

1. **ชุดโครงการ** : การลดการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยว
2. **โครงการวิจัย** : การจัดการโรคและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวโดยไม่ใช้สารเคมี
3. **ชื่อการทดลอง** : การใช้สารสกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อลดความสูญเสียของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวบุญญวดี จิระวุฒิ	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวผลิตผลเกษตรและแปรรูปผลิตผลเกษตร
ผู้ร่วมงาน : นางอมรา ชินฤติ	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวผลิตผลเกษตรและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นางรัตนา สุทธยาคม	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวผลิตผลเกษตรและแปรรูปผลิตผลเกษตร

5. บทคัดย่อ

โรคผลเน่าของเงาะ (*Nephelium lappaceum* L.) สาเหตุจากการเข้าทำลายของเชื้อราหลายชนิด คือ เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*, *Gliocephalotrichum* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Phomopsis* sp. เป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้คุณภาพของผลเงาะลดลง อายุการเก็บรักษาสั้น งานวิจัยนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ แบคทีเรียปฏิปักษ์แยกจากเมล็ดถั่วลิสง ลำไยอบแห้ง ข้าวหวีของกล้วย และ เมล็ด ถั่วแดง ได้แบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 10 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากการปลูกเชื้อรา *L. theobromae* เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เปรียบเทียบกับพ่นด้วยน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) และ โปรคลอราซ ความเข้มข้น 500 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL9, PN10 และ DL7 สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคผลเน่าของเงาะที่ปลูกเชื้อรา *L. theobromae* ได้ 57.82, 55.82 และ 52.97 % ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ดีกว่าโปรคลอราซ 500 มก./ล.

แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ (PN10, DL7 และ DL9) เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ และสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มาจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดตรวจสอบ API test kit และ เทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่า สายพันธุ์ DL7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* 100.00 % ส่วน PN 10 และ DL 9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย 2 ชนิด 99.91 และ 99.86 % ได้แก่ *Bacillus siamensis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* sub sp. *plantarum* แบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 สามารถสร้างสารต้านเชื้อรา (antifungal) ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเส้นใยและสปอร์

ของเชื้อรา จากการทดสอบในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการแยกสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 บนแผ่น TLC ซึ่งมีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ (65:25:4 v/v/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 3 ตำแหน่ง ที่ Rf เฉลี่ย 0.47, 0.61 และ 0.70 ทำการวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยเครื่อง MS-MS ได้สาร 2 ชนิด คือ iturin และ surfactin เมื่อนำสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 จำนวน 3 สายพันธุ์ มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิง (African green monkey kidney)

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ มาพัฒนาชีวภัณฑ์ในรูปผง 3 รูปแบบ หลังจากเก็บชีวภัณฑ์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สูตรชีวภัณฑ์ที่มีส่วนผสม แป้งข้าวเจ้า 100 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 1 มิลลิลิตร และซูโครส 10 กรัม มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 สูง เท่ากับ 7.55×10^8 , 3.73×10^8 and 8.53×10^7 cfu/g ตามลำดับ ชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะที่ปลูกเชื้อรา *L. theobromae* ได้ดีเช่นเดียวกับการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยตรง

Abstract

Fruit rot disease of rambutan caused by *Lasiodiplodia theobromae*, *Gliocephalotrichum* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp. and *Phomopsis* sp. is the major problem of rambutan which reduces both its quality and shelf life. This research was conducted to study the effectiveness of bacterial antagonists to control fruit rot disease. Bacterial antagonists were isolated from peanut, dried longan, crown of banana and red kidney bean by 10 isolations. The pre-inoculated treatment was conducted by spraying 10 isolates of bacterial antagonists at 10^8 cfu/ml on rambutan fruits for 18 hours comparing with spraying water or prochloraz at 500 mg/l. The experimental design was completely randomized design (CRD). The results showed that DL9, PN10 and DL7 could inhibit disease severity by 57.82, 55.82 and 52.97 % respectively and the efficiency of these bacterial antagonists was better than prochloraz.

The 3 isolates of bacterial antagonist (PN10, DL7 and DL9) were identified as *Bacillus* which were gram-positive rods, endospore-forming and catalase positive. After that three *Bacillus* isolates were submitted for identification using API test kit and molecular analyzes. The identification results were showed that the 16S rDNA gene sequence of DL7 strain was similar to *Bacillus siamensis* by 100 % and PN10 and DL9 were closely related *Bacillus siamensis* and *B. amyloliquefaciens* sub sp. *Plantarum* (99.91 and 99.86 % identity). *Bacillus* 3 isolates (PN10, DL7 and DL9) showed strong antifungal activity in vitro. In this study crude extract from cell free culture supernatant were separated by TLC using chloroform : methanol : water (65 : 25 : 4 v/v/v) as mobile phase. These extracts were tested for their inhibition on the growth of

Colletotrichum gloeosporioides on developed TLC plates. The inhibition zones were found at Rf 0.47, 0.61 and 0.70. Antifungal compounds at these Rf were further analyzed by MS-MS and they were indicated that these compounds were iturin and surfactin. After that crude extract were tested cytotoxicity against Vero cell (African green monkey kidney) and the result showed no cytotoxic.

Three bacterial antagonist strains were individually developed into 3- different powder formulation types. After 6 months of storage at room temperature the survival of them were checked. The result showed that 100 g rice flour mixed with 1 ml soybean oil and 10 g sucrose was the best carrier to maintain bacterial survival. The survival of PN10, DL7 and DL9 were 7.55×10^8 , 3.73×10^8 and 8.53×10^7 cfu/g respectively. Therefore, the efficacy of this biocontrol agent was the same as using bacterial cells.

6. คำนำ

เงาะ (*Nephelium lappaceum* L.) เป็นผลไม้ที่มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั้งภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศ สาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว คือการเข้าทำลายของเชื้อราหลายชนิด และก่อให้เกิดอาการผลเน่า (สมศิริ และคณะ, 2540) มีรายงานว่า พบเชื้อราเข้าทำลายหลายชนิด คือ *Lasiodiplodia theobromae*, *Gliocephalotrichum* spp., *Greeneria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp. (บุญญวดี และสุภา, 2552) ก่อให้เกิดอาการผลเน่าเป็นจุดสีน้ำตาลและเน่าลามอย่างรวดเร็วทั่วทั้งผล จากงานวิจัยของกรมวิชาการเกษตร โดยนักวิชาการสถาบันพืชสวน และศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี ได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว การบรรจุ การขนส่งเงาะ ในกรณีที่มีการขนส่งทางเรือ ที่ใช้ระยะเวลาเกินกว่า 6-11 วัน จำเป็นต้องใช้สารป้องกัน และกำจัดโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อราด้วย เพื่อป้องกันการเน่าเสียจากเชื้อราในเงาะผลสดที่เก็บรักษาในถุง LDPE ที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส จะทำให้ยืดอายุการเก็บรักษาได้ยาวนานขึ้น (กรมวิชาการเกษตร, 2551)

ปัจจุบันเทคโนโลยีการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรได้เจริญก้าวหน้ามากทำให้เกษตรกรสามารถผลิตได้พอเพียงกับความต้องการของผู้บริโภค หลายครั้งที่ผลผลิตมีมากเกินไปความต้องการของผู้บริโภคดังนั้นผู้ผลิต และผู้บริโภคจึงมุ่งเน้นไปที่คุณภาพของผลผลิตโดยเน้นเรื่องความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นหลัก ผู้ผลิตในปัจจุบันให้ความสำคัญกับการลดการใช้สารเคมีในกระบวนการผลิตตั้งแต่แปลงปลูกจนถึงผู้บริโภค เพราะนอกจากเป็นปัญหาของการตลาดภายในประเทศแล้วยังเป็นปัญหาในการส่งออกสินค้าเกษตรไทยไปต่างประเทศด้วยเพราะประเทศคู่ค้าทั้งยุโรปและอเมริกาจะนำเอาเรื่องความปลอดภัยของอาหารมาเป็นเครื่องมือกีดกันทางการค้าด้วย เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่มีอันตรายในการควบคุมโรค จึงได้มีการศึกษาวิจัยหาวิธีการอื่นๆมาใช้ในการควบคุม ได้แก่ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ การใช้สารกระตุ้นความต้านทาน การใช้วิธีทางกายภาพ การใช้สารกลุ่มปลอดภัย (generally recognized as safe, GRAS) และ การใช้สารสกัดจากพืช มาทดแทน การใช้สารเคมี

ป้องกันกำจัดเชื้อราเป็นอันตรายต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค
สภาพแวดล้อม

ก่อให้เกิดปัญหาเรื่องสารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์และ

การควบคุมโรคด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกการยับยั้งหรือควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช 4 รูปแบบ คือ

- 1) การแข่งขัน (Competition) หมายถึง การแข่งขันระหว่างสิ่งมีชีวิตสองหรือมากกว่าสองชนิดที่มาอยู่ร่วมกันในด้านต่างๆ เช่น ที่อาศัย แหล่งอาหาร โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะไปแย่งอาหารและพื้นที่ในการเจริญเติบโตกับเชื้อโรค
- 2) การสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiotic) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สร้างสารเคมีที่มีผลยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเชื้อโรค
- 3) การเป็นปรสิต (Parasitism) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเข้าทำลายเชื้อโรคพืช เช่น เชื้อรา ไตรโคเดอร์มาพันธุ์และแทงเข้าไปในเส้นใยของเชื้อโรคพืช เส้นใยเชื้อโรคพืชที่ถูกพันธุ์จะเกิดช่องว่างหรือเหี่ยวแห้งแล้วสลายตัวไปในที่สุด เป็นต้น
- 4) การชักนำให้ต้านทานต่อโรค (Induced resistance) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปกระตุ้นให้ผลิตผลสร้างความต้านทานต่อเชื้อโรค มีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิดในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยว จากการศึกษาของวารินและคณะ (2548) ทดสอบเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของแตงกวา สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *L. theobromae* ได้สูง 79 เปอร์เซ็นต์ และใช้สารสกัดจากเชื้อรา *T. harzianum* strain T- 35-wt ความเข้มข้น 1,000 ppm ควบคุมโรคผลเน่าของเงาะพันธุ์โรงเรียน พบว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพสูงมากในการควบคุมโรค โดยพบความรุนแรงของโรคเพียง 12.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุม (เมทานอล ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) มีความรุนแรงของโรค 79.5 เปอร์เซ็นต์ และทศวรรณ (2547) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ผิวพืชจากส่วนต่างๆ ของทรงพุ่มต้นเงาะ ในการควบคุมการเกิดโรคผลเน่าที่เกิดจากรา *L. theobromae* พบว่า ยีสต์ *Candida krusei* (ไอโซเลท 44-52/2) แสดงประสิทธิภาพที่ดีในการควบคุมการเกิดโรค เมื่อมีการใช้ยีสต์ก่อนการปลูกราสาเหตุของโรค โดยมีการยับยั้งการเกิดโรค 42.6 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้มีการใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารต้านเชื้อรา ในการควบคุมโรคผลเน่าหลังเก็บเกี่ยวกับผลไม้หลายชนิด เช่น การใช้แบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 ร่วมกับ น้ำมันตะไคร้ ในสภาพบรรยากาศดัดแปร (MAP) ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลพืชได้ดี (Arrebola *et al.*, 2009) วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อหาวิธีการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพ ทดแทนการใช้สารเคมี เพื่อลดการเน่าเสีย ยืดอายุการเก็บรักษา และส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ผลเงาะพันธุ์โรงเรียน
2. เอทิล แอลกอฮอล์ (ethyl alcohol), สารอิมาซาลิล (imazalil), คลอโรกซ์ (Clorox), เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate), เมทิล แอลกอฮอล์ (methyl alcohol),
3. อาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA) , อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย NA (Nutrient Agar), NB (Nutrient Broth), TSB (Tryptic Soy Broth)
4. ผงทาลคัม, แคลเซียม, carboxymethyl cellulose (CMC), magnesium sulfate
5. น้ำมันฝรั่ง น้ำมันถั่วเหลือง แป้งข้าวเจ้า ซูโครส
6. จานเลี้ยงเชื้อ กระบอกตวง ปีกเกอร์ หลอดทดลอง
7. เข็มเขี่ยเชื้อ ปากคืบ กรรไกร มีด
8. ตะกร้า ถังพลาสติก ถังพลาสติก
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
10. พาราฟิล์ม กระดาษทิชชู กระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษฟาง
11. ปิเปตต์ (pipettes)
12. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
13. กล้องจุลทรรศน์
14. กล้องจุลทรรศน์ แบบสเตอริโอ
15. ตู้ฆ่าเชื้อแบบความร้อนแห้ง (Hot air oven)
16. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
17. นาฬิกาจับเวลา
18. ตู้เขี่ยเชื้อ
19. แผ่น thin layer chromatography (TLC)

