารถสกัดสารยับยั้งเชื้อราได้ ที่ pH 5 ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 นั้น พบว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ที่ 5, 8 และ 9 สกัดสาร พบว่าไม่สามารถสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้



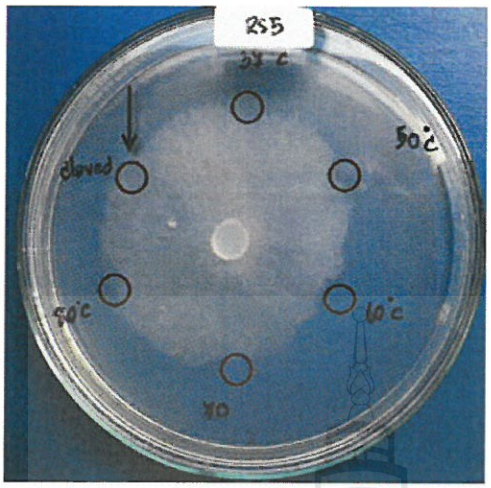
ภาพที่ 5.1 ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเป็นร้อยละ เมื่อสกัดสารจากแบคทีเรียโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 5 - 9



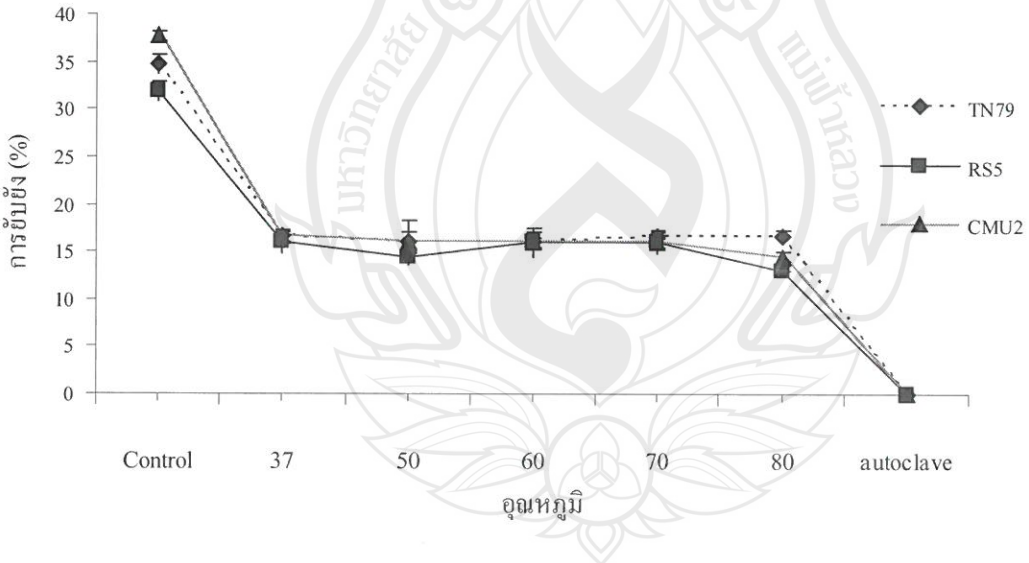
ภาพที่ 5.2 ผลของ pH ของสารสกัดจากแบคทีเรีย TN79 ต่อเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยบริเวณที่ลูกศรชี้คือ ค่า pH เท่ากับ 7 จะเห็นได้ว่ามีการเว้าของเชื้อรามากที่สุด

5.1.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* เมื่อนำสารสกัดหยาบบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ของแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบกับเชื้อรา *L. theobromae* พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราลดลงมาก (ภาพที่ 5.4) เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบที่ไม่ได้ให้ความมาร้อนก่อน แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา ส่วนค่าการยับยั้งเป็นร้อยละในทุกอุณหภูมิที่ได้ทำการทดสอบไม่มีความแตกต่างกันมากนักโดยประสิทธิภาพของการยับยั้งของสารสกัดจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลท อยู่ระหว่างร้อยละ 13.04 - 16.67 ยกเว้นเมื่อนำสารสกัดหยาบไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว พบว่าสูญเสียประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราโดยสิ้นเชิง เห็นได้จากการที่เส้นใยของเชื้อราเมื่อสัมผัสกับสารสกัดหยาบไม่มีการหยุดชะงักการเจริญ (ภาพที่ 5.3)



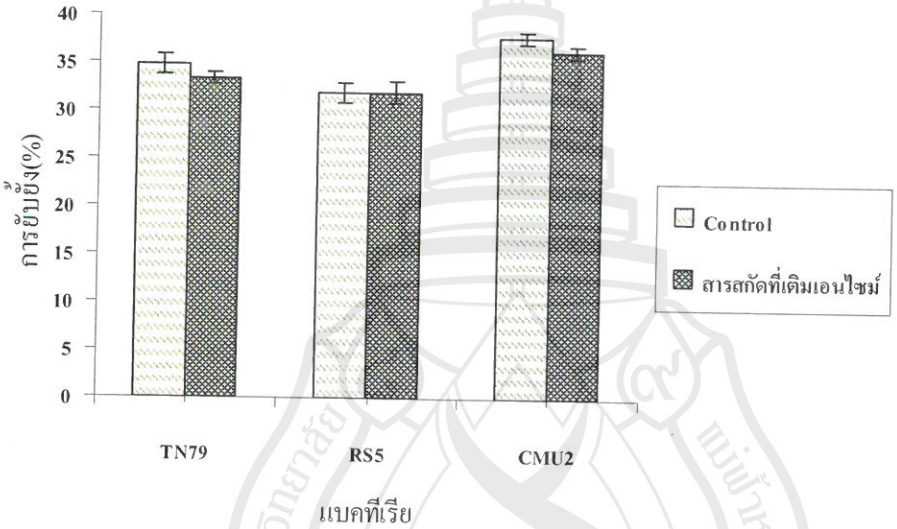
ภาพที่ 5.3 สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 นำไปผ่านความร้อนที่121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราโดยเส้นใยเจริญทับบริเวณที่หยดสาร (วงกลม) ไปโดยไม่มีการหยุดชะงักการเจริญ (บริเวณที่ลูกศรชี้)



ภาพที่ 5.4 ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเป็นร้อยละเมื่อนำสารสกัดจากแบคทีเรีย ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมงเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้นำไปผ่านความร้อน

5.1.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนของสารสกัดหยาบ

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลท ไปเติมเอนไซม์ proteinase K ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* พบว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีน proteinase K ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์ จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นร้อยละไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 5.5) โดยสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 ยังมีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงที่สุดที่ร้อยละ 36.23 (ภาพที่ 5.7 ก) รองลงมาคือแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 ร้อยละ 33.23 และแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 เท่ากับร้อยละ 31.88

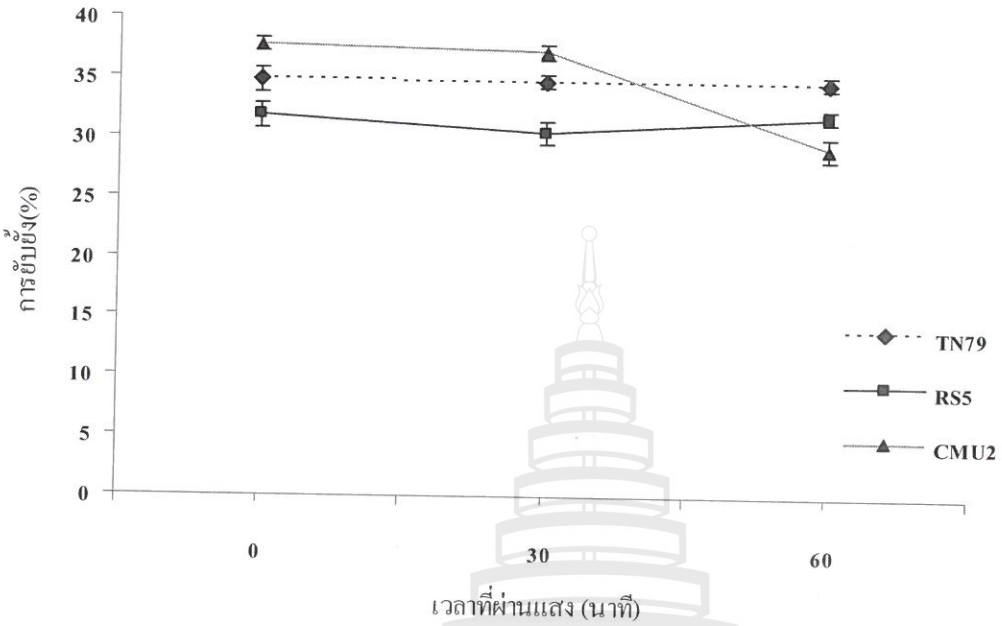


ภาพที่ 5.5 ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเป็นร้อยละ เมื่อเติมเอนไซม์ลงในสารสกัดจากแบคทีเรียเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง

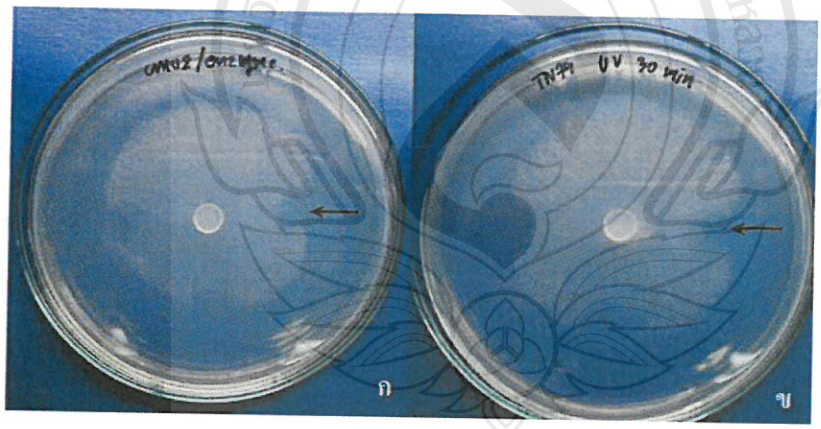
5.1.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลตของสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทไปรับแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วจึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* พบว่าสารสกัดจากแบคทีเรียที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลทเป็นเวลา 30 นาทียังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมโดยสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 ยังมีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงที่สุดที่ร้อยละ 37.18 รองลงมาคือแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 ร้อยละ 34.72 (ภาพที่ 5.7 ข) และแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 เท่ากับร้อยละ 30.43 และสารสกัดที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลทเป็นเวลา 60 นาทียังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ โดยสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่

TN79 ประสิทธิภาพการยับยั้งสูงที่สุดที่ร้อยละ 34.72 รองลงมาคือแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 เท่ากับร้อยละ 31.88 แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 29.17 (ภาพที่ 5.6)