วิธีการ

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ

นำผลเงาะที่เน่าเสียหลังเก็บเกี่ยว มาแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าด้วยวิธี tissue transplanting โดยตัดเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อที่แสดงอาการของโรคผลเน่า ขนาด 5x5 ตารางมิลลิเมตร นำชิ้นเนื้อเยื่อแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ (clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที แล้วนำมาวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อ แยกเชื้อราจนได้เชื้อบริสุทธิ์

บันทึกลักษณะของเชื้อราและจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรค และลักษณะอาการของโรคผลเน่าของเงาะที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุแต่ละชนิด

2. คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์

2.1 การแยกแบคทีเรียจากผลิตผลเกษตร

แยกแบคทีเรียจากผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว เช่น ถั่วลิสง ถั่วแดง ลำไยอบแห้ง และกล้วยหอม เป็นต้น โดยวิธี tissue transplanting นำชิ้นเนื้อเยื่อหรือเมล็ดแช่ในคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที วางชิ้นเนื้อเยื่อหรือเมล็ดในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา สังเกตจากการเกิดบริเวณยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้น

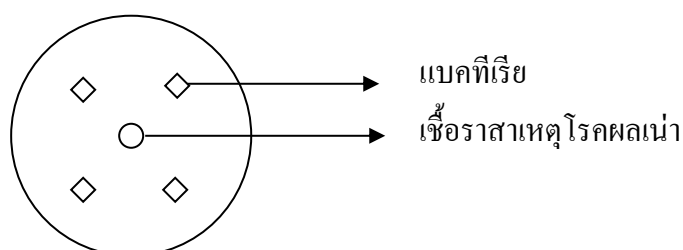
2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี Dual culture test วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) เปรียบเทียบ 11 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ โดยการนำเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมง มาตะบับบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 จุด (ภาพที่ 1) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [(A - B) / A] \times 100$$

A = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA (กรรมวิธีควบคุม)

B = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่มีแบคทีเรียบนอาหาร 4 จุด (แบคทีเรีย 10 สายพันธุ์)

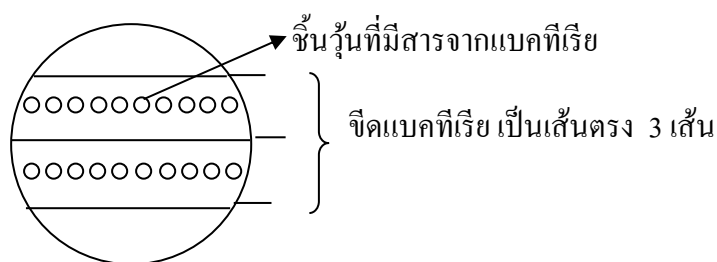


ภาพที่ 1 ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค (Dual culture test)

2.3 ทดสอบประสิทธิภาพสารจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ

2.3.1 เตรียมสารจากแบคทีเรีย

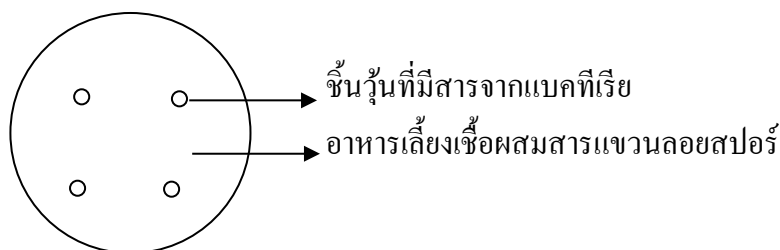
นำแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาเลี้ยงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) อายุ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแบคทีเรียมาขีดเป็นเส้น 3 เส้น ห่างเท่ากัน ในจานเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน ตัดชิ้นวันที่มีสารจากแบคทีเรีย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2) สำหรับนำมาวางในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ



ภาพที่ 2 การเตรียมสารจากแบคทีเรียปฏิบัติการ

2.3.2 ทดสอบสารจากแบคทีเรีย

นำเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จนสร้างสปอร์ ใส่น้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้ spatula stainless ขูดสปอร์บริเวณผิวหน้าของอาหาร กรองผ่านผ้าขาวบางที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำสารแขวนลอยสปอร์ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุ่น เขย่าให้สปอร์และอาหารเลี้ยงเชื้อผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเทอาหารที่ผสมสปอร์ของเชื้อรา ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้จนอาหารแข็ง นำชั้นวุ้นที่มีสารจากแบคทีเรีย วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 จุด (ภาพที่ 3) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (clear zone)



ภาพที่ 3 ทดสอบสารจากแบคทีเรียในการยับยั้งสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค

2.4 ทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารจากแบคทีเรียปฏิบัติการ (cell free culture supernatant)

เตรียมสารจากแบคทีเรียปฏิบัติการโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Nutrient Broth (NB) จำนวน 10 สายพันธุ์ นำไปเขย่าบนเครื่อง rotary shaker ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำไปปรับให้มีความเข้มข้น $OD_{600} = 0.2$ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำ cell culture ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสซึ่งมีสารที่แบคทีเรียสร้าง (cell free culture supernatant) นำไปใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ โดยนำเมล็ดข้าวเปลือกและเมล็ดถั่วเขียวแช่ในสารละลายส่วนใสที่แยกแบคทีเรียออก เป็นเวลา 5 นาที และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเมล็ดมาวางบนกระดาษเพาะขึ้นในกล่องพลาสติก เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวเปลือก และเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ บันทึกผลการงอกของเมล็ด (%)

3. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมที่เกิดจากการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ

นำผลเงาะที่สมบูรณ์ และไม่เป็นโรค จากสวนจังหวัดจันทบุรี ทำแผลโดยการตัดขนเงาะ 1 เส้น จากนั้นปลูกเชื้อรา *L. theobromae* (เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าที่ทำให้เกิดอาการของโรครุนแรง) ลงบนผลเงาะ โดยนำชิ้นวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วัน วางคว่ำผิวหน้าวุ้นลงที่บริเวณแผลที่ตัดขนเงาะออก เรียงใส่ตะกร้าหุ้มถุงพลาสติกที่พันด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำชิ้นวุ้นออก หลังจากนั้นนำผลเงาะมาพ่นด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิชีวนะ 10 สายพันธุ์ คือ PN2, PN-A3, PN-A5, PN7, PN 10, PN12, DL7, DL9, BA1 และ BP ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml บนผลเงาะ เปรียบเทียบกับพ่นน้ำ และ อิมาซาลิล 500 มิลลิกรัม/ลิตร ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำผลเงาะเก็บใส่ถุงยัดอายุผักและผลไม้ ชนิด M2 ขนาด 7×10 นิ้ว จำนวนถุงละ 6 ผล ซิลปากถุงพลาสติก เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) เปรียบเทียบ 12 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำๆ ละ 6 ผล ตรวจความรุนแรงของโรค โดยวัดขนาดของแผลบริเวณที่ปลูกเชื้อรา *L. theobromae* และนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความรุนแรงของโรคโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความรุนแรงของโรค} = [(A - B) / A] \times 100$$

A = ค่าเฉลี่ยของขนาดแผลบนผลเงาะที่พ่นด้วยน้ำ (กรรมวิธีควบคุม)

B = ค่าเฉลี่ยของขนาดแผลบนผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิชีวนะ 10 สายพันธุ์ และอิมาซาลิล 500 มก./ล.

3.2 ศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลเงาะหลังการเก็บรักษา

นำผลเงาะที่สมบูรณ์ และไม่เป็นโรค จากสวนจังหวัดจันทบุรี พ่นด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิชีวนะ 10 สายพันธุ์ คือ PN2, PN-A3, PN-A5, PN7, PN 10, PN12, DL 7, DL9, BA1 และ BP ความเข้มข้น $OD_{600} = 0.2$ บนผลเงาะ เปรียบเทียบกับพ่นน้ำ และ อิมาซาลิล 500 มิลลิกรัม/ลิตร ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำผลเงาะเก็บใส่ถุงยัดอายุผักและผลไม้ ชนิด M2 ขนาด 7×10 นิ้ว จำนวนถุงละ 6 ผล ซิลปากถุงพลาสติก เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) เปรียบเทียบ 12 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำๆ ละ 6 ผล

บันทึกผลการทดลอง

3.2.1 วัดความแน่นเนื้อ (firmness) ของผลเงาะ โดยใช้เครื่อง texture analyzer ยี่ห้อ Chatillon รุ่น 10 LBF ประเทศสหรัฐอเมริกา หัววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร โดยวางหัววัดให้ตั้งฉากกับผลเงาะ กดลงบนเปลือก และเนื้อเงาะที่ปอกเปลือกแล้ว บริเวณกลางผล และตั้งระยะทางให้หัวกดแทงทะลุลงไปในเนื้อและเปลือกเงาะ เท่ากับ 5 มิลลิเมตร รายงานผลเป็นหน่วยนิวตัน (N)

3.2.2 ปริมาณของแข็งละลายในน้ำได้ วัดโดยการหยดน้ำคั้นจากผลเงาะลงบนเครื่อง Digital refractometer ยี่ห้อ Atago รุ่น 10 PAL ประเทศญี่ปุ่น ค่าที่อ่านได้มีหน่วยวัดเป็นองศาบริกซ์