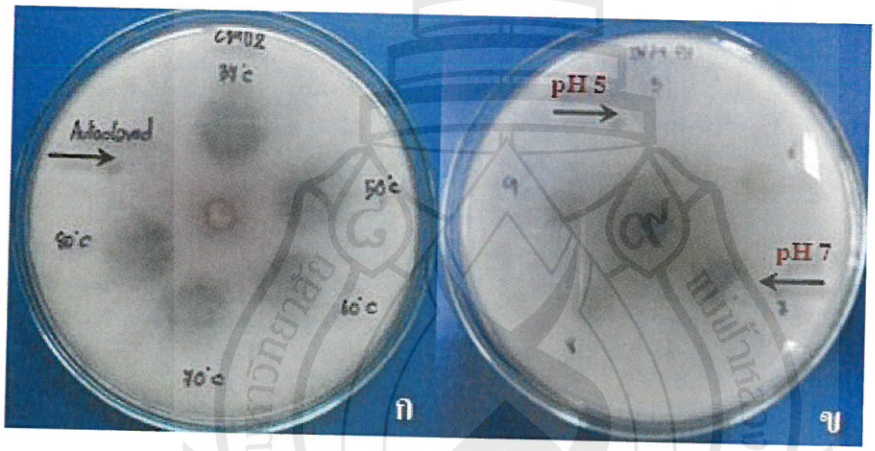


ภาพที่ 5.6 ค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเป็นร้อยละ เมื่อนำสารสกัดจากแบคทีเรีย ไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลาสามสิบนาทีและหนึ่งชั่วโมงเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต



ภาพที่ 5.7 (ก) การเว้าของเส้นใยของเชื้อราเมื่อทดสอบกับสารสกัดจากแบคทีเรีย CMU2 ที่เติมเอนไซม์proteinase K (ข) แสดงให้เห็นการเว้าของเส้นใยของเชื้อราเมื่อทดสอบกับสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย TN79 ที่นำไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 30 นาที

การใช้สารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียจะทำให้เชื้อราหยุดชะงักการเจริญในบริเวณที่สัมผัสกับสารสกัดแต่เมื่อบ่มต่อไปเชื้อราจะสามารถเจริญทับบริเวณที่มีสารสกัดไปได้ แต่สามารถสังเกตได้ว่าสารสกัดจากแบคทีเรียมีผลต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราจริงเมื่อบ่มเชื้อราจนมีอายุ 24 - 48 ชั่วโมงบริเวณที่เส้นใยของเชื้อราสัมผัสกับสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียจะมีการเปลี่ยนสีเป็นสีดำเห็นได้ชัดเจน และบริเวณที่สารสกัดจากแบคทีเรียที่ไม่มีผลต่อการเจริญต่อเส้นใยของเชื้อราเส้นใยของเชื้อราก็จะไม่เปลี่ยนเป็นสีดำเช่นในภาพที่ 5.8 (ก) สารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท CMU2 ที่ผ่านการ autoclave ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้พบว่าเส้นใยบริเวณนั้นไม่มีการเปลี่ยนเป็นสีดำ เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิอื่น ๆ นอกจากนี้ในเกิดสีดำของเส้นใยของเชื้อราบริเวณที่สัมผัสกับสารสกัดหากสารสกัดนั้น ๆ มีร้อยละของการยับยั้งสูงก็จะมีบริเวณที่เป็นสีดำมากกว่าไปด้วยเช่นภาพที่ 5.8 (ข) สารสกัดจากแบคทีเรีย TN79 pH 7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้สูงสุดจะเห็นได้ว่ามีบริเวณที่เป็นสีดำมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ pH 5 ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้เส้นใยส่วนนี้ก็จะไม่เปลี่ยนเป็นสีดำ แต่เมื่อทิ้งไว้จนเส้นใยแก่จัดเส้นใยทั้งหมดก็จะเปลี่ยนเป็นดำตามปกติ

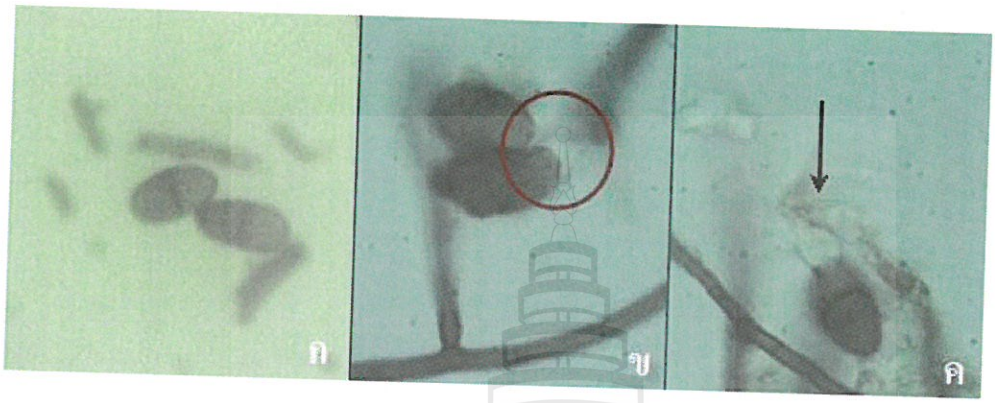


ภาพที่ 5.8 เส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* CMUL ที่บ่มไว้นาน 2 วัน (ก) เส้นใยบริเวณที่สัมผัสกับสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย CMU2 เปลี่ยนเป็นสีดำยกเว้นสารสกัดที่ผ่านการ autoclaved (ข) สารสกัดจากแบคทีเรีย TN79 pH 7 มีบริเวณที่เป็นสีดำมากที่สุดเมื่อเทียบกับบริเวณที่หยดสารสกัดที่ pH 5

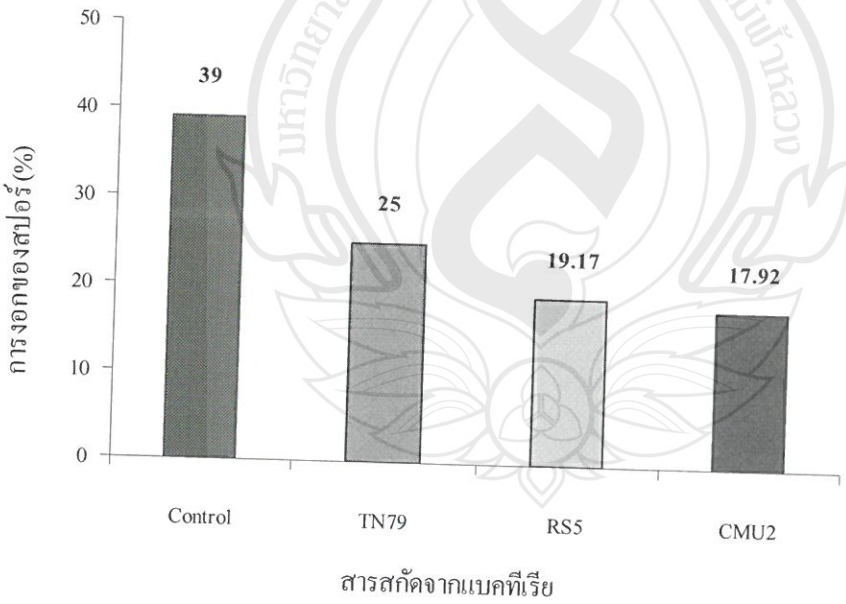
5.2 การทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* CMUL โดยใช้สารสกัดจากแบคทีเรีย

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* โดยใช้สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 โดยกำหนดจำนวนเริ่มต้นประมาณ 5 x 10^3 สปอร์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนสารสกัดจากแบคทีเรียโดยสปอร์จะเริ่มมีการงอกที่ 1 - 2 ชั่วโมงเริ่มประเมินการยับยั้งของการงอกของสปอร์หลังจากใส่สารสกัดและน้ำกลั่นเป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมงเพราะสามารถมองเห็นได้ชัดเจนที่สุด(ภาพที่ 5.9 ก - ค) ผลการทดลองพบว่าในกลุ่มควบคุมสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* มีการงอกคิดเป็นร้อยละ 39.00 ในกลุ่มที่เติมสารสกัดจากแบคทีเรียพบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากเชื้อ

แบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีการงอกของสปอร์คิดเป็นร้อยละ 25.00 ลดลงจากกลุ่มควบคุมคิดเป็นร้อยละ 39.50 กลุ่มที่เติมสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 พบว่ามีการงอกของสปอร์คิดเป็นร้อยละ19.17 ลดลงจากกลุ่มควบคุมร้อยละ 50.85 และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 พบว่ามีการงอกของสปอร์คิดเป็นร้อยละ17.92 ลดลงจากกลุ่มควบคุมร้อยละ 54.05 (ภาพที่ 5.10)



ภาพที่ 5.9 สปอร์ของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* CMUL (ก) สปอร์ที่ยังไม่งอก (ข) สปอร์เริ่มงอกเมื่อเวลาผ่านไป 1 - 2 ชั่วโมง และ (ค) สปอร์เริ่มงอกยาวขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง (100X)



ภาพที่ 5.10 ร้อยละของการงอกของสปอร์เมื่อเติมสารสกัดจากแบคทีเรียเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัดจากแบคทีเรีย

5.3 การตรวจสอบชนิดของสารสกัดจากแบคทีเรียด้วยวิธี gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS)

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 พบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทสามารถแยกออกเป็นสารประกอบได้มากกว่า 50 ชนิด ปะปนกันโดยมากเป็นสารประกอบอินทรีย์ได้แก่ สารประกอบพวกกรดไขมันทั้งอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว สารประกอบคาร์บอกซิลิก สารประกอบคีโตน สารประกอบเอสเทอร์ สารประกอบอโรมาติก และ สารประกอบพวกฟีนอล แอลกอฮอล์ และ กรดอมิโน

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีสารประกอบที่เป็นไปได้ทั้งหมด 56 ชนิด โดยสารประกอบที่พบมาก 3 อันดับแรกได้แก่ Octadec-9-enoic acid (43.86%) Isobutyric acid (6.62%) และ trans-Oleic acid (5.94%) สำหรับสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 มีสารประกอบที่เป็นไปได้ทั้งหมด 69 ชนิด โดยสารที่พบมาก 3 อันดับแรกได้แก่ Isobutyric acid (9.37%), 4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0] nonane หรือ Pyrrolo[1,2-a]piperazine-3,6-dione (6.74%) และ Butanoic acid (5.15%) และสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท CMU2 มีสารประกอบที่เป็นไปได้ทั้งหมด 75 ชนิด สารประกอบที่พบมาก 3 อันดับแรกได้แก่ trans-Oleic acid (10.60%), Benzeneacetaldehyde (8.93%) และ Isobutyric acid (7.77%)

เมื่อนำสารประกอบที่แยกได้จากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทมาเปรียบเทียบกัน พบว่ามีสารประกอบที่เหมือนกันทั้งหมด 9 ชนิดคือ Isobutyric acid, 2-Methylbutanoic acid, Benzeneacetaldehyde, 1,4-Pentanediamine, N1,N1-diethyl-, 3-Phenylpyridine, 1,4-diaiza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nonane หรือ Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-, Octadec-9-enoic acid และ trans-Oleic acid (ตารางที่ 5.1)