3.2.3 การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกของผลเงาะ วัดสีผลเงาะด้วยเครื่องวัดสี (Minolta Model DP-301) ในการวัดใช้หัววัดแนบให้สัมผัสกับผิวของผลเงาะ โดยวาง probe ให้ตั้งฉากกับผลเงาะ บริเวณกลางผล รายงานผลเป็นค่า Hunter's scale ซึ่งประกอบด้วยค่าต่างๆ ดังนี้

ค่า L เป็นค่าที่รายงานถึงความสว่างของสี มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100 ถ้าค่า L สูงหมายถึงมีความสว่างมาก แต่ถ้าค่า L ต่ำ หมายถึง มีสีเข้มมากกว่าสว่างน้อย

ค่า a เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีเขียว-แดง ค่า a เป็นลบแสดงว่ามีช่วงสีเขียว แต่ถ้า a เป็นบวก แสดงว่าอยู่ในช่วงสีแดง

ค่า b เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีน้ำเงิน-เหลือง ค่า b เป็นลบแสดงว่ามีช่วงสีน้ำเงิน แต่ถ้า b เป็นบวก แสดงว่าอยู่ในช่วงสีเหลือง

4. จำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือก

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ (จากข้อ 3.1) จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 เลี้ยงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA รูปร่างของเซลล์ และการติดสี โดยการย้อมสีแบบแกรม แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

วิธีการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) ทำความสะอาดสไลด์ เช็ดให้แห้ง แล้ว smear แบคทีเรียโดยใช้ลูปจุ่มน้ำตะบองสไลด์ แล้วใช้ลูปที่ฆ่าเชื้อเชี่ยแบคทีเรียมาเพียงเล็กน้อย และเชื่อบนหยดน้ำ แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายออกมาเป็นวงเล็กๆ ทิ้งให้แห้ง จากนั้นทำการตรึง (fixing of the smear) เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียติดแน่นกับสไลด์ โดยนำสไลด์ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง แล้วหยดสี crystal violet ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีทิ้ง หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยแอลกอฮอล์ 95 % นาน 15 วินาที ล้างผ่านน้ำไหลเบาๆ หยดสี safranin O ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตรวจดูการติดสีแกรม แกรมบวก (Gram positive) ย้อมติดสีม่วง (น้ำเงิน) และแกรมลบ (Gram negative) ย้อมติดสีแดง

4.2 การศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี

4.2.1 ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase)

เตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่นเดียวกับข้อ 4.1 หยดไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนสไลด์ที่สะอาดและแห้ง ใช้ลูปแตะแบคทีเรีย 2 ลูป และลงในหยดของไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์ ใช้ลูปกวนให้เข้ากัน บันทึกผลการเกิดฟองก๊าซ

ผลบวก เกิดฟองก๊าซขึ้นทันที แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส

ผลลบ ไม่เกิดฟองก๊าซ หรือไม่เกิดฟองก๊าซขึ้นทันที แสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส

4.2.1 จำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Test Kits 50 CHB

นำแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียลงในสารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใน eppendorf ผสมให้เข้ากัน เพื่อใช้เป็น stock culture ดูดแบคทีเรียลงในสารละลาย medium ให้มีความขุ่นโดย วัดค่าการดูดกลืนแสง $OD_{600} = 0.451$ (หรือเทียบกับ standard 2 McFarland)

นำ Strip ของ API 50 CH มาเรียงลำดับจาก 0 จนถึง 49 นำมาใส่กล่องสำหรับ incubate ที่เติมน้ำกลั่น (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ลงในหลุมทุกหลุมของถาดล่างของกล่อง incubate เรียบร้อยแล้ว หลังจากนั้นดูดเชื้อจาก medium ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงใน strip จำนวน 50 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการอ่านและบันทึกผล หลังจากบ่ม 18 และ 24 ชั่วโมง

ผลการทดสอบที่เป็นบวกเกิดขึ้นเนื่องจาก phenol red ที่ใส่ในอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีแดงเป็นสีเหลือง เนื่องจากสภาพความเป็นกรดในอาหาร สำหรับหลุมที่ 25 (Esculin test) อาหารจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีดำ

บางครั้งผล positive อาจเปลี่ยนเป็น negative ได้ ในการอ่านค่าผลครั้งที่ 2 เนื่องจากการผลิต ammonia จาก peptone ซึ่งมีผลให้อาหารเป็นกลาง ดังนั้นให้บันทึกผลที่ได้เป็น positive

บันทึกผล และแปลผลโดยใช้โปรแกรม APIWEB ในการวิเคราะห์ เพื่อจำแนกสกุล และสปีชีส์ของแบคทีเรีย

4.3 จำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยส่งตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียปฏิกิริยา เพื่อจัดจำแนกจุลินทรีย์ ที่ห้องปฏิบัติการ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

4.3.1 สกัด genomic DNA ของแบคทีเรียปฏิกิริยา 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 โดยใช้ Genomic DNA mini kit (Blood/culture cell) (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) เพิ่มปริมาณ 16S rDNA gene ของดีเอ็นเอของแบคทีเรียปฏิกิริยา โดยใช้ primer 20F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') และ 1500R (GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3')

โปรแกรม PCR running condition

Initial denature	94	องศาเซลเซียส	3 นาที	} จำนวน 25 รอบ
Denature	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	50	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	2 นาที	
Final extension	72	องศาเซลเซียส	3 นาที	

4.3.2 ตรวจสอบ PCR product โดย 0.8 % (w/v) agarose gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) เก็บ PCR product ที่บริสุทธิ์ ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.3.3 นำ PCR product ที่บริสุทธิ์ ไปหาลำดับเบสโดยเครื่อง ABI Prism® 3730XL DNA Sequence

4.3.4 Sequence analyses โดยนำลำดับเบสที่ได้จาก primer ทุกตัว มาวิเคราะห์โดยใช้ Cap contig assembly program ใน BidEdit (Biological sequence alignment editor) Program แล้วนำมา จำแนก phylogenetic neighbors โดยใช้ BLASTN program

5. การผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และ โปรตีเอส ของแบคทีเรียปฏิปักษ์

เตรียมแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PN10, DL7 และ DL9 เลี้ยงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ เอนไซม์อะไมเลส (amylase), เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และ โปรตีเอส (protease)

สูตรอาหารสำหรับทดสอบเอนไซม์โปรตีเอส

nutrient agar	23 กรัม
กรีกเซอร์อล	20 กรัม
skim milk	10 กรัม
น้ำ	1,000 มิลลิลิตร

สูตรอาหารสำหรับทดสอบเอนไซม์อะไมเลส

tryptic soy agar	40 กรัม
soluble starch	4 กรัม
น้ำ	1,000 มิลลิลิตร

ตรวจผลการทดลอง โดยราดผิวหน้าด้วยสารละลายไอโอดีน

สูตรอาหารสำหรับทดสอบเอนไซม์เซลลูเลส

nutrient agar	23 กรัม
CMC	2 กรัม
น้ำ	1,000 มิลลิลิตร

ตรวจผลการทดลอง โดยราดผิวหน้าด้วยสารละลาย congo red เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/

มิลลิลิตร นาน 15 นาที ล้างออกด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้น 1 โมลาร์

เตรียมอาหารสูตรต่างๆ ใส่ขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารสูตรต่างๆ ลงในจานเลี้ยงเชื้อ รองอาหารแข็ง เจาะอาหารด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุม/จานเลี้ยงเชื้อ สำหรับหยดสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

บันทึกผล โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Co) และเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี (Cz) เปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง Cz/Co ของแบคทีเรีย แต่ละสายพันธุ์

6. ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียปฏิปักษ์

6.1 แยกสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกด้วย thin layer chromatography (TLC)

เตรียมสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PN10, DL7 และ DL9 ในอาหาร Nutrient Broth (NB) นำไปเขย่าบนเครื่อง rotary shaker ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นนำแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสซึ่งไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำไปแยกสารโดยการเติมเอทิล อะซิเตท ในปริมาณที่เท่ากันในกรวยแยก เขย่าให้เข้ากัน แล้วปล่อยให้ตกชั้นจนสารแยกออกเป็น 2 ชั้น แยกเอาส่วนของเอทิล อะซิเตท ซึ่งอยู่ด้านบนออกมา ทำการระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยใช้อุณหภูมิ water bath 40 °C จนแห้ง ได้สารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ ไปจุดลงบนแผ่น TLC plate โดยใช้ capillary tube ปล่อยให้สารระเหยจนแห้ง นำแผ่น TLC ใส่ในโถแก้วที่มีฝาปิดบรรจุสารละลายอิ่มตัวของสารละลายอิ่มตัว คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ (65:25:4 v/v/v) ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงจุดที่กำหนด นำแผ่น TLC ออกจากโถแก้ว ทิ้งไว้จนสารละลายระเหยไปหมด

นำแผ่น TLC ที่แยกสารสกัดหยาบแล้ว มาตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ฉีดพ่นลงบนแผ่น TLC ด้วยเครื่อง airbrush หลังจากพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราทั่วทั้งแผ่น TLC แล้ว นำแผ่น TLC ไปไว้ในกล่องความชื้น เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 – 4 วัน ตรวจสอบบริเวณแถบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา บันทึกผลเป็นค่า Rf

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}$$

6.2 ศึกษาองค์ประกอบของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ

นำส่วนที่แยกได้จากแผ่น TLC ที่มีสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา (ข้อ 6.2) มาทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสาร ด้วยเครื่องมือ Bruker Daltonics - micrOTOF - benchtop ESI-TOF MS ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

7. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเซลล์

เตรียมสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ (วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 6.1) นำสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์มาทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ ส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) โดยใช้วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney) ตรวจสอบผลการนับเซลล์ไตลิงที่มีชีวิตที่ติดฉลากด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green Fluorescent Protein based assay)

8. การพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปแบบสารชีวภัณฑ์

เตรียมแบคทีเรียปฏิบััษที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PN10, DL7 และ DL9 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) 300 มิลลิลิตร เขย่า 130 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง 3,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที นำเฉพาะเซลล์ของแบคทีเรียมาทำการเจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ให้มีค่า OD เท่ากับ 1 ที่ความยาวของคลื่นแสง 600 นาโนเมตร

เตรียมส่วนผสมของชีวภัณฑ์ จำนวน 3 สูตร

สูตรที่ 1 นำแบคทีเรียปฏิบััษ 20 มิลลิลิตร มาผสมกับ magnesium sulfate 2.47 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ml ตั้งทิ้งไว้ 15-20 นาที หลังจากนั้นเติม carboxymethyl cellulose (CMC) 2.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ml ผสมให้เข้ากัน ผสมผง talcum น้ำหนัก 100 g คลุกเคล้าให้เข้ากัน (ดัดแปลงสูตรของกลุ่มงาน บั๊กเทรียวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช)

สูตรที่ 2 นำปลั้ม 60 กรัม แคลเซียม 30 กรัม CMC (carboxymethylcellulose) 8 กรัม และ น้ำมันฝรั่ง 2 มิลลิลิตร นำมาผสมรวมกัน หลังจากนั้นนำแบคทีเรีย 20 มิลลิลิตร มาผสมให้เข้ากัน (ดัดแปลงสูตรของ วราภรณ์, 2553)

สูตรที่ 3 แป้งข้าวเจ้า 100 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 1 ml และซูโครส 10 กรัม นำมาผสมรวมกัน หลังจากนั้นนำแบคทีเรีย 20 มิลลิลิตร มาผสมให้เข้ากัน (ดัดแปลงสูตรของ ณิชกานต์, 2554)

หมายเหตุ สารทุกชนิดนำมาฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบความชื้นความดันสูง (autoclave) 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งห่างกัน 1 วัน

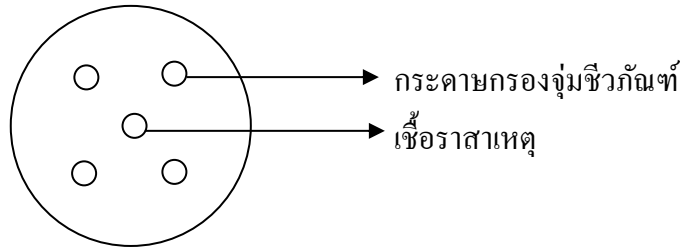
นำส่วนผสมในแต่ละสูตรไปทำให้แห้ง โดยใช้เตาอบอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาบดให้ละเอียด นำชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิบััษสูตรต่างๆ ที่ผลิตได้แบ่งใส่ถุงพอยล์ 15 กรัม/ถุง เก็บที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

นำชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิบััษสูตรต่างๆ มาตรวจปริมาณของแบคทีเรียปฏิบััษด้วยวิธี dilution plate count (ผงเชื้อสูตรสำเร็จ 1 กรัม ต่อน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร) แล้วนำสารแขวนลอยแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร มาหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร จำนวนความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย หลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้อง ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ทุก 1 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน

9. ทดสอบชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบััษต่อการยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ

นำชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบััษ 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PN 10, DL7 และ DL9 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี Dual culture test วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) เปรียบเทียบ 5 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ โดยนำชีวภัณฑ์แบคทีเรีย จำนวน 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นหนึ่ง 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ผ่านการฆ่าเชื้อ มาจุ่มในสารแขวนลอยของชีวภัณฑ์ที่มีแบคทีเรีย แล้วนำมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 4 จุด หลังจากนั้นวางเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4) เปรียบเทียบกับการวาง

เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะเพียงอย่างเดียว (กรรมวิธีควบคุม) และอิมาซาลิล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4 ทดสอบชีวภัณฑ์แบคทีเรียต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค (Dual culture test)

บันทึกผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย} = [(A - B) / A] \times 100$$

A = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA (กรรมวิธีควบคุม)

B = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่มีชีวภัณฑ์แบคทีเรียบนอาหาร 4 จุด (3 สายพันธุ์) และ อิมซาลิลบนอาหาร 4 จุด

10. ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัติการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ

10.1 ทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัติการควบคุมที่เกิดจากการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ

นำผลเงาะที่สมบูรณ์ และไม่เป็นโรค ทำแผลโดยการตัดขนเงาะ 1 เส้น จากนั้นทำการปลูกเชื้อรา *L. theobromae* โดยนำชิ้นวัสดุขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วัน วางคว่ำผิวหน้าวูลงที่บริเวณแผลที่ตัดขนเงาะออก เรียงใส่ตะกร้าคลุมด้วยถุงพลาสติกที่พันด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำชิ้นวูลอก เตรียมสารชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิบัติการ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PN 10, DL 7 และ DL9 ความเข้มข้นของแบคทีเรีย 10^8 cfu/ml จำนวน 10 กรัม ผสมน้ำ 200 มิลลิลิตร นำมารองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำมาพ่นลงบนผลเงาะ เปรียบเทียบกับพ่นน้ำ และ อิมซาลิล 500 มิลลิกรัม/ลิตร ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำผลเงาะเก็บใส่ถุงยัดอายุผักและผลไม้ ชนิด M2 ขนาด 7×10 นิ้ว จำนวนถุงละ 6 ผล ซิลปากถุงพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด เปรียบเทียบ 5กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ บันทึกโดยวัดขนาดของแผลที่แสดงอาการของโรค

10.2 ศึกษาผลของการใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัติการต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลเงาะหลังการเก็บรักษา

นำผลเงาะที่สมบูรณ์ และไม่เป็นโรค จากสวนจังหวัดจันทบุรี พ่นด้วยชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิบัติการ จำนวน 3 สายพันธุ์ (เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 10.1) แล้วนำมาพ่นลงบนผลเงาะ เปรียบเทียบกับพ่นน้ำ และ อิมซาลิล 500 มิลลิกรัม/ลิตร ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำผลเงาะเก็บใส่ถุงยัดอายุผักและผลไม้ ชนิด M2 ขนาด 7×10 นิ้ว จำนวนถุงละ 6 ผล ซิลปากถุงพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

บันทึกผลการทดลอง

10.2.1 วัดความแน่นเนื้อ (firmness) ของผลเงาะ โดยใช้เครื่อง texture analyzer ยี่ห้อ Chatillon รุ่น 10 LBF ประเทศสหรัฐอเมริกา หัววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร โดยวางหัววัดให้ตั้งฉากกับผลเงาะ กดลงบนเปลือก และเนื้อเงาะที่ปอกเปลือกแล้ว บริเวณกลางผล และตั้งระยะทางให้หัวกดแทงทะลุลงไปเนื้อและเปลือกเงาะ เท่ากับ 5 มิลลิเมตร รายงานผลเป็นหน่วยนิวตัน (N)

10.2.2 ปริมาณของแข็งละลายในน้ำได้ วัดโดยการหยดน้ำคั้นจากผลเงาะลงบนเครื่อง Digital refractometer ยี่ห้อ Atago รุ่น 10 PAL ประเทศญี่ปุ่น ค่าที่อ่านได้มีหน่วยวัดเป็นองศาบริกซ์

10.2.3 การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกของผลเงาะ วัดสีผลเงาะด้วยเครื่องวัดสี (Minolta Model DP-301) ในการวัดใช้หัววัดแนบให้สัมผัสกับผิวของผลเงาะ โดยวาง probe ให้ตั้งฉากกับบริเวณกลางผลเงาะ รายงานผลเป็นค่า Hunter's scale ซึ่งประกอบด้วยค่าต่างๆ ดังนี้

ค่า L เป็นค่าที่รายงานถึงความสว่างของสี มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100 ถ้าค่า L สูงหมายถึงมีความสว่างมาก แต่ถ้าค่า L ต่ำ หมายถึง มีสีเข้มมากกว่าสว่างน้อย

ค่า a เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีเขียว-แดง ค่า a เป็นลบแสดงว่ามีช่วงสีเขียว แต่ถ้า a เป็นบวก แสดงว่าอยู่ในช่วงสีแดง

ค่า b เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีน้ำเงิน-เหลือง ค่า b เป็นลบแสดงว่ามีช่วงสีน้ำเงิน แต่ถ้า b เป็นบวก แสดงว่าอยู่ในช่วงสีเหลือง

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ

โรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยว มีสาเหตุจากเชื้อราหลายชนิด คือ *Lasiodiplodia theobromae*, *Gliocephalotrichum* spp., *Greeneria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phomopsis* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. (ภาพ 5) ซึ่งตรงกับการศึกษาของสมศิริและคณะ (2540) เชื้อราที่เข้าทำลายผลเงาะจากภาคตะวันออกและภาคใต้เกิดจากเชื้อที่เหมือนกันคือ *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *L. theobromae*, *G. bulbilium*, *Greeneria* sp. และ *C. gloeosporioides*

ลักษณะของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยว

1. เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

ลักษณะโคโลนี (colony) ของเชื้อราบนอาหาร PDA เส้นใยฟูสีเทาอ่อนถึงดำ เชื้อราสร้างฟรุตติงบอดี (fruiting body) แบบพิกนิตีเดีย (pycnidia) มีช่องเปิด (ostiole) ยื่นออกมา ภายในพิกนิตีเดียประกอบด้วยเส้นใยพาราไฟซิส (paraphyses) ใสไม่มีสี และโคนิดิโอฟอร์ (conidiophores) ให้กำเนิดโคนิดี (conidia) โคนิดีในระยะแรกมีสีใส เซลล์เดี่ยว รูปไข่ (oblong) ถึงยาวรี จนถึงค่อนข้างกลม ปลายด้านหนึ่งกลมมน เมื่อโคนิดีแก่จะสร้างผนังกัน (septum) แบ่งเป็นสองเซลล์ มีรูปร่างรีคล้ายไข่ ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเป็นริ้วในแนวยาว

2. เชื้อรา *Gliocephalotrichum bulbilium*

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA สร้างเส้นใยสีเหลืองอ่อนเจริญเป็นวงซ้อนกัน กลุ่มของโคนิดีมีสีเหลืองเกิดการจัดกระจายบนผิวหน้าวุ้นเป็นจำนวนมาก โคนิดีมีรูปร่างกลมรีเหมือนไข่ เกิดบนโคนิดีลเฮด (conidial head) แตกกิ่งก้านแบบเพนิซิลเลท (penicillate) และมีการสร้างแคลมิดอสปอร์ (chlamydospore) เป็นแบบหลายเซลล์ (multicellular) มีสีน้ำตาลเข้ม

3. *Greeneria* sp.

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA สร้างเส้นใยสีขาวหนาฟูเล็กน้อย หรือค่อนข้างแบนราบ โคโลนีเจริญเป็นวงคล้ายกลีบดอกเบญจมาศ ต่อมา มีการสร้างกลุ่มของโคนิดีสีเขียวเข้มจนถึงสีดำ เป็นจำนวนมาก กระจัดกระจายอยู่บนผิวหน้าของโคโลนี เชื้อราสร้างฟรุตติงบอดี แบบอะเซอวูลัส (acervulus) ภายในสร้างโคนิดีจำนวนมาก โคนิดีมีรูปร่างท่อนยาวรี ใสไม่มีสี

4. *Colletotrichum gloeosporioides*

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA ขอบเรียบเจริญเป็นวงแหวน (concentric ring) เส้นใยมีสีขาวอมเทา ฟูเล็กน้อย สร้างกลุ่มโคนิดีมีสีส้มบริเวณกลางโคโลนี เชื้อราสร้างฟรุตติงบอดี แบบอะเซอวูลัส โคนิดิโอฟอร์เป็นก้านตรง เซลล์เดี่ยว ใส ไม่มีสี ที่ปลายโคนิดิโอฟอร์ให้กำเนิดโคนิดี โคนิดีมีเซลล์เดี่ยว ใส ไม่มีสี รูปไข่ ถึงทรงกระบอก หัวท้ายมน เมื่อโคนิดีงอก สร้างแอฟเพรสซอเรีย (appressoria) รูปทรงกระบอก

5. *Phomopsis* sp.