ตารางที่ 5.1 ชนิดของสารประกอบที่เหมือนกันของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด

Compounds
Octadec-9-enoic acid
trans-Oleicacid
Benzeneacetaldehyde
2-Methylbutanoic acid
3-phenylpyridine
1,4-diaza-2, 5-dioxo-3-isobutyl bicyclo [4.3.0]nonane or Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-
Isobutyric acid
1,4-Pentanediamine, N1,N1-diethyl-

5.4 อภิปรายผล

เมื่อทำการสกัดสาร secondary metabolite จากแบคทีเรียได้แล้วนอกจากจะทดสอบว่ายังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ได้หรือไม่แล้ว ยังต้องมีการทดสอบความเสถียรของสารสกัดอีกด้วย โดยปกติแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis* จะมีการผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ หลายชนิด รวมถึงสารปฏิชีวนะและไฮโดรไลติก เอนไซม์ต่างๆ ดังนั้นเพื่อวิเคราะห์ชนิดของสารและเพิ่มพูนประสิทธิภาพในการนำสารเหล่านี้ไปใช้งาน จึงต้องมีการทดสอบความเสถียรของสารดังกล่าวเช่น การทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน การทนต่อสภาวะความเป็นกรดด่าง การทนต่อความร้อนสูง และแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบในทางธรรมชาติในการนำสารเหล่านี้ไปใช้งานจริง โดยผลจากการทดสอบสารสกัดที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 พบว่ามีความเสถียรต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน proteinase K มีความเสถียรต่อแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงในช่วง 37 - 80 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถรักษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เมื่อนำไปผ่านการให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วโดยมีข้อสังเกตคือเมื่อนำไปให้ความร้อนเป็นเวลา 1 ชั่วโมงพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราลดลงมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเป็นเพราะการให้ความร้อนเป็นเวลานานทำให้พันธะเคมีของสารประกอบต่าง ๆ ในสารสกัดที่มีความเสถียรต่ำเช่นกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมรวมทั้งคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารอาจเปลี่ยนไปด้วย นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราคือ ค่าความเป็นกรดด่างหรือค่า pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่นำไปสกัดสารจากอาหารวุ้นแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย โดยสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลท RS5 ที่ค่า pH 5, 8 และ 9 และสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 ที่ค่า pH เท่ากับ 5 พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ เนื่องจากยังไม่ทราบว่าสารประกอบที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทนั้นเป็นสารชนิดใด จึงไม่สามารถระบุสาเหตุที่มีผลกระทบได้ แต่สันนิษฐานว่า ที่ค่า pH ดังกล่าว การทำละลายของสารยับยั้งเชื้อราในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ อาจจะไม่สมบูรณ์ทำให้สกัดออกจากอาหารวุ้นได้ไม่หมดหรือได้น้อยมากทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ และพบว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจะเกิดได้ดีที่สุดเมื่อ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีค่าเป็นกลางคือเท่ากับ 7 จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียในบทที่สี่ จะเห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย RS5 เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวที่เจริญได้ในอาหารที่มีค่า pH เท่ากับ 4 แล้วยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ด้วย แต่ผลจากการทดสอบสกัดสารยับยั้งเชื้อราด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5 พบว่าสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย CMU2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย RS5 อาจเป็นเพราะ การทดสอบหา pH ที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียในบทที่สี่นั้น แบคทีเรียไอโซเลท RS5 เป็นเชื้อเดียวที่เจริญได้ดี และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบยังคงมีเซลล์ของแบคทีเรียเหลืออยู่ทำให้มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CMU2 และ TN79 นั้นเจริญได้ไม่ดีในอาหารที่มี pH 4 แต่การสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรานั้น แบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 7 เท่ากัน และใช้ฟอสเฟตบับเฟอร์ที่มีค่า pH ต่าง ๆ กันมาใช้สกัดสาร การที่สารสกัดจาก CMU 2 มากกว่า ไอโซเลทอื่นอาจเป็นเพราะ การสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราออกมาจากอาหารวุ้นของเชื้อแบคทีเรีย CMU2 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5 - 7 นั้นสามารถสกัดได้มากกว่า

เชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ เนื่องจากมีการสะสมของสารยับยั้งเชื้อรามากกว่า หรือมีการทำละลายที่ดีกว่าเชื้ออื่นๆ ก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราโดยใช้สารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทยังไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ดีเท่ากับการใช้เซลล์ของแบคทีเรียในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเมื่อบ่มเชื้อรากับสารสกัดไว้นานกว่า 24 ชั่วโมงจะพบว่าเส้นใยที่มีการชะงักการเจริญในตอนแรกนั้น สามารถเจริญต่อทับบริเวณที่หยดสารสกัดจากแบคทีเรียได้โดยที่เส้นใยบริเวณที่เจริญทับสารสกัดนั้น ๆ พบว่ามีการเปลี่ยนสีเป็นสีดำอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่เส้นใยบางส่วนมีการฉีกขาดเนื่องจากผนังเซลล์ถูกทำลายก็เป็นได้ (Barsha and Ulaganathan, 2002) แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งหมด ซึ่งสาเหตุอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากแบคทีเรียมีความเข้มข้นของสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรานั้นน้อยเกินไป

และเมื่อนำสารสกัดจากแบคทีเรียมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา พบว่าสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลทมีผลต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อราทำให้อัตราการงอกของสปอร์ของเชื้อราลดลง อย่างไรก็ตามสปอร์ของเชื้อรามีอัตราการงอกค่อนข้างต่ำซึ่งอาจเป็นเพราะสภาวะที่ใช้ในการทดสอบ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณอาหาร และ ระยะเวลาที่ใช้ทดสอบอาจจะยังไม่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์ ในกลุ่มควบคุมพบว่ามีการงอกเพียงร้อยละ 39 เท่านั้นและมีความยาวของ germ tubes ไม่สม่ำเสมอ ไม่พบความแตกต่างของลักษณะของ germ tubes แต่อย่างใด นอกจากนี้ปัญหาที่พบอีกอย่างหนึ่งคือ เชื้อรา *L. theobromae* ไม่สร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถเก็บสปอร์ของเชื้อรา กล้วยที่เพาะเลี้ยงเชื้อราไว้นานจนเปลือกนอกมีลักษณะแห้งแข็งและมีสีดำสนิทมีซึ่งใช้เวลาไม่ต่ำกว่าหนึ่งเดือน การเก็บสปอร์ทำได้ยากและได้มีจำนวนสปอร์น้อย นอกจากนี้ยังมีเศษเนื้อของกล้วยและเส้นใยของเชื้อรามาปะปนมากทำให้มองเห็นสปอร์ของเชื้อราได้ยากอีกด้วย

จากผลการตรวจหาสารประกอบที่มีอยู่ในสารสกัดจากแบคทีเรียโดยใช้เครื่องมือ GCMS เนื่องจากเป็นสารสกัดหยาบจึงทำให้แยกสารประกอบออกได้มากกว่าห้าสิบชนิดในแต่ละสารสกัด และสารสกัดจากแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทมีสารประกอบที่เหมือนกันอยู่เก้าชนิด โดยสามารถยืนยันชนิดและระบุชื่อสารได้แน่นอนถึงร้อยละ 99 เพียงสองตัวคือ Octadec-9-enoic acid และ trans-Oleic acid ส่วนสารสกัดจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 ยังมีสารในกลุ่มเดียวกันและสามารถยืนยันชื่อได้ถึงร้อยละ 99 อีกชนิดหนึ่งคือ oleic acid ซึ่งทั้งหมดที่กล่าวมาเป็นสารประกอบในกลุ่ม fatty acid ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าสารกลุ่มนี้เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* เนื่องจากเป็นที่ทราบกันว่า fatty acid มีคุณสมบัติเป็น antifungal และ antibactericidal เช่น oleic acid มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus* spp. ได้ (Kabara *et al.*, 1972) นอกจากนี้ในกรณีของกรดไขมันไม่อิ่มตัวก็มีรายงานการเป็น antifungal fatty acid ด้วยเช่นกัน เช่นสารประกอบ *cis*-9-Heptadecenoic acid ซึ่งสกัดได้จากเชื้อยีสต์ *Pseudozyma flocculosa* ที่เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ของกลุ่มเชื้อราที่ก่อโรค powdery mildew ในแตงกวาได้แก่เชื้อ *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., *Cladosporium cucumerinum*, *Pythium aphanidermatum*(Edson) Fitzp. และ *Phytophthora infestans* (Mont.) โดยมีผลยับยั้งการเจริญของของเชื้อราเหล่านี้ในห้องปฏิบัติการ และยังสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Sphaerotheca fuliginea* ได้ดีมากอีกด้วย มีสมมุติฐานว่า *cis*-9-Heptadecenoic acid สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราเหล่านี้ได้โดยเข้าไปแทรกในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราในส่วนของฟอสโฟไลปิด โดยเฉพาะในเชื้อราที่มีสาร sterol ต่ำซึ่งจะให้มีช่องว่างให้สาร *cis*-9-Heptadecenoic acid และกรดไขมันอื่น ๆ ที่ปะปนอยู่ เข้าไปแทรกได้ปริมาณมากทำให้ของเหลวในเยื่อหุ้ม

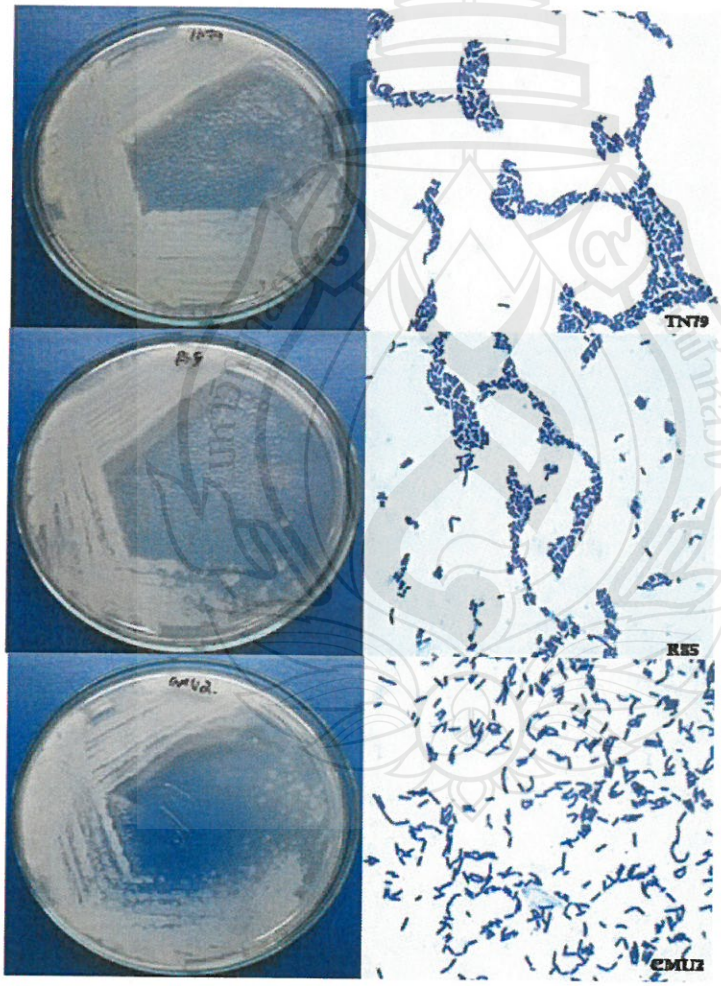
เซลล์ของเชื้อราเสียสมดุลจนมีผลกระทบต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราทำให้มีการหยุดชะงักการเจริญ ซึ่งผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อราจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร sterol ในเซลล์เมมเบรนของเชื้อราแต่ละชนิด (Avis and Bélanger, 2000) การเปลี่ยนแปลงของของเหลวในเซลล์เมมเบรนนี้ไม่ได้ทำให้เชื้อราตาย เพราะ *cis*-9-Heptadecenoic acid และ fatty acid อื่น ๆ ไม่ได้เป็นพิษต่อเชื้อราแต่ทำให้เชื้อราเกิดการชะงักการเจริญ ซึ่งรายงานนี้สอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้นที่เส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* เกิดการชะงักการเจริญเมื่อสัมผัสกับสารสกัดจากแบคทีเรีย แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปก็จะสามารถเจริญต่อได้แต่เห็นจะการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยของเชื้อราเป็นสีดำอย่างชัดเจน