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA สร้างเส้นใยสีขาวจนถึงน้ำตาลอ่อน เส้นใยค่อนข้างหยาบเรียบกับผิวอาหาร เชื้อราสร้างพิกนิตีเดีย สีดำกระจายทั่วโคโลนี เชื้อราสร้างฟรุตติงบอดี แบบพิกนิตีเดีย ผนังหนา สี

น้ำตาลถึงดำ รูปร่างกลม อาจมีช่องเดียวหรือหลายช่อง ภายในพิกนเดียสร้างโคนิดิโอฟอร์สสีอ่อน แตกแขนงมีผนังกัน สร้างโคนิเดีย 2 แบบ คือ อัลฟา โคนิเดีย (alpha conidia) มีเซลล์เดียว ใสไม่มีสี รูปไข่ และเบต้า โคนิเดีย (beta conidia) ใสไม่มีสี เซลล์เดียว รูปร่างเป็นเส้นยาว ส่วนปลายโค้งงอคล้ายตะขอ (filiform)

6. *Pestalotiopsis* sp.

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA สร้างเส้นใยมีสีขาวนวลถึงสีน้ำตาลอ่อนเส้นใยหยาบ พูเล็กน้อย พบกลุ่มของโคนิเดียมีสีดำมันเยิ้มกระจายอยู่ทั่วโคโลนี เชื้อราสร้างฟรุตติงบอดี แบบอะเซอวูลัส ภายในมีโคนิดิโอฟอร์ส ยาวเรียว บางใส ไม่แตกกิ่งก้าน โคนิเดียมีหลายเซลล์ ส่วนใหญ่มี 5 เซลล์ เซลล์ส่วนหัวและท้ายมีลักษณะแหลมเรียวไม่มีสี แต่เซลล์บริเวณกลาง 3 เซลล์จะมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ มีรยางค์ (appendage) ยื่นออกไปที่ปลาย 2 เส้นหรือมากกว่า

ลักษณะอาการของโรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยว

ลักษณะภายในผลเงาะที่เป็นโรคผลเน่า ผลเงาะที่แสดงอาการของโรคในระยะแรกไม่รุนแรง เปลือกเงาะด้านในเป็นสีน้ำตาลอ่อน ส่วนของเนื้อเงาะยังมีสีขาว ไม่มีน้ำเยิ้ม เมื่อผลขยายลูกกลมมากขึ้น เปลือกเงาะด้านในเป็นสีน้ำตาลเหลืองขยายลามใกล้เคียงกับเปลือกที่แสดงอาการด้านนอก เนื้อเงาะจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนจนถึงสีน้ำตาลอมเหลือง เนื้อจะนิ่มและละ มีน้ำเยิ้ม และมีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว

1. ลักษณะอาการของโรค ที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*

อาการเริ่มแรกจะเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อนขยายไปตามเปลือกเงาะ ต่อมาแผลจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มอย่างรวดเร็ว และสร้างเส้นใยสีขาวยาวพูนขนาดแผล เปลือกของผลเงาะจะเปลี่ยนเป็นสีดำทั่วทั้งผลและมีเส้นใยสีขาวยาวเจริญครอบคลุมทั่วทั้งผลอย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 3-4 วัน แต่ลักษณะของเส้นใยจะไม่เจริญฟูเหมือนเส้นใยของเชื้อรา *Gliocephalotrichum* spp. ที่เจริญบนผลเงาะ

ลักษณะภายในผล เชื้อราเริ่มเข้าทำลายส่วนเปลือกด้านนอก หลังจากนั้นจะขยายลามออกไปเพิ่มขึ้น และเข้าทำลายถึงเปลือกด้านใน จนถึงเนื้อเงาะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนจนถึงสีน้ำตาล เนื้อเงาะนิ่มและละ มีน้ำเยิ้ม มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว

2. ลักษณะอาการของโรค ที่เกิดจากเชื้อรา *Gliocephalotrichum* spp.

อาการเริ่มแรกเป็นจุดสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำขยายวงกว้างขึ้น ต่อมาเชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวยาวเจริญบริเวณแผลและเจริญไปตามเส้นขนของผลเงาะโดยมีลักษณะเป็นปุยฟู บางครั้งพบเส้นใยสีขาวแกมเหลืองเจริญครอบคลุมทั่วทั้งผลอย่างรวดเร็ว บริเวณใกล้เคียงจะมีกลุ่มของแคลมิโดสปอร์ มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ สีเหลืองเจริญเป็นจำนวนมากบนเปลือกเงาะ

ลักษณะภายในผล เชื้อราเข้าทำลายเปลือกด้านนอก ในช่วงแรกจะยังไม่ลามถึงเปลือกด้านใน จนกระทั่งมีอาการเพิ่มมากขึ้น เมื่อเชื้อจะผ่านมาถึงด้านในของเปลือก จะเข้าทำลายส่วนของเนื้อเงาะอย่างรวดเร็ว เนื้อเงาะจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลอมเหลือง มีลักษณะนิ่ม น้ำเยิ้มสีเหลือง มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว

3. ลักษณะอาการของโรค ที่เกิดจากเชื้อรา *Greeneria* sp.

เนื้อเยื่อรอบบริเวณที่เชื้อราเข้าทำลายเป็นสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ บริเวณแผลเน่าขยายและลูกกลมอย่างช้าๆ บริเวณแผล ไม่พบการเจริญของเส้นใย

ลักษณะภายในผล เชื้อราเข้าทำลายเปลือกด้านนอก เจริญเข้ามาถึงเปลือกด้านใน และเข้าทำลายส่วนของเนื้อเงาะ ลักษณะของแผลค่อนข้างกลม

4. ลักษณะอาการของโรค ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

อาการเริ่มแรกพบเนื้อเยื่อรอบบริเวณที่เชื้อเข้าทำลายเป็นสีน้ำตาล แผลขยายลุกลามออกอย่างช้าๆ บริเวณแผลบางครั้งพบเส้นใยสีขาวเจริญแต่ไม่มากนัก

ลักษณะภายในผล เชื้อราเข้าทำลายเปลือกด้านนอกจะเป็นสีน้ำตาลดำ อาการไม่รุนแรง เปลือกชั้นในเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แผลมีขนาดใหญ่กว่าที่เห็นด้านนอก ในช่วงแรกส่วนเนื้อเงาะยังไม่เปลี่ยนแปลง จนกระทั่งอาการแผลขยายมากขึ้น เนื้อเงาะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน และกลั่นเหนียวเปรี้ยวไม่รุนแรง

5. ลักษณะอาการของโรค ที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis* sp.

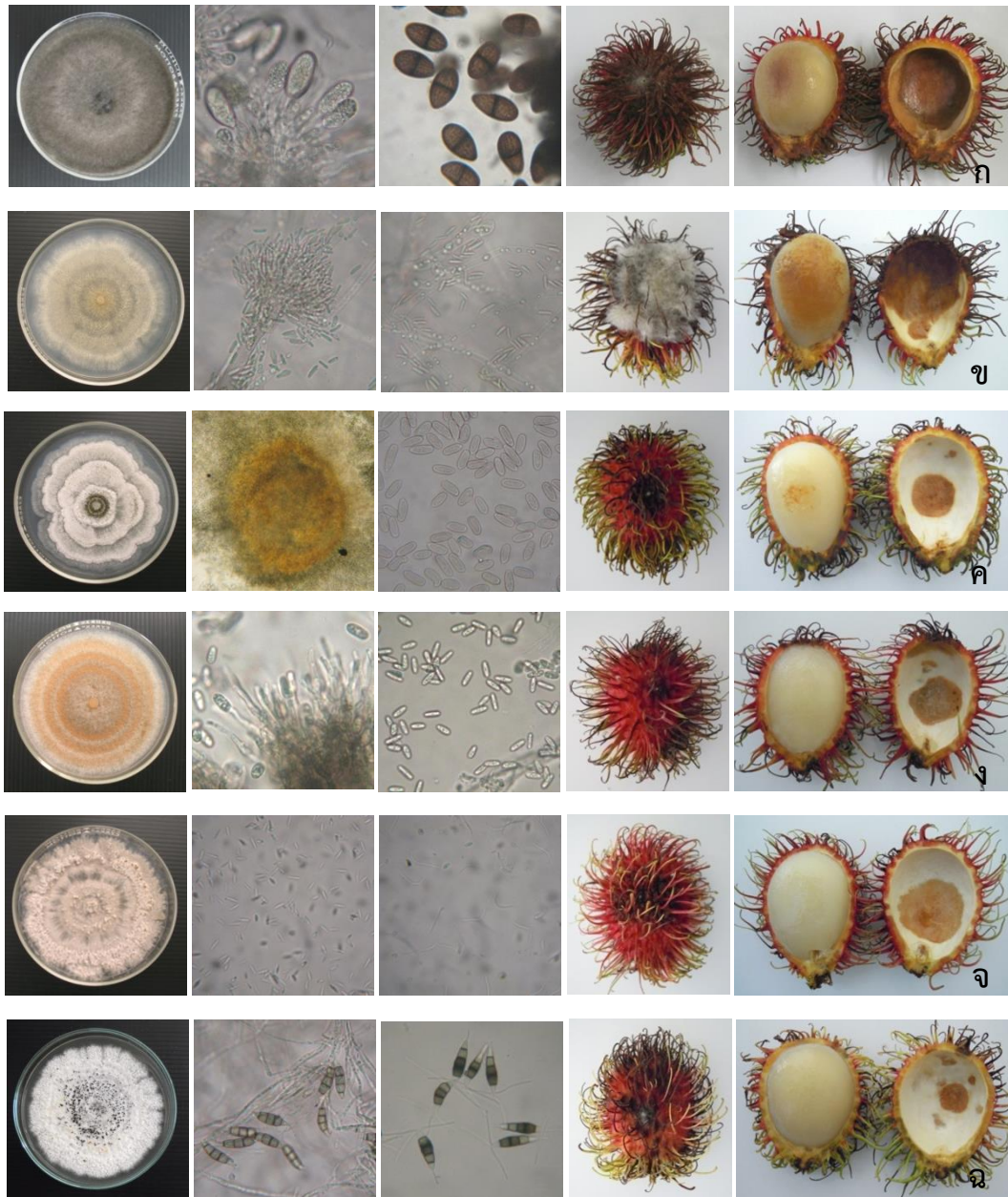
อาการเริ่มแรกเป็นแผลสีน้ำตาล แผลขยายออกช้า ๆ บริเวณกลางแผลจะมีสีน้ำตาลเข้ม ขอบแผลจะมีลักษณะเหมือนรอยขีด สีน้ำตาลอ่อน บริเวณแผลมีลักษณะแห้งแข็ง แผลมีลักษณะยุบตัวลงเล็กน้อย บนแผลไม่ปรากฏเส้นใยของเชื้อรา

ลักษณะภายในผล เชื้อราเข้าทำลายเปลือกด้านนอกเป็นสีน้ำตาลปนดำ แผลเน่าลุกลามอย่างช้าๆ ขนาดของแผลที่เปลือกชั้นในใกล้เคียงกับแผลที่เปลือกด้านนอก ในช่วงแรกจะเห็นสีของเปลือกชั้นในเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ก่อน ส่วนเนื้อเงาะยังไม่เปลี่ยนแปลง จนกระทั่งอาการแผลขยายมากขึ้น เนื้อเงาะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน จนถึงสีเหลือง มีน้ำเยิ้มสีเหลือง และกลั่นเหนียวเปรี้ยว

6. ลักษณะอาการของโรค ที่เกิดจากเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.

อาการเริ่มแรกเป็นจุดสีน้ำตาล แผลจะลุกลามอย่างช้าๆ มีสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม ยุบตัวเล็กน้อย มีเส้นใยเจริญฟูสีขาวขึ้นปกคลุมบริเวณแผล อาการไม่รุนแรงเท่ากับโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุชนิดอื่น

ลักษณะภายในผล เชื้อราเข้าทำลายเปลือกด้านนอก อาการไม่รุนแรง เปลือกชั้นในเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ขนาดของแผลที่เปลือกชั้นในใกล้เคียงกับแผลที่เปลือกด้านนอก ในช่วงแรกส่วนเนื้อเงาะยังไม่เปลี่ยนแปลง จนกระทั่งอาการแผลขยายมากขึ้น เนื้อเงาะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน



ภาพที่ 5 ลักษณะของเชื้อราสาเหตุและลักษณะอาการของโรคผลเน่าของเงาะ

- | | |
|------------------------------------|--|
| ก) <i>Lasiodiplodia theobromae</i> | ข) <i>Gliocephalotrichum bulbilium</i> |
| ค) <i>Greeneria</i> sp. | ง) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> |
| จ) <i>Phomopsis</i> sp. | ฉ) <i>Pestalotiopsis</i> sp. |

2. คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์

2.1 การแยกแบคทีเรียจากผลิตผลเกษตร

คัดเลือกแบคทีเรียจากจากเมล็ดถั่วลิสง เมล็ดถั่วแดง ลำไยอบแห้ง ข้าวหิของกล้วยหอมทอง สามารถแยกแบคทีเรียได้ 10 สายพันธุ์ คือ PN2, PN-A3, PN-A5, PN7, PN10, DL7, DL9, BA1 และ BP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ปนเปื้อน สังเกตได้จากการเกิดบริเวณยับยั้ง และเชื้อราไม่สามารถเจริญต่อไปได้ แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Aspergillus orchaceus*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. และ *Lasiodiplodia theobromae* (ตารางที่ 1) มีการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 จากใบหม่อนปกติ ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum dematium* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของหม่อน พบว่า สารกรองที่แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* RC-2 ผลิตขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้หลายชนิด ทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Rosellinia necatrix*, *Pyricularia oryzae*, *Agrobacterium tumefaciens* และ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ในห้องปฏิบัติการ (Yoshida et al., 2001)

ตารางที่ 1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากผลิตผลเกษตร

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ผลิตผลเกษตร	ชนิดของเชื้อราที่แบคทีเรียยับยั้ง
PN2	เมล็ดถั่วลิสง	<i>Aspergillus niger</i>
PN-A3	เมล็ดถั่วลิสง	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i>
PN-A5	เมล็ดถั่วลิสง	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i>
PN7	เมล็ดถั่วลิสง	<i>Aspergillus niger</i>
PN10	เมล็ดถั่วลิสง	<i>Aspergillus niger</i>
PN12	เมล็ดถั่วลิสง	<i>Aspergillus niger</i>
DL7	ลำไยอบแห้ง	<i>Aspergillus orchaceus</i> , <i>Fusarium</i> sp.
DL9	ลำไยอบแห้ง	<i>Penicillium</i> sp.
BA1	ข้าวหิกล้วยหอมทอง	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
BP	เมล็ดถั่วแดง	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i>

2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ

ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้จากผลิตผลเกษตร จำนวน 10 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะได้แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 2) แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PN10, PN12, DL9 และ DL7 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ และมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อรา *L. theobromae* และ *G. bulbilium* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะที่ทำ

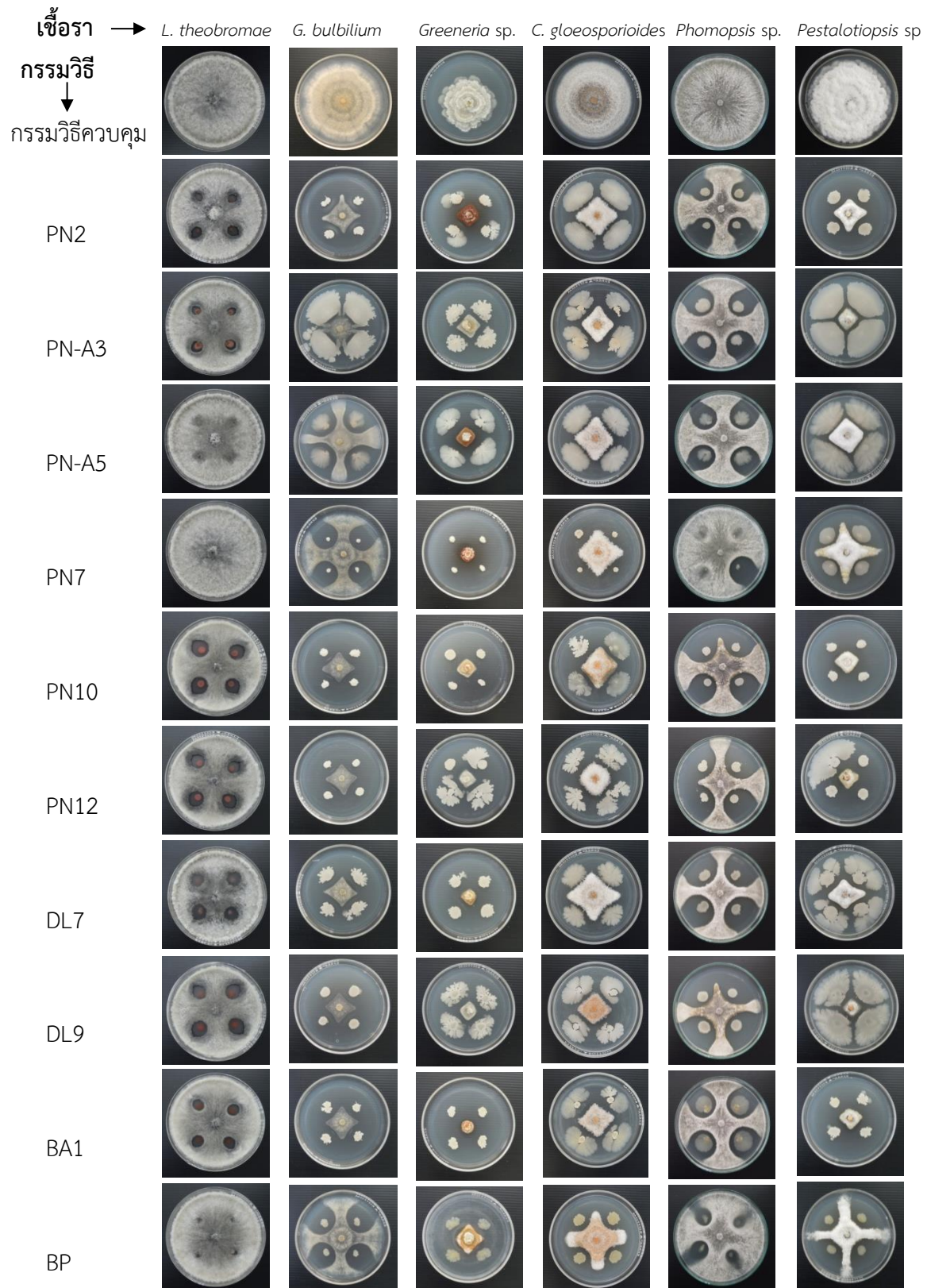
ให้เกิดอาการของโรครุนแรง และ เชื้อรา *Greeneria* sp. เป็นเชื้อราที่พบมาก ส่วนเชื้อรา *C. gloeosporioides*, *Phomopsis* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ไม่ทำให้เกิดโรครุนแรง

แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ PN10, PN12, DL9 และ DL7 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *L. theobromae* ได้ 63.78, 62.67, 62.22 และ 58.89 % เชื้อ *G. bulbilium* ได้ 73.67, 74.22, 74.45 และ 74.44 % และ เชื้อรา *Greeneria* sp. ได้ 69.79, 71.36, 70.80 และ 73.07 % ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 6) โดยแบคทีเรียจะสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ทำให้เส้นใยของเชื้อราไม่สามารถเจริญต่อไปได้ พบการเกิดบริเวณยับยั้ง (clear zone) สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang *et al.* (2012) สารสกัดหยาบของ lipopeptides ได้จากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* TF28 แยกมาจากรากของถั่วเหลืองมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคหลายชนิด เช่น *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* เป็นต้น โดยทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และใกล้เคียงกับการศึกษาของทศวรรณ (2547) คัดเลือกจุลินทรีย์ผิวพืช จำนวน 977 สายพันธุ์ ทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี dual culture technique เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ได้จำนวน 26 สายพันธุ์ โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญของโคโคนีเชื้อราได้ 50.00-62.96 %

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใย (%) ของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะบนอาหารเลี้ยง PDA เป็นเวลา 7 วัน

แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (%) ⁽¹⁾					
	<i>L. theobromae</i> sp.	<i>G. bulbilium</i>	<i>Greenria</i> sp.	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i>
PN 2	58.11 d	71.89 b	67.20 bcd	62.83 de	63.67 d	81.33 a
PN-A 3	59.00 d	70.56 bc	65.66 cd	69.22 ab	62.44 d	79.22 ab
PN-A 5	55.89 e	69.33 c	62.76 de	63.33 cde	54.89 f	70.45 d
PN 7	0.00 f	65.44 d	68.69 abc	63.39 cde	66.67 c	70.00 d
PN 10	63.78 a	73.67 a	69.79 abc	65.67 bcde	68.89 ab	75.89 c
PN 12	62.67 b	74.22 a	71.36 ab	68.33 abc	70.11 a	77.33 bc
DL7	58.89 d	74.44 a	73.07 a	63.56 cde	68.78 ab	75.56 c
DL9	62.22 b	74.45 a	70.80 ab	70.67 a	69.00 ab	79.00 ab
BA 1	60.67 c	68.89 c	70.66 ab	67.89 abcd	68.55 b	77.33 bc
BP	56.89 e	66.89 d	58.79 e	61.83 e	60.67 e	72.00 d
F-test	**	**	**	**	**	**
CV (%)	1.57	1.88	5.11	5.36	1.68	2.51

(1) การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (%) ที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %



ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะบนอาหารเลี้ยง PDA เป็นเวลา 7 วัน