อย่างไรก็ตามที่กล่าวมาเป็นเพียงสมมุติฐานเท่านั้นยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าสาร Octadec-9-enoic acid และ trans-Oleic acid เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้จริงเนื่องจากยังไม่สามารถทำการแยกเป็นสารบริสุทธิ์ออกมาเพื่อทดสอบซ้ำกับเชื้อราได้ และจากการทดสอบโดยใช้เซลล์ของแบคทีเรียทั้ง TN79, RS5 และ CMU2 พบว่าเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* ในบริเวณรอบ ๆ เชื้อแบคทีเรียไม่เจริญต่อแต่อย่างใด ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่ามีสารประกอบมากกว่า 1 ชนิดทำงานร่วมกันทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญต่อได้และความเข้มข้นของสารที่แบคทีเรียผลิตออกมาอย่างต่อเนื่องก็น่าจะมีผลด้วยเช่นกัน นอกจากนี้เนื่องจากเทคนิค GC-MS ใช้แยกสารประกอบที่สามารถระเหยเป็นก๊าซได้เท่านั้นและใช้ความร้อนสูงในการแยกโมเลกุลขององค์ประกอบของสารทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์สารประกอบอื่น ๆ ในสารสกัดที่ไม่สามารถระเหยเป็นก๊าซได้ จึงอาจจะต้องใช้เทคนิคอื่นในการวิเคราะห์สารต่อไปเพื่อให้ทราบชนิดของสารประกอบอื่น ๆ ที่อยู่ในสารสกัดจากแบคทีเรียนี้

บทที่ 6 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ TN79, RS5 และ CMU2

6.1 การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจาก stock culture ทั้งสามแหล่งที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ มา 9 ไอโซเลท ได้แก่ TN117, TN142, TN133, TN112 และ TN79 ที่แยกได้จากถั่วเน่า RS3 และ RS5 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากพืชสมุนไพร CMU2 และ CMU3 ที่แยกได้จากผิวของผลลำไย มาทำการตรวจสอบรูปร่างลักษณะพบว่าทั้งเก้าไอโซเลทมีโคโลนีขนาดประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร มีสีขาวขุ่นทึบแสง ผิวหน้าไม่เรียบ และเมื่อใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยมีลักษณะเยิ้ม ยกเว้นไอโซเลทที่ CMU3 ตรวจสอบการติดสีแกรมพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท ติดสีแกรมบวกและมีรูปร่างเป็นท่อน (bacilli) มีเอนโดสปอร์แบบ central และไม่มี capsule (ภาพที่ 6.1)



ภาพที่ 6.1 ลักษณะโคโลนีและลักษณะของเซลล์ที่ย้อมสีแกรมของแบคทีเรียตัวแทน 3 ไอโซเลท คือ TN79, RS5 และ CMU2

6.2 การตรวจสอบทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกแบคทีเรีย

ทำการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท และนำผลที่ได้มาตรวจสอบกับการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Sneath, 1986) และตารางของ MacFaddin (2000) ได้ผลดังตารางที่ 6.1)

ตารางที่ 6.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียตัวแทนทั้ง 9 ไอโซเลท

ลักษณะที่ศึกษา	สายพันธุ์แบคทีเรีย										
	TN117	TN142	TN133	TN112	TN79	RS3	RS5	CMU2	CMU3	*Bacillus subtilis*[a]	*Bacillus licheniformis*[a]
shape of cells	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
spore position	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+
glucose[b]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
manitol[b]	+[m]	+	+	+	+	+[m]	+	+	+[m]	+	+
xylose[b]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
arabinose[b]	+[w]	+[m]	+[w]	+[w]	+[w]	+[w]	+[w]	+[w]	+[w]	+	+
starch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 7.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

C, central; +[s], strongly positive; +[w], weakly positive; +[m], rapid; V, variable (MacFaddin, 2000)

หมายเหตุ: [a] Differrential characteristics of the most frequently isolated *Bacillus* spp.

[b] ความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาล

6.3 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux)

คัดเลือกแบคทีเรียจากข้อ 6.2 มา 3 ไอโซเลท เป็นตัวแทนจากแหล่งที่มาทั้งสามแหล่งคือ TN79 จากถั่วเน่า RS5 จากดินบริเวณรากพืชสมุนไพร และ CMU2 จากผิวของผลลำไย จากการทดสอบคาร์โบไฮเดรตจำนวนทั้งหมด 49 ชนิดโดยใช้ API 50 carbohydrate fermentation strips หลังจากการบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ 17 ชนิด คือ glycerol, L-arabinose, D-ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, D-manitol, D-sorbitol, methyl-αD-glucopyranoside, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-melibiose, D-sacharose (sucrose) และ D-trehalose (ตารางที่ 6.2) แบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ 19 ชนิดคือ glycerol, L-arabinose, D-ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, D-manitol, D-sorbitol, methyl-αD-glucopyranoside, amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose (bovine origin), D-sacharose (sucrose) และ D-trehalose (ตารางที่ 6.2) และแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ 23 ชนิด คือ glycerol, L-arabinose, D-ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, D-manitol, D-sorbitol, methyl-αD-glucopyranoside, amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose (bovine origin), D-melibiose, D-sacharose (sucrose), D-trehalose, D-raffinose, amidon (starch) และ Glycogen (ตารางที่ 6.2) เมื่อนำผลการทดสอบที่ได้ที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่า API scores ของเชื้อ *Bacillus* สปีชีส์ต่าง ๆ ใน apiweb (https://apiweb.biomerieux.com) พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 มีแนวโน้มที่จะจัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ *B. subtilis* / *B. amyloliquefaciens* เท่ากับร้อยละ 99.5, 99.7 และ 99.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 6.2 ผลการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TN79, RS5 และ CMU2 โดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux)

strips No.	carbohydrate	*Bacillus subtilis /B.amyloliquefaciens*	*B. licheniformis*	TN79	RS5	CMU2	strips No.	carbohydrate	*Bacillus subtilis /B.amyloliquefaciens*	*B. licheniformis*	TN79	RS5	CMU2
0	0	0	0	-	-	-	25	ESC	100	100	+	+	+
1	GLY	77	90	+	+	+	26	SAL	86	99	+	+	+
2	ERY	0	1	-	-	-	27	CEL	97	99	+	+	+
3	DARA	0	1	-	-	-	28	MAL	98	100	+	+	+
4	LARA	84	99	+	+	+	29	LAC	23	44	-	+	+
5	RIB	91	97	+	+	+	30	MEL	48	26	+	-	+
6	DXYL	56	97	-	-	-	31	SAC	90	99	+	+	+
7	LXYL	0	1	-	-	-	32	TRE	88	99	+	+	+
8	ADO	0	1	-	-	-	33	INU	58	50	-	-	-
9	MDX	0	1	-	-	-	34	MLZ	0	1	-	-	-
10	GAL	12	75	-	-	-	35	RAF	62	44	-	-	+
11	GLU	95	100	+	+	+	36	AMD	78	99	-	-	+
12	FRU	98	100	+	+	+	37	GLYG	79	87	-	-	+
13	MNE	87	99	+	+	+	38	XLT	1	1	-	-	-
14	SBE	1	8	-	-	-	39	GEN	52	60	-	-	-
15	RHA	1	32	-	-	-	40	TUR	50	78	-	-	-
16	DUL	1	1	-	-	-	41	LYX	0	1	-	-	-
17	INO	65	69	+	+	+	42	TAG	0	91	-	-	-
18	MAN	95	99	+	+	+	43	DFUC	1	1	-	-	-
19	SOR	86	92	+	+	+	44	LFUC	1	1	-	-	-
20	MDM	0	1	-	-	-	45	DARL	1	1	-	-	-
21	MDG	83	99	+	+	+	46	LARL	0	1	-	-	-
22	NAG	29	62	-	-	-	47	GNT	7	39	-	-	-
23	AMY	70	99	-	+	+	48	2KG	0	0	-	-	-
24	ARB	80	99	-	+	+	49	5KG	0	0	-	-	-

+, positive; -, negative

หมายเหตุ GLY = Glyceral, ERY = Erythritol, DARA = D-Arabinose, LARA = L-Arabinose, RIB = D-Ribose, DXYL = D-Xylose, LXYL = L-Xylose, ADO = D-Adonitol, MDX = Methyl-βD-Xylopyranoside, GAL = D-Galactose, GLU = D-Glucose, FRU = D-Fructose, MNE = D-Manose, SBE = L-Sorbose, RHA = L-Rhamnose, DUL = Dulcitol, INO = Inositol, MAN = D-Manitol, SOR = D-Sorbitol, MDM = Methyl-αD-Mannopyranoside, MDG = Methyl-αD-Glucopyranoside, NAG = N-Acetylglucosamine, AMY = Amygdaline, ARB = Arbutine, ESC = Esculine ferric citrate, SAL = Salicin, CEL = D-Cellubiose, MAL = D-Maltose, LAC = D-Lactose (bovine origin), MEL = Melibiose, SAC = D-Saccharose (sucrose), TRE = D-Trehalose, INU = Inulin, MLZ = D-Melezitose, RAF = D-Raffinose, AMD = Amidon (starch), GLYG = Glycogen, XLT= Xylitol, GEN = Gentiobiose, TUR = D-Turanose, LYX = D-Lyxose, TAG = D-Tagatose, DFUC = D-Fucose, LFUC = L-Fucose, DARL = D-Arabitol, LARL = L-arabitol, GNT = Potassium gluconate, 2KG = Potassium 2-ketogluconate, 5KG = Potassium 5-ketogluconate