2.3 ทดสอบประสิทธิภาพสารจากแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ

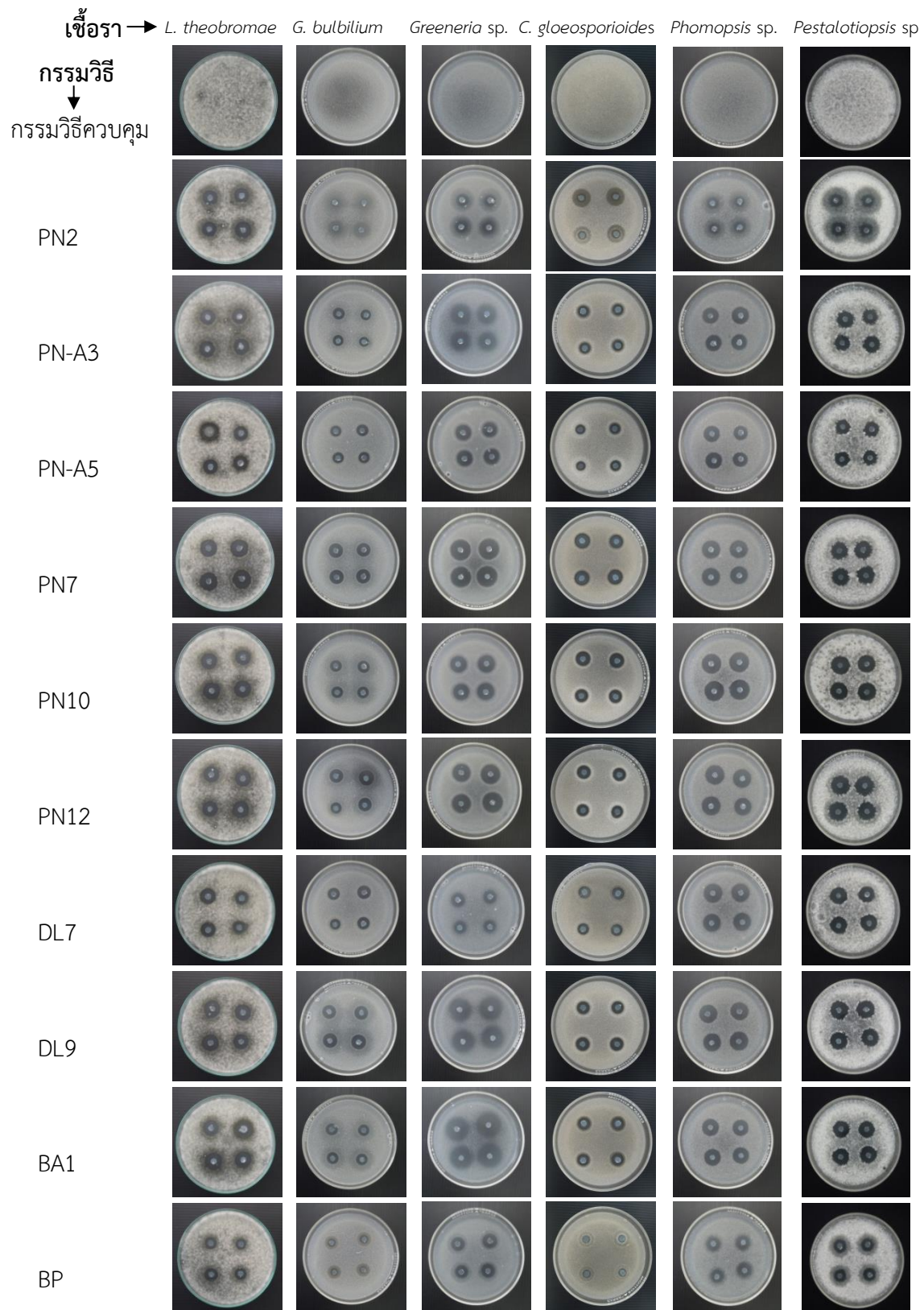
ทดสอบประสิทธิภาพสารจากแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ โดยการเปรียบเทียบบริเวณยับยั้ง (clear zone) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน สารจากแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 10 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าทั้ง 6 ชนิด คือ เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*, *Gliocephalotrichum* sp., *Greeneria* sp., *C. gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Phomopsis* sp. แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งมีความแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะ และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง พบว่า สารจากแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ PN7, DL9, PN10 และ PN12 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae*, *G. bulbilium*, และ *Greeneria* sp. สามารถยับยั้งสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae* เกิดบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 1.84, 1.83, 1.75 และ 1.68 ซม. เชื้อ *G. bulbilium* เกิดบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 1.64, 1.38, 1.33 และ 1.42 ซม. และ เชื้อรา *Greeneria* sp. เกิดบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 2.05, 2.09, 1.96 และ 1.93 ซม. ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 7) แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยสารสำคัญที่ผลิตโดย *Bacillus* ได้แก่ iturin, fengycin และ surfactin (Leelasuphakul *et al.*, 2008)

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของสารจากแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค

ผลเน่าของเงาะบนอาหารเลี้ยง PDA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

กรรมวิธี	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (ซม) ⁽¹⁾					
	<i>L. theobromae</i>	<i>G. bulbilium</i>	<i>Greenria</i> sp.	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
สายพันธุ์ PN 2	1.66 cdef	1.49 b	1.34 d	0.00 g	1.11 e	1.57 de
สายพันธุ์ PN-A 3	1.62 ef	1.18 f	1.81 bc	1.02 ef	1.71 c	1.66 cd
สายพันธุ์ PN-A 5	1.57 f	1.25 ef	1.69 c	1.13 de	1.41 d	1.61 cde
สายพันธุ์ PN 7	1.84 a	1.64 a	2.05 a	1.42 ab	2.03 a	1.69 c
สายพันธุ์ PN 10	1.75 bc	1.33 cde	1.96 ab	1.58 a	1.81 bc	1.80 b
สายพันธุ์ PN 12	1.68 cde	1.42 bc	1.93 ab	1.39 bc	1.94 ab	2.03 a
สายพันธุ์ DL7	1.64 def	1.27 def	1.39 d	1.24 cd	1.83 bc	1.65 cd
สายพันธุ์ DL9	1.83 ab	1.38 bcd	2.09 a	1.41 b	1.78 bc	1.87 b
สายพันธุ์ BA 1	1.73 cd	1.28 def	2.03 a	1.09 de	1.65 c	1.90 b
สายพันธุ์ BP	1.41 g	1.06 g	1.42 d	0.90 f	1.24 de	1.52 e
F-test	**	**	**	**	**	**
CV (%)	4.12	6.17	7.31	11.41	8.10	4.67

⁽¹⁾ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (ซม) ที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %



ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพของสารจากแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะบนอาหารเลี้ยง PDA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.4 ทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ (cell free culture supernatant)

การทดสอบความเป็นพิษได้มีการพัฒนานำเอาส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ เมล็ด เนื้อเยื่อ และเซลล์ต่างๆ ของพืชมาใช้เป็นตัวทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น ก่อนที่จะนำไปทดสอบจริงกับเซลล์สัตว์หรือมนุษย์ ในการทดลองนี้ ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารละลายส่วนใสที่แยกแบคทีเรียออกโดยทดสอบการงอกของเมล็ดพืช 2 ชนิด คือ เมล็ดข้าว (พืชใบเลี้ยงเดี่ยว) และเมล็ดถั่วเขียว (พืชใบเลี้ยงคู่)

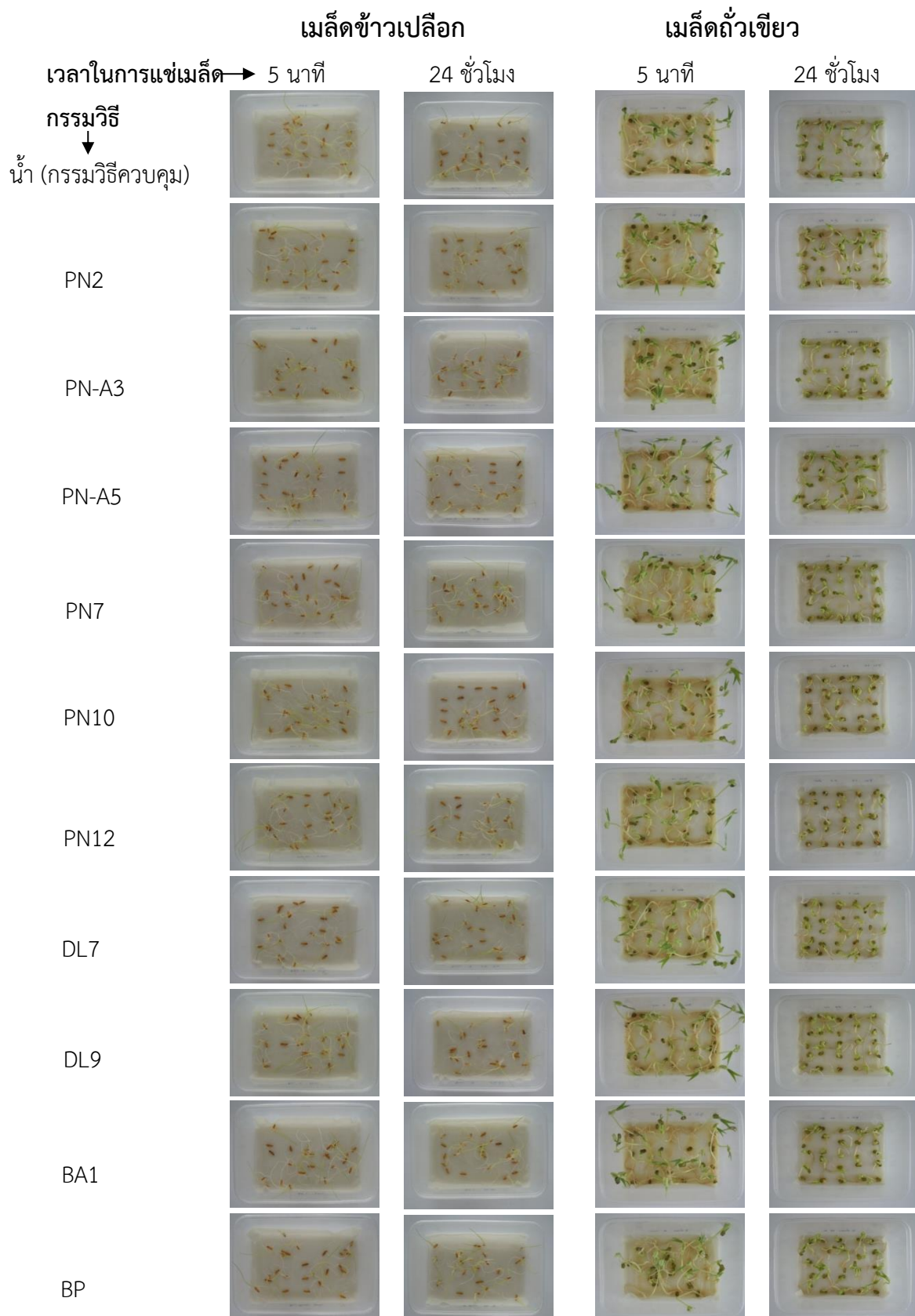
เมล็ดข้าวเปลือกที่แช่ในสารละลายส่วนใสจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ 10 สายพันธุ์ นาน 5 นาที เมล็ดข้าวงอก 55-74 % เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวเปลือกแช่ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ เมล็ดข้าวเปลือกงอก 62 % และเมื่อแช่เมล็ดข้าวเปลือก นาน 24 ชั่วโมง เมล็ดข้าวงอก 55-75 % เปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวเปลือกแช่ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ เมล็ดข้าวเปลือกงอก 68 % การแช่เมล็ดข้าว นาน 5 นาที และ 24 ชั่วโมง ทั้ง 2 ช่วงเวลา การงอกของเมล็ดข้าวไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 8)