6.4 การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้ 16S rRNA gene sequence

เมื่อนำผลที่ได้จากการหาลำดับของ 16S rRNA genes ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 มาเปรียบเทียบกับ 16S rRNA genes ในฐานข้อมูลของ GenBank และ EMBL โดยใช้เทคนิค BLAST search (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่าลำดับของ 16S rRNA genes ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ถึงร้อยละ 99.90 (ตารางที่ 6.3) เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 มีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ถึงร้อยละ 96.17 (ตารางที่ 6.4) เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ CMU2 มีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ถึงร้อยละ 99.6 (ตารางที่ 6.5)

ผลที่ได้จากการทำ phylogenetic tree พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 ยังอยู่ในสายที่ห่างจากแบคทีเรียในสปีชีส์ *B. amyloliquefaciens* และ *B. Subtilis* ซึ่งการบ่งชี้ว่าเป็นแบคทีเรียในสปีชีส์ใดนั้นจะต้องมีความเหมือนของ genes ใน sequence นั้นกับข้อมูลในฐานข้อมูล ถึงร้อยละ 97 - 100 จึงจะยอมรับได้ ดังนั้นหากดูจาก phylogenetic tree อาจบ่งชี้ได้ว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่มีข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียในฐานข้อมูลที่นำมาใช้เปรียบเทียบ

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย TN79, RS5 และ CMU2 ได้จัดส่งเข้าฐานข้อมูล NCBI โดยมี accession number ดังนี้ EU590118, EU590117 และ EU590116 ตามลำดับ

ตารางที่ 6.3 ผลการเปรียบเทียบ 16S rRNA genes ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TN79

Accession	Description	% similarlity
AB244461.1	*Bacillus* sp. C5-1 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:C5-1	99.90
CP000560.1	*B. amyloliquefaciens* FZB42, complete genome	99.90
EF428253.2	*B. subtilis* strain HDYM-34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.90
EF428251.2	*B. subtilis* strain HDYM-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.90
EF428240.2	*B. subtilis* strain HDYM-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.90
EF428238.2	*B. subtilis* strain HDYM-08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.90
AB300817.1	*B. amyloliquefaciens* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Y13	99.90
AB300802.1	*B. subtilis* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NDN1	99.90
EF581127.1	*B. subtilis* strain h-g 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.90
EF528285.1	*B. subtilis* strain CICCHLJ Q70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.90

ตารางที่ 6.4 ผลการเปรียบเทียบ 16S rRNA genes ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท RS5

Accession	Description	% similarlity
AY462214.1	*Bacillus* sp. DF49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.18
DQ422953.1	*B. amyloliquefaciens* strain Ba-74501 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.00
DQ415893.2	*B. subtilis* strain MA139 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.00
EF472266.1	*B. subtilis* strain LQ20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95.90
EF472262.1	*B. subtilis* strain QD434 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.17
EF472261.1	*B. subtilis* strain QD517 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95.90
EF445123.1	*B. subtilis* strain 261 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.17
AB244461.1	*Bacillus* sp. C5-1 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:C5-1	96.00

ตารางที่ 6.5 ผลการเปรียบเทียบ 16S rRNA genes ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CMU2

Accession	Description	% similarlity
AB301017.1	*B. amyloliquefaciens* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: GH14	99.40
DQ659146.1	*B. subtilis* strain GR011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.40
DQ422953.1	*B. amyloliquefaciens* strain Ba-74501 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.50
AB301006.1	*B. amyloliquefaciens* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: GH31	99.30
AB301002.1	*B. amyloliquefaciens* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: GH28	99.30
AB300805.1	*B. amyloliquefaciens* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: R9	99.30
EF488979.1	*B. subtilis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.60
EF492885.1	*B. subtilis* strain B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.30

6.5 อภิปรายผล

การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียในที่นี้จะหมายถึงการเทียบเคียงคุณลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรีย กับหมวดหมู่ที่มีการจัดจำแนกไว้แล้ว เช่น Bergey's Manual of Determinative Bacteriology และ MacFaddin โดยในทางปฏิบัติ จะต้องแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจึงตรวจสอบคุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา เช่นรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ คุณสมบัติการติดสีแกรม สีของรงควัตถุ ลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในเบื้องต้น จากนั้นก็ทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี เช่นความสามารถในการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสามารถใช้จัดจำแนกได้แบคทีเรียในเบื้องต้นได้ดีพอสมควรและมีการทำชุดทดสอบสำเร็จรูปที่สร้างมาเพื่อทดสอบใช้คาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียโดยเฉพาะเช่น API 50 CHB/E kits (bioMérieux) การสร้างเอนไซม์บางชนิด การใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ ความต้องการอาหาร ทดสอบคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เช่น ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่อุณหภูมิสูง หรือ ต่ำมาก คุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน ซึ่งคุณสมบัติดังที่กล่าวมาแล้วนี้ ควรจะเทียบเคียงกับข้อมูลอ้างอิงจากหลาย ๆ แหล่งที่มาเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องที่สุด นอกจากนี้แล้วยังมีคุณสมบัติทางด้านพันธุกรรมของแบคทีเรียที่มีการศึกษา และสามารถนำมาใช้จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้อีกด้วย โดยเป็นการจัดจำแนกที่ให้ผลสมบูรณ์ที่สุด โดยเดิมทีจะมีการศึกษาปริมาณของกรดนิวคลิอิกโดยหาปริมาณของ guanine และ cytocine ในเซลล์ หรือหาความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาระหว่าง DNA กับ DNA หรือ DNA กับ RNA ของแบคทีเรียต่างชนิดกัน ในการเกิด DNA hybridization หรือ DNA - RNA hybridization (ดวงพร คันธโชติ, 2537) ในปัจจุบันนี้ยังมีวิธีการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ ลำดับของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียที่แยกได้มาเทียบกับฐานข้อมูลที่มีผู้จัดทำไว้ (www.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez หรือ http://rdp.cme.msu.edu/ index.jsp) เนื่องจาก16S rRNA gene เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับโมเลกุลไรโบโซม ซึ่งไรโบโซมเป็นสิ่งที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และการเรียงตัวของ 16S rRNA gene นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแบคทีเรียแต่ละชนิด เป็นเหมือน signature gene ซึ่งมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด และการจัดเรียงตัวของลำดับเบสบน 16S rRNA gene เป็นที่ทราบกันพอสมควรจึงง่ายต่อการทำ PCR และ nucleotide sequence analysis ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่อยู่ในข่ายยากที่จะจัดจำแนกได้ และยังสามารถนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ในแง่พันธุกรรมของแบคทีเรียได้โดยใช้ phylogenetic system ได้อีกด้วย

จากผลตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียตัวแทนที่คัดมาทั้งหมดเก้าไอโซเลท พบว่าแทบจะไม่มีความแตกต่างกันทางกายภาพและทางชีวเคมี จากตารางของ MacFaddin สามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็นแบคทีเรียในตระกูล *Bacillus* และมีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. licheniformis* (MacFaddin, 2000) มากที่สุด อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะเบื้องต้นเช่นลักษณะของโคโลนีและการจัดเรียงตัวของเซลล์ใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ระบุว่า *B. subtilis* การจัดเรียงตัวของเซลล์ไม่เป็นเส้นสาย และโคโลนีไม่เป็นเมือก ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* การจัดเรียงตัวของเซลล์จะเป็นเส้นสายและโคโลนีจะมีการสร้างเมือก จากผลการทดลองแบคทีเรียส่วนใหญ่กลับสร้างเมือก และการจัดเรียงตัวของเซลล์ไม่

เป็นเส้นสาย (ภาพที่ 6.1) แม้ว่าแบคทีเรียบางชนิดอาจสามารถระบุชนิดได้โดยการดูจากลักษณะของโคโลนี แต่ในกรณีของแบคทีเรียตระกูล *Bacillus* เช่น *B. pumilus* มีรายงานว่าลักษณะของโคโลนีมีการเปลี่ยนแปลงเพียงแค่มีการ subculture เท่านั้น นอกจากนี้ผลการทดสอบทางชีวเคมีในห้องปฏิบัติการยังให้ผลลัพธ์ที่ใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเป็น *B. subtilis* หรือ *B. licheniformis* เนื่องจาก *B. subtilis* และ *B. licheniformis* จัดว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกันซึ่งในตารางการจัดจำแนกในหนังสือหลาย ๆ เล่มใช้การเจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจนเป็นบ่งชี้ความแตกต่างของแบคทีเรียสองชนิดนี้โดยระบุว่า *B. subtilis* ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่ *B. licheniformis* สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า *B. subtilis* ก็สามารถเปลี่ยนให้ตัวเองเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจนได้โดยใช้ nitrate หรือ nitrile มาเป็น terminal electron accepter หรือโดยการ fermentation เมื่อในอาหารมีน้ำตาล glucose (Nagona and Zuber, 1998) ดังนั้นจึงยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดในการทดสอบขั้นแรกว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใดระหว่าง *B. subtilis* และ *B. licheniformis*

เพื่อให้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อที่คัดเลือกมาเป็นแบคทีเรียชนิดใดจึงได้คัดเลือกเชื้อตัวแทนที่มีความแข็งแรงและยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดสามไอโซเลทคือ TN79, RS5 และ CMU2 มาทดสอบยืนยันด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB/E kits (bioMérieux) ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียในสปีชีส์ *B. subtilis* / *B. amyloliquefaciens* โดยที่การทดสอบทางชีวเคมีโดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux) นั้นจะไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* ออกจากกันได้ นอกจากนี้การใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB/E kits (bioMérieux) ยังเป็นการทดสอบโดยใช้สถิติของการเกิดผลบวกของเชื้ออ้างอิงจากการทดสอบหนึ่งร้อยครั้งแล้วคิดเป็นร้อยละผลการทดสอบออกมา ดังนั้นจำนวนซ้ำของการทดลองจึงมีความสำคัญต่อการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วย การทดสอบซ้ำตั้งแต่ห้าครั้งขึ้นไปจะทำให้มีความแม่นยำมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียบางชนิดก็ไม่สามารถ identify ได้ด้วยการใช้ชุดทดสอบนี้ (Boyd *et al.*, 2005; Ngo *et al.*, 2000)

การทดสอบทางด้านพันธุกรรมจึงเป็นการทดสอบที่นำมาใช้เพื่อให้มีความแม่นยำสูงขึ้น ผลจากการเทียบเคียง16S rRNA genes ที่ได้ของแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทกับโปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับของ 16S rRNA genes ของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทมีความใกล้เคียงที่สุดกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* จากการทดสอบจะเห็นว่าผลการ BLAST สามารถใช้ยืนยันผลการทดสอบด้วย API 50 CHB/E kits (bioMérieux) ได้ กล่าวคือแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีความใกล้เคียงมากที่สุดกับแบคทีเรียในสปีชีส์ *B. subtilis* / *B. amyloliquefaciens* โดยผลจากการ BLAST นั้นให้ผลออกมาเท่ากับร้อยละ 99.90 และ ผลของการทดสอบด้วย API 50 CHB/E kits (bioMérieux) ให้ผลออกมาเท่ากับร้อยละ 99.5 แต่อย่างไรก็ตามถ้ายังไม่สามารถระบุชนิดได้ชัดเจน ควรดูจาก full rRNA sequence (Barbosa *et al.*, 2005) ในแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีการเทียบกับ *B. amyloliquefaciens* FZB42, complete genome ด้วยซึ่งอาจช่วยยืนยันว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79 มีความใกล้เคียงกับ *B. amyloliquefaciens* มากที่สุด ส่วนแบคทีเรียไอโซเลทที่ RS5 และ CMU2 นั้น เมื่อดูจากผลการ BLAST จะเห็นได้ว่ามีความใกล้เคียงกับ *B. subtilis* มากกว่า *B. amyloliquefaciens* นอกจากนี้การทำ phylogenetic tree ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียได้ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 ไม่ได้มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียใน Genus *Bacillus* แต่อย่างใด ซึ่ง

ผลที่แตกต่างกับผลการทดสอบด้วย API 50 CHB/E kits (bioMérieux) และ BLAST search อาจจะเกิดจากความผิดพลาดในระหว่างการทำ phylogenetic tree ก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามผลการทดสอบโดยใช้ API 50 CHB/E kits (bioMérieux) และ BLAST search ก็เพียงพอที่จะยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ TN79, RS5 และ CMU2 แล้ว หากต้องการทดสอบเพิ่มเติมก็ยังสามารถทำได้ เช่น การเปรียบเทียบ full rRNA sequence gene การทดสอบ multiple morphological โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนตรวจดูรูปร่างของเซลล์ endospore หรือ flagella และการทดสอบ physiology parameter เช่น การเจริญใน alkaline condition การเกิด hemolysis บน 5% Blood agar การสร้าง pigment เพื่อยืนยันการการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

บทที่ 7 สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติจำนวน 284 ไอโซเลทเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* CMUL ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่แยกได้จากผิวเปลือกของผลลำไย โดยสามารถแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ทั้งหมดจำนวน 43 ไอโซเลท และคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์มาทำการทดสอบต่อ 3 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TN 79 จากถั่วเน่า แบคทีเรียไอโซเลท RS5 จากดินบริเวณรากพืชสมุนไพร และแบคทีเรียไอโซเลท CMU2 จากผิวของผลลำไย ในขั้นต้นพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสามไอโซเลทสามารถควบคุมเชื้อราก่อโรคได้ดีในห้องปฏิบัติการในกรณีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตเพาะเลี้ยงกับเชื้อราก่อโรคโดยตรง เชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลท มีคุณสมบัติของการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์คือมีการเจริญอย่างรวดเร็วสามารถแข่งขันกับเชื้อก่อโรคได้ดีซึ่งเป็นกลไกหลักในการควบคุมโรคโดยชีววิธี มีความทนทานต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างได้ในช่วงกว้าง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ได้หลายสายพันธุ์ แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรากลับพบปัญหาว่าไม่สามารถสกัดสารยับยั้งเชื้อราออกมาได้ ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากความเข้มข้นของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียมีน้อยเกินไปจนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นการสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราจึงต้องทำการสกัดจากเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งแทน ซึ่งสารสกัดหยาบที่สกัดโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7สามารถทำให้เส้นใยของเชื้อราหยุดชะงักการเจริญได้ มีความทนทานต่อ แสงยูวี เอนไซม์ย่อยโปรตีน ความร้อน และ ค่าความเป็นกรดด่างในระดับต่างๆกันได้ดีพอสมควร แต่เมื่อเทียบกับการใช้ตัวเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรียปฏิปักษ์แล้วประสิทธิภาพการยับยั้งโดยการใช้เชื้อแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตจะมีประสิทธิภาพสูงกว่า นอกจากนี้การสกัดสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งยังทำได้ยากและให้ปริมาณสารสกัดค่อนข้างน้อย และจากการวิเคราะห์สารสกัดจากแบคทีเรียด้วยเทคนิค GC-MS ยังไม่สามารถระบุได้แน่นอนว่าสารประกอบใดเป็นสารประกอบหลักที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา เนื่องจากเป็นสารสกัดหยาบมีปริมาณสารประกอบในแต่ละสารสกัดมากกว่าห้าสิบชนิด และมีปริมาณน้อย หากต้องการศึกษาต่อไปอาจต้องสกัดสารให้มีปริมาณมากขึ้นและทำให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยการนำไประเหยเอาน้ำออกและแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ในขั้นแรกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีและ ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีแล้วจึงนำสารบริสุทธิ์แต่ละชนิดกลับมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งการทดสอบมีซับซ้อนมากขึ้นจึงไม่สามารถทำให้สมบูรณ์ได้ในงานวิจัยนี้

เมื่อพิจารณาจากผลการพิสูจน์ชนิดของแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลท พบว่า มีความใกล้เคียงกับเชื้อชนิด *Bacillus subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* มากที่สุด โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* นั้นเป็นแบคทีเรียที่ได้ชื่อว่ามีประสิทธิภาพสูงและมีการนำไปใช้ควบคุมเชื้อก่อโรคได้จริงในทางปฏิบัติ เช่นมีการนำ *B. subtilis* ใส่ลงในแว็กซ์ที่เคลือบลูกพีชเพื่อป้องกันโรค brown rot ที่เกิดจากเชื้อ *Monilinia fructicola* (Pusey *et al.*, 1998) ได้ จากการทดลองจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียไอโซเลท TN79, RS5 และ CMU2 นั้นเหมาะที่จะใช้เซลล์ของแบคทีเรีย

โดยตรงในการควบคุมเชื้อโรคหลังการเก็บเกี่ยว น่าจะมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารสกัดจากแบคทีเรีย เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสูงกว่า สามารถนำไปผลิตหรือนำไปประยุกต์ใช้เช่นผสมลงในแว๊กซ์ที่เคลือบผลไม้ได้ มีความทนทานสูง และอาจจะมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าการใช้สารสกัด แต่อย่างไรก็ตาม การคัดเลือกที่เรียกได้ว่าประสบผลสำเร็จจะขึ้นอยู่กับขีดความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์นั้นๆ เช่นความสามารถที่จะอยู่รอดของแบคทีเรียและความสามารถอดทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ง่ายในธรรมชาติ การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในบริเวณบาดแผลของผลไม้ต้องมีปริมาณมากพอที่จะก่อให้เกิดประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคโดยเชื้อก่อโรคหลายๆชนิดที่ก่อให้เกิดโรคโรคเดียวได้ด้วย และนอกจากนี้ควรจะมีขีดความสามารถและมีความไวมากกว่าการใช้สารเคมีในปัจจุบัน พร้อมทั้งคำนึงถึงความปลอดภัยของการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีชีวิตที่อาจมีผลกระทบต่อเกษตรกร ผู้บริโภค รวมถึงสิ่งแวดล้อมทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่อาจเกิดขึ้นจากแบคทีเรียปฏิปักษ์รวมถึงเทคโนโลยีการผลิตให้ถูกต้องด้วย ดังนั้น เชื้อแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทที่แยกมาได้จึงต้องทำการศึกษาพัฒนาต่อไปในด้านต่างๆ เช่น ความปลอดภัยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคโดยตรงในสภาพสวนผลไม้ หรือ การควบคุมหลังการเก็บเกี่ยวในระยะขนส่งและการเก็บรักษา การประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีควบคุมโรคอื่นๆ รวมถึงการรักษาคุณภาพและอายุการใช้งานของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในระยะยาวด้วย

บรรณานุกรม

1. กัลยา วิธี. ผลของสารประกอบคาร์บอเนตและไบคาร์บอเนตต่อคุณภาพและการควบคุมเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. บนลำไยหลังการเก็บเกี่ยว. [วิทยานิพนธ์] เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2540.
2. ดนัย บุญเกียรติ. โรคหลังเก็บเกี่ยวของผักและผลไม้. ใน: ประสาทพร สมิตมาน เรียบเรียง. โรคพืชวิทยา. เชียงใหม่: ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2534. น. 284-292.
3. ดวงพร คันธโชติ. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. ; 2537.
4. ทัศนวรรณ ศรีวะอุไร, นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง, สมศิริ แสงโชติ, ชลิดา เล็กสมบูรณ์, จริงแท้ ศิริพานิช และ อุดม ฟ้ารุ่งสาง. การยับยั้งรา *Lasiodiplodia theobromae* สาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ โดยจุลินทรีย์ที่ได้จากทรงพุ่ม. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 42 สาขาพืช: 3-6 กุมภาพันธ์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2547.
5. ประพันธ์ โอสถาพันธุ์, ชาญณรงค์ ดวงสะอาด, วรวรรณ ชาลีพรหม และ ศมาพร แสงยศ. การควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวของลำไยและลิ้นจี่โดยชีววิธี: รายงานผลงานวิชาการประจำปีศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติภาคเหนือ. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้; 2544.
6. พรพิมล อธิปัญญาคม, ลักษณ์ วงศ์หิรัญภิญโญ, พัฒน์พงค์ ภัทรโกศล และ ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุ และความรุนแรงของโรคลำไย. กรุงเทพฯ: กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช; 2546.
7. วรุณรักษ์ ราษีนวล. การควบคุมการเน่าเสียของผลลำไย (*Dimocarpus Longan* Lour spp. *Longan* var. *longan*) หลังการเก็บเกี่ยวด้วยสารอะเซทัลดีไฮด์. [วิทยานิพนธ์] เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2539.
8. สมศิริ แสงโชติ, รัติยา พงศ์พิสุทธา และ รณภพ บรรเจิดเชิดชู. โรคที่เกิดกับผลทุเรียนหลังการเก็บเกี่ยว. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 สาขาพืช ประมง. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2539.
9. สมศิริ แสงโชติ และสุมิตรา แสงวนิชย์. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคขั้วหวีเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* บนกล้วยหอมทอง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 สาขาพืช. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2548.
10. สุมิตรา แสงวนิชย์. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคขั้วหวีเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffs & Maubl. บนกล้วยหอมทอง. [วิทยานิพนธ์] กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2547.
11. อุดม ฟ้ารุ่งสาง นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง ทัศวรรณ ศรีวะอุไร และ สมศิริ แสงโชติ. การสำรวจและการคัดเลือกยีสต์จากธรรมชาติที่ต่อต้านรา *Lasiodiplodia theobromae* สาเหตุโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ. เชียงใหม่: Postharvest Newsletter; 2548. น. 4.