ส่วนเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในสารละลายส่วนใสจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ 10 สายพันธุ์ นาน 5 นาที เมล็ดถั่วเขียวงอก 99-100 % เปรียบเทียบกับเมล็ดถั่วเขียวแช่ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ เมล็ดถั่วเขียวงอก 100 % ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่เมื่อแช่เมล็ดถั่วเขียว นาน 24 ชั่วโมง เมล็ดถั่วเขียวที่จุ่มในสารละลายส่วนใสจากแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PN-A 5, DL 7 และ BP งอก 100 % ส่วนเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในสารละลายส่วนใสจากแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์อื่นๆ มีความงอก 81-99 % เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดถั่วเขียวที่แช่ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ มีความงอก 98 % มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 4 และภาพที่ 8) นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดถั่วเขียวจะงอกช้ากว่าการแช่ถั่วเขียวนาน 5 นาที โดยดูจากลักษณะการงอก เมล็ดถั่วเขียวที่แช่นาน 24 ชั่วโมง งอกส่วนราก และเริ่มงอกส่วนยอด แต่สั้นกว่าเมล็ดถั่วเขียวที่แช่นาน 5 นาที (ภาพที่ 8) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อระยะเวลาผ่านไปขึ้นลักษณะการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 4 ความเป็นพิษของสารจากแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการงอกของเมล็ดข้าวเปลือก และ
เมล็ดถั่วเขียว หลังจากแช่ในสารละลายส่วนใสจากแบคทีเรียปฏิชีวนะ เป็นเวลา 5 นาที
และ 24 ชั่วโมง

กรรมวิธี	การงอกของเมล็ด (%)			
	ข้าวเปลือก		ถั่วเขียว	
	แช่นาน 5 นาที	แช่นาน 24 ชั่วโมง	แช่นาน 5 นาที	แช่นาน 24 ชั่วโมง ⁽¹⁾
น้ำ (กรรมวิธีควบคุม)	62.00	68.00	100.00	98.00 a
สายพันธุ์ PN 2	59.00	55.00	100.00	97.00 a
สายพันธุ์ PN-A 3	59.00	73.00	100.00	99.00 a
สายพันธุ์ PN-A 5	65.00	72.00	99.00	100.00 a
สายพันธุ์ PN 7	59.00	75.00	99.00	99.00 a
สายพันธุ์ PN 10	69.00	55.00	99.00	94.00 ab
สายพันธุ์ PN 12	74.00	65.00	99.00	81.00 c
สายพันธุ์ DL7	63.00	68.00	99.00	100.00 a
สายพันธุ์ DL9	67.00	68.00	100.00	95.00 ab
สายพันธุ์ BA 1	55.00	65.00	100.00	91.00 b
สายพันธุ์ BP	59.00	72.00	100.00	100.00 a
F-test	ns	ns	ns	**
CV (%)	17.00	15.45	1.30	4.01

⁽¹⁾ การงอกของเมล็ดถั่วเขียวที่แช่นาน 24 ชม. ที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %



ภาพที่ 8 ความเป็นพิษของสารจากแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการงอกของเมล็ดข้าวเปลือก และเมล็ดถั่วเขียว หลังจากแช่ในสารละลายส่วนใสจำแบคทีเรียปฏิชีวนะ เป็นเวลา 5 นาที และ 24 ชั่วโมง

3. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ

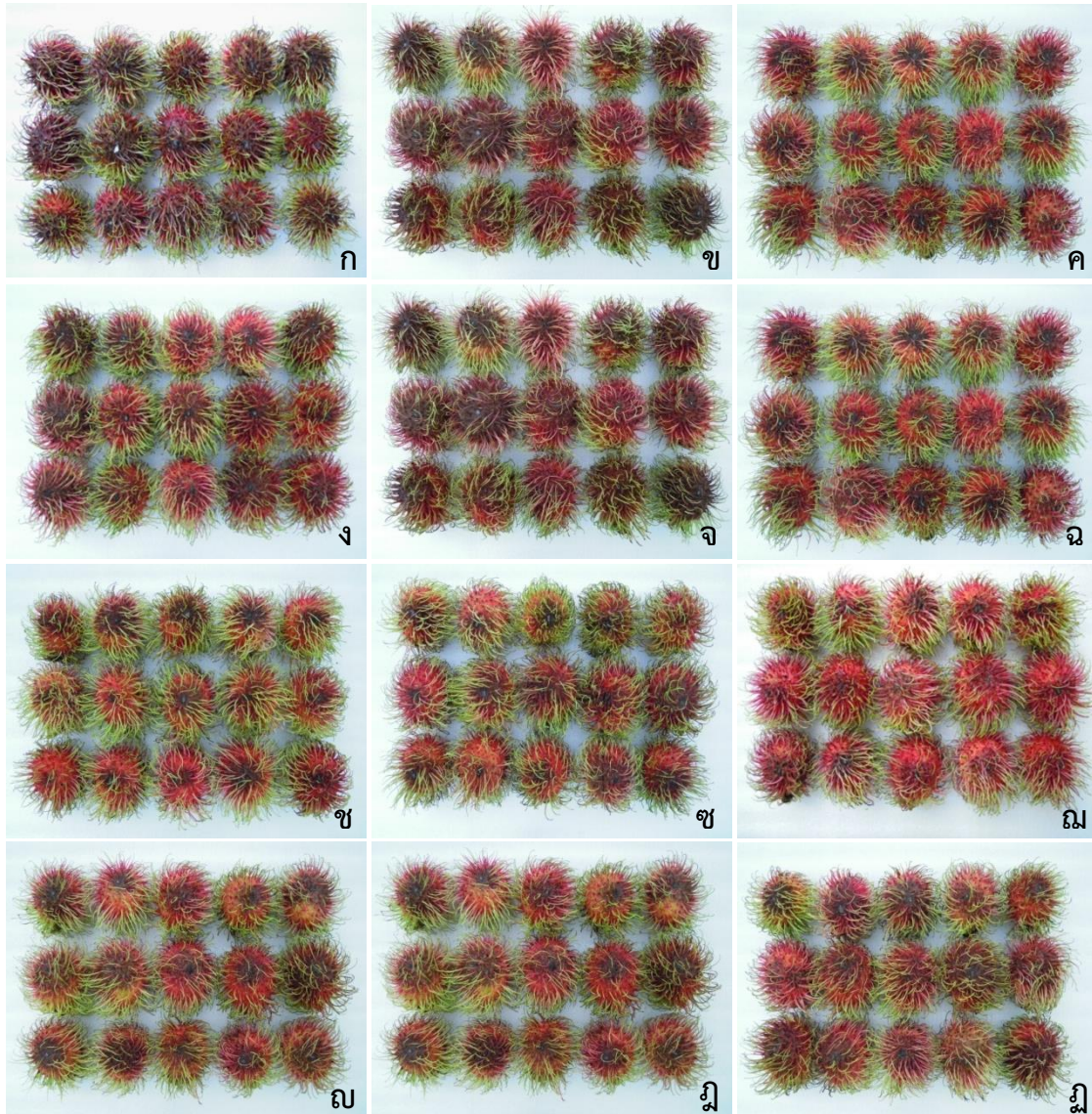
3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะที่เกิดจากการปลูกลงเชื้อราสาเหตุ

ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 10 สายพันธุ์ ในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะที่เกิดจากการปลูกลงเชื้อรา *L. theobromae* พบว่า แบคทีเรียปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งความรุนแรงของโรคผลเน่าบนผลเงาะมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ DL9, PN10 และ DL7 มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ โดยเปรียบเทียบจากขนาดแผลบริเวณที่เชื้อรา *L. theobromae* เข้าทำลาย มีขนาดแผล 3.40, 3.56 และ 3.56 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดแผลที่เล็กเมื่อเปรียบเทียบกับ การพ่นด้วยน้ำ และ อิมาซาลิล 500 มิลลิกรัม/ลิตร มีขนาดแผล 8.04 และ 6.62 เซนติเมตร แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ DL9, PN10 และ DL7 สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ 57.82, 55.82 และ 52.97 % ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 9) ใกล้เคียงกับการศึกษาของทศวรรณ (2547) โดยการใช้เชื้อยีสต์ *Candida krusei* (ไอโซเลต 44-52/2) และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (ไอโซเลต 44-37/1) ควบคุมโรคผลเน่าของเงาะที่ปลูกลงเชื้อรา *L. theobromae* ก่อน 12 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคผลเน่าได้ 19.2 และ 16.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะที่เกิดจากการปลูกลงเชื้อรา *Lasiodiplodis theobromae* เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	ขนาดของแผล (ซม.) ⁽¹⁾	การยับยั้งความรุนแรงของโรค (%) ⁽¹⁾
กรรมวิธีควบคุม (น้ำ)	8.04 f	0.00 g
อิมาซาลิล 500 มก/ล	6.62 e	16.91 f
สายพันธุ์ PN2	5.42 cd	32.44 de
สายพันธุ์ PN-A3	5.96 d	25.67 e
สายพันธุ์ PN-A5	6.75 e	15.67 f
สายพันธุ์ PN7	4.40 b	45.30 c
สายพันธุ์ PN10	3.56 a	55.82 a
สายพันธุ์ PN12	4.34 b	46.04 bc
สายพันธุ์ DL7	3.77 ab	52.97 ab
สายพันธุ์ DL9	3.40 a	57.82 a
สายพันธุ์ BA1	4.27 b	46.72 bc
สายพันธุ์ BP	5.19 c	35.25 d
F-test	**	**
CV (%)	9.71	15.42

⁽¹⁾ ขนาดของแผล (ซม.) และการยับยั้งความรุนแรงของโรค (%) ที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %



ภาพที่ 9 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะที่เกิดจากการปลูกเชื้อรา *Lasiodiplodis theobromae* เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

- | | | |
|-------------------------|-----------------------|------------------|
| ก) กรรมวิธีควบคุม (น้ำ) | ข) อิมิซาลิล 500 มก/ล | ค) สายพันธุ์ PN2 |
| ง) สายพันธุ์ PN-A3 | จ) สายพันธุ์ PN-A5 | ฉ) สายพันธุ์ PN7 |
| ช) สายพันธุ์ PN10 | ซ) สายพันธุ์ PN12 | ฅ) สายพันธุ์ DL7 |
| ญ) สายพันธุ์ DL9 | ณ) สายพันธุ์ BA1 | ฏ) สายพันธุ์ BP |

3.2 ศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลเงาะหลังการเก็บ

รักษา

ผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิชีวนะ 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PN 10, DL 7 และ DL 9 เปรียบเทียบกับผลเงาะที่พ่นด้วยน้ำ และ อิมาซาลิล 500 มิลลิกรัม/ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ความแน่นเนื้อของเปลือกเงาะมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ DL7 และ สายพันธุ์ DL