12. อุราภรณ์ สอาดสุด วิชชา สอาดสุด และโสภณ สิงห์แก้ว. การประเมินความเสียหายในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยว : รายงานวิชาการ. เชียงใหม่: สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2546.
13. Anthony, S., Abeywickrama, K., Dayananda, R., Wigeratnam, S. W. and Arambewela, L. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils. Mycopathologia. 2004;157:91-97.
14. Alves, A., Crous, P. W., Correia, A. and Phillips, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Divers. 2008;28:1-13.
15. Avis, T. J. and Bélanger, R. R. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. Appl Environ Microbiol. 2001;67:56-60.
16. Barbosa, T. M., Serra, C. R., Ragione, M. L. R., Woodward, M. J. and Henriques, A. O. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. Appl Environ Microbiol. 2005;71:968-978.
17. Barnette, H. L. and Hunter, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. New York: Macmillan; 1987.
18. Basha, S. and Ulaganathan, K. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. Curr Sci India. 2002;82:1457-1462.
19. Boyd, M. A., Antonio, M. A. D. and Hillier, S. L. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. J Clin Microbiol. 2005; 43:5309-5311.
20. Cedeño, L., Mohali, S., and Palacios-Prü, E. Ultrastructure of *Lasiodiplodia theobromae* casual agent of caribbean pine blue stain in venezuel. Interciencia. 1996;21:264-265.
21. Cilliers, A. J., Swart, W. J. and Wingfield, M. J. A review of *Lasiodiplodia theobromae* with particular reference to its occurrence on coniferous seeds. S AFR For J. 1993;166:47-52.
22. Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M .J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Phillips, A. J. L. *et al.*, Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. Stud Mycol. 2006;25:235-253.
23. Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., and Bottge E. C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes - characterisation of gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 1998;17:7843-7853.
24. Gillespie, L. J. The comparative viable of Pneumococci on solid and on fluid culture media. J Exp Med. 1913;584-590.
25. Holo, H., Faye, T., Brede, D. A., Nilsen, T., øDEGÅRD, I., Langsrud, T. *et al.* Bacteriocins of propionic bacteria. Oslo: EDP Sciences; 2002. p. 59-68.
26. Janisiewicz, W. J. and Korsten, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. Annu Rev Phytopathol. 2002;40:411-441.
27. Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J. and Truant, J. P. Fatty acids derivatives as antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother. 1972;2:23-27.

28. Li, H. Y., Cao, R. B. and Mu, Y. T. In vitro of *Botryosphaeria dothida* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. Crop Prot.1995;14:187-191.

29. Lorian, V. In vitro simulation of in vivo condition : physical state of the culture medium. J Clin Microbiol. 1989;27:2403-2406.

30. MacFaddin, J. F. Biochemical tests for identification of medical bacteia. 3rd ed. Maryland: Lippincott Willium & Winkins; 2000.

31. Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. Structural characterizaton of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45°C. J Surfactants Deterg. 1999;2:369-372.

32. Misra, A. K. Guava disease - their symptomp, causes and management. In: Naqvi, S. A. M. H.; Editor. Diseases of fruits and vegetables diagnosis and management volume II. Dordrecht: Kluwer Academic; 2004. p.109.

33. Mortuza, M. G., and Ilag, L. L. Potential for biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maaubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. Biol Control. 1999;15:235-240.

34. Nagano, M. M. and Zuber, P. Anaerobic growth of "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). Annu Rev Microbiol. 1998;52:165-190.

35. Ngo, T. H., Baccigalupi, L., Huxam, A., Smertenko, A., Van, P., Ammendola, S. *et al.* Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. Appl Environ Microbiol. 2000;66:5241-5247.

36. Noveriza, R. and Quimio, T. H. Soil mycoflora of black pepper rhizosphere in The Philippines and their in vitro antagonism against *Phytophthora capsici* L. IJAS. 2004;5:1- 10.

37. Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A., Gryzenhout, M. and Wingfield, M. J. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum*. S AFR Stud Mycol. 2004;50:313-322.

38. Pantos, O., Cooney, R. P., Barer, Le Tissier, M. D. A., Barer, M. R., O'Donnell, A. G. and Bythell, J. C. The bacterial ecology of a plague-like disease affecting the Carribbean coral *Montastrea annularis*. Environ Microbiol. 2003;5:370-382.

39. Pusey, P. L. and Wilson, C. L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant Dis. 1984;68:753-756.

40. Sato, T., Iwamoto, Y. Tomioka, K., Taba, S., Ooshiro, A. and Takaesu, K. Black band of Jew's marrow caused by *Lasiodiplodia theobromae*. J Gen Plant Pathol. 2007;74:91-93.

41. Singh, R. S. Diseases of fruit crops. New Delhi: Science; 2000.

42. Sivakumar, D., R. S. Wilson Wijeratnam, Wijesundera, R. L. C., Marikar, F. M. T. and Abeyesekere, M. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*). Phytoparasitica. 2000;28:1-6.

43. Sneath, P. H. A. Bergey's manual of systematic bacteriology section 13 volumn 2. Maryland: Lippincotte Williums&Wilkins; 1986. p. 1104-1139.

44. Srivastava, M. P. and Mehra, R. Diseases of miner tropical and sub - tropical fruits and their management. In: Naqvi, S. A. M. H.; Editor. Diseases of fruits and vegetables diagnosis and management volume II. Dordrecht: Kluwer Academic; 2004. p. 560.

45. Stover, R. H. Banana, plantain and abaca disease. London: Eastern Press; 1972.

46. Summerbell, R. C., Krajden, S., Levine, R. and Fuksa, M. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. Med Mycol. 2004;42:543-547.

47. Sutton, B. C. The Coelomycetetes. Kew: Common Wealth Mycological Institute; 1980.

48. Swain, M. R. and Ray, R. C. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. Microbiol Res. 2009;164:121-130.

49. Ventura, J. A., Costa, H. and Tatagiba, J. D. S. Papaya diseases and integrated control. In: Naqvi, S. A. M. H.; Editor. Diseases of fruits and vegetables diagnosis and management volume II. Dordrecht: Kluwer Academic; 2004. p. 229.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ นามสกุล	ผศ.ดร.เอกชัย ชูเกียรติโรจน์
2. ที่ทำงาน	สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย
3. ประวัติการศึกษา	PhD (Biochemistry), University of Kent at Canterbury, UK
	BSc (Biology), Chiang Mai Univeristy, Thailand
4. การทำงาน	Lecturer, Mae Fah Luang University
	Postdoctoral fellowship, Oita Univeristy, Japan
	Teaching studentship, UKC, UK

5. ผลงานวิจัย

- Dajanta K, Apichartsrangkoon A and **Chukeatirote E.** 2011. Free-amino acid profiles of thua nao, a Thai fermented soybean. Food Chemistry 125: 342–347.
- Dajanta K, Apichartsrangkoon A and **Chukeatirote E.** 2011. Volatile profiles of thua nao, a Thai fermented soy product. Food Chemistry 125: 464-470.
- Dajanta K, **Chukeatirote E** and Apichartsrangkoon A. 2011. Analysis and characterisation of amino acid contents of thua nao, a traditionally fermented soybean food of Northern Thailand. International Food Research Journal 18: 588-592.
- Wikee S, Cai L, Noireung P, McKenzie EHC, Su YY, **Chukeatirote E**, Thi HN, Bahkali AH, Moslem MA, Abdelsalam K and Hyde KD. 2011. *Colletotrichum* species from Jasmine (*Jasminum sambac*). Fungal Diversity 46: 171–182.
- **Chukeatirote E**, Dajanta K and Apichartsrangkoon A. 2010. *thua nao*, indigenous Thai fermented soybean: a review. Journal of Biological Sciences 10: 581-583.
- Phengsintham P, **Chukeatirote E**, Abdelsalam KA, Hyde KD and Braun U. 2010. *Cercospora* and allied genera from Laos 2. Cryptogamie Mycologie 31: 161-181.
- Chang-ngern P, Sardsud U, Pathom-aree W, Chantrasri P and **Chukeatirote E.** 2010. Diversity of moulds in fresh longan. Agricultural Science Journal 41 (1S): 322-324.
- Dajanta K, **Chukeatirote E**, Apichartsrangkoon A and Frazier RA. 2009. Enhanced aglycone production of fermented soybean products by *Bacillus* species. Acta Biologica Szegediensis 53: 93-98.

การนำเสนอผลงาน

1. Niraphai K, Sardsud U and Chukeatirote E. 2006. Biocontrol of *Lasiodiplodia* spp. by *Bacillus* species isolated from *Thua Nao*. The 32nd Congress on Science and Technology of Thailand (STT.32), Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, 10 – 12 October 2006.

2. Chukeatirote E, Niraphai K and Sardsud U. 2006. Biocontrol of *Lasiodiplodia* spp., the fungal causative agent of postharvest diseases. Agricultural Science Journal 37: 1075-1078.

การควบคุมเชื้อ *Lasiodiplodia* spp. โดยชีววิธีของแบคทีเรีย *Bacillus* ที่แยกจากถั่วเน่า

Biocontrol of *Lasiodiplodia* spp. by *Bacillus* Species Isolated from *Thua Nao*

กาญจนา นิรภัย[1] อุราภรณ์ สอาดสุด[2] และ เอกชัย ชูเกียรติโรจน์[1]

Kanjana Niraphai[1], Uraporn Sardsud[2] and Ekachai Chukeatirote[1]

[1]School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100, Thailand
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

บทคัดย่อ: ในงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่าที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* จากจำนวนเชื้อทั้งหมด 170 ไอโซเลท พบว่า มี 39 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ผลของการยับยั้งมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 25 – 67.5 จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง และสามารถสร้างสปอร์ได้ การใช้แบคทีเรียเหล่านี้อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยว

Abstract: One hundred and seventy bacterial strains previously isolated from *thua nao* were screened for their antagonistic ability against *Lasiodiplodia* species. Of these, 39 strains were able to inhibit the fungal growth in dual culture as observed by the inhibitory zones. Radial growth reduction calculated in relation to the control growth was between 25 and 67.5%. Based on cell morphology, most bacterial isolates were Gram-positive, endospore-forming bacilli. These bacterial species offer a potential use as a biocontrol agent(s) of the postharvest pathogen *Lasiodiplodia*.

Introduction: *Lasiodiplodia theobromae* is one of the most important fungal postharvest pathogens that cause a serious concern in various kinds of fruits such as longan, banana, and rambutan. To control these postharvest diseases, fungicides have traditionally been used. However, with the problems of resistant fungal emergence as well as chemical contamination, the use of fungicides becomes ineffective and unpopular. In the past decade, many attempts have been made to screen natural substances derived from plants and microbes that can be used as an alternative in controlling the postharvest diseases. The present study describes the potential use of some *Bacillus* species isolated from *thua nao* in controlling the growth of *Lasiodiplodia*, the fungal causative agent of postharvest diseases.

Methodology: The fruit-rot pathogen, *Lasiodiplodia* spp., was isolated from infected longan fruits in Chiang Mai. The bacterial isolates used to test antagonistic effect were previously isolated from *thua nao*, a traditionally fermented soybean in Chiang Rai. To study the inhibitory activity, the dual culture tests were performed by placing the fungal mycelia and bacterial colony on the centre of the PDA plates. Antifungal activity was noted by observing the inhibition of the mycelial growth. Radial growth reduction was calculated as follows: (a – b) / a (where a = radial growth measurement of the pathogen in control and b is that of the pathogen in the presence of bacteria tested); these values were then expressed as percentage inhibition of radial mycelial growth. The bacteria exhibited antagonistic activity were subject to further cell morphological characterisation.

Results, Discussion and Conclusion: Postharvest diseases in fruits and vegetables are serious concerns and cause a great loss worldwide especially in the tropics. *Lasiodiplodia* spp. are well known as a causative pathogen of fruit rots under inappropriate storage. Thaiabendazole and benomyl are commonly used fungicides in combating these postharvest diseases. Recently, biocontrol is expected to be a promising strategy for controlling postharvest fruit diseases due to several benefits (i.e., safety concern). However, there is limited work regarding the use of biocontrol for *Lasiodiplodia*. In this study, 170 bacterial strains isolated from *thua nao* were tested against the fungal pathogen *Lasiodiplodia*. Most *thua nao* bacteria are classified into the Genus *Bacillus*[1] in which its antagonistic activity has been reported.[2] The bioassay was initially evaluated by the degree of growth inhibition using dual culture technique. Of these bacteria tested, 39 isolates (~23%) exhibited antifungal activity. All isolates were Gram-positive, endospore-forming bacilli based on cell morphology. Further study is now being undertaken to determine the identity of the active compound(s) and the microbial source. These preliminary results prove to be the most promising step before the field trial.

References:

(1) Chukeatirote E *et al*. (2006) *Research Journal of Microbiology* **1**, 38-44.
(2) Sonenshein AL *et al*. (1993) *Bacillus subtilis and other gram positive bacteria*. ASM Press.

Keywords: *Lasiodiplodia*, postharvest diseases, *Bacillus*, *thua nao*, antagonistic activity

Agricultural Sci. J. 37 (6) (Suppl): 1075-1078 (2006) ว. วิทย์.กษ.37(6) (พิเศษ) : 1075-1078 (2549)

การควบคุมเชื้อราก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยว *Lasiodiplodia* spp. โดยชีววิธี

Biocontrol of *Lasiodiplodia* spp., the fungal causative agent of postharvest diseases

เอกชัย ชูเกียรติโรจน์[1] กาญจนา นิรภัย[1] และ อุราภรณ์ สอาดสุด[2]
Ekachai Chukeatirote[1], Kanjana Niraphai[1] and Uraporn Sardsud[2]

Abstract

In this study, a total of 281 bacteria screened from *thua nao* and rhizosphere soils of five medicinal plants were tested for antagonistic ability against the fungal pathogen *Lasiodiplodia* species. Based on dual culture test, only 41 strains were able to inhibit the mycelia growth of which most strains (39 strains) were from *thua nao* origin. The antagonistic activities were between 25 – 67.5%. In addition, the antagonistic test was also confirmed using their bacterial culture supernatant. Seven best bacterial isolates exhibiting high inhibitory activity were selected for further study including their taxonomic identity and their active metabolites. In a long run, this work is expected to develop as a novel strategy for controlling *Lasiodiplodia* species in the field trial.

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาถึงแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรค *Lasiodiplodia* species ซึ่งทำให้เกิดโรคผลเน่า จากจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 281 สายพันธุ์ที่แยกได้จากถั่วเน่า และดินบริเวณรากพืชสมุนไพร พบว่า มีเพียง 41 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าวได้ โดยที่แบคทีเรียส่วนใหญ่ (39 ไอโซเลต) แยกได้จากถั่วเน่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค ด้วยแบคทีเรียที่แยกได้ มีค่าอยู่ระหว่าง 25 และ 67.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ผู้วิจัยพบว่า การใช้น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก็มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วย ต่อจากนั้น ผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ดีที่สุด จำนวน 7 ไอโซเลต มาศึกษาเพิ่มเติม โดยมุ่งเน้นการวิเคราะห์สารเมทาบอไลท์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียเหล่านี้ ตลอดจนการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียดังกล่าว

ผู้วิจัยคาดหวังว่า งานวิจัยนี้จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการศึกษาขั้นต้นเพื่อตรวจสอบหาจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. นี้ได้ โดยมุ่งหวังที่จะนำผลที่ได้ไปใช้พัฒนาให้เกิดประโยชน์ได้จริงในภาคสนามต่อไป

[1] School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100, Thailand

[2] Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Introduction

Lasiodiplodia species is one of the major fungal pathogens responsible for postharvest storage rots in various kinds of tropical fruits (Li *et al.*, 1995; Mortuza and Ilag, 1999). When the fruits are infected by *Lasiodiplodia*, the typical symptom is the formation of black spots on the fruit's surface. Traditionally, the use of fungicides (i.e., benomyl) is a common means to control such a disease. Unfortunately, the inappropriate use of these chemicals has resulted in the emergence of resistant strains. In addition, the chemical remains in the fruit products cause a food safety concern to the consumers. As a result, the search for other 'novel' natural substances that do not impose such problems is required and biocontrol may be an alternative to serve this purpose. This study was performed to screen the microbes from natural habitat that are capable of inhibiting the *Lasiodiplodia* species. In a long run, this work is expected to develop as a novel strategy for controlling *Lasiodiplodia* species in the field trial.

Materials and Methods

Microbial cultures. The fungal *Lasiodiplodia* strains were obtained from the Postharvest Technology Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. The bacterial isolates used in antagonistic experiment were isolated from *thua nao* (Thai fermented soybeans) and rhizosphere soils of *Aloe barbadensis*, *Alpinia galanga*, *Centella asiatica*, *Citrus aurantifolia* and *Wedelia trilobata*.

Antifungal activity. The dual culture tests were performed in triplicate by placing the the fungal mycelia and bacterial colony on the centre of the PDA plates. Antifungal activity was observed by the inhibition zone of the mycelial growth. Radial growth reduction was calculated as follows: (a – b) / a (where a = radial growth measurement of the pathogen in control and b is that of the pathogen in the presence of bacteria tested); these values were then expressed as percentage inhibition of radial mycelial growth. To confirm the results, the bacterial-culture supernatants were also used. The test bacterial isolates exhibiting the greatest zones of inhibition were selected for further experiment.

Bacterial identification. The selected bacterial strains were characterised based on their morphological and biochemical properties. These included cell shape, Gram staining, presence of spore, and growth conditions (oxygen and temperature requirements). Biochemical assays were performed as previously described by Norris *et al.* (1981).

Results and Discussion

Postharvest diseases in fruits and vegetables are serious concerns and cause a great loss worldwide; especially in tropical countries, such a loss is estimated to be between 20 – 40% (Daniels, 1990). The fungal pathogen *Lasiodiplodia* species are well known as a causative pathogen of fruit rots under inappropriate storage. Thaiabendazole and benomyl are commonly used fungicides in combating these postharvest diseases. Recently, biocontrol is expected to be a promising strategy for controlling postharvest fruit diseases due to several benefits (i.e., safety concern). However, there is limited work regarding the use of biocontrol for *Lasiodiplodia* (Li *et al.*,

1995; Mortuza and Ilag, 1999). In Thailand, a few reports have been carried out and suggested the potential of antagonistic yeast *Endomycopsis fibuligera* to control this fungal pathogen (Sangchote and Sangwanich, 2006).

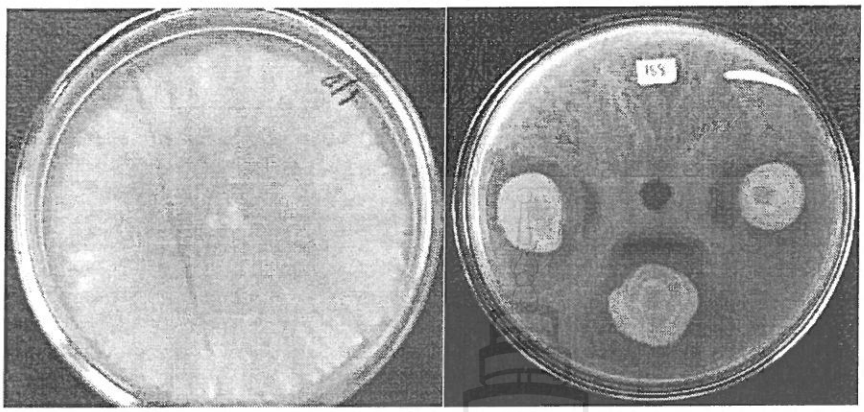


Figure 1 Dual culture test between *Lasiodiplodia* species and bacteria tested. Left, the mycelia growth of *Lasiodiplodia*; right, the inhibition of mycelia growth by bacterial isolates.

In this study, a total of 281 bacterial isolates obtained from *thua nao*, the Thai fermented soybeans (170 isolates) and rhizosphere soils of five medicinal plants (111 isolates) were used to test against the fungal pathogen *Lasiodiplodia*. Based on dual test (Figure 1), it was found that 39 strains from *thua nao* exhibited antagonistic activity between 25 – 67.5% whereas there were only 2 isolates from rhizosphere soils showing such an activity (45 and 50%). Further experiment was then confirmed using the bacterial-culture supernatant. For this, there were 37 *thua nao* bacterial isolates (17.3 – 52%) and 2 rhizosphere soil bacteria (35.7 and 52.4%) that were able to inhibit the fungal growth. Seven best bacterial strains were selected based on their high inhibitory ability (see Table 1).

Based on cell morphology, all isolates were Gram-positive, endospore-forming bacilli. Further study is now being undertaken to determine the identity of the active compound(s) and the microbial source. These preliminary results prove to be the most promising step before the field trial.

Table 1 Selected bacterial strains isolated from *thua nao* (TN) and rhizosphere soils (RS) exhibiting inhibitory effect on *Lasiodiplodia* growth. The percentage of inhibition calculated as described in the Materials and Methods Section is shown.

Bacterial isolates	Inhibition activity (%)
RS5	52.4
TN79	52
TN112	52
TN117	51.2
TN142	49.4
TN133	47.6
RS3	35.7

References

Daniels, S. 1990. Export development through postharvest quality improvement. Asia Pacific Food Ind. 2: 40-46.

Li, H-Y., R-B. Cao and Y-T. Mu. 1995. *In vitro* inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. Crop Prot. 14: 187-191.

Mortuza, M. G. and L. L. Ilag. 1999. Potential for biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. Biol. Control 15: 235-240.

Norris, J. R., R. C. W. Berkeley, N. A. Logan and A. G. O'Donnell. 1981. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: *The Prokaryotes Vol. 2* (Edited by Starr, M. P., A. Stolp, A. G. Truper, A. Balows and H. G. Schlegel). Springer-Vertag, Berlin. pp. 1711-1742.

Sangchote, S. and S. Sangwanich. 2006. Selection and screening antagonistic yeasts to control crown rot of banana cv. Kluai Hom Thong, caused by *Lasiodiplodia theobromae*. Proc. the 3rd National Technical Seminar on Postharvest / Post Production Technology. October 2005. Petchaburi, Thailand. p. 59-69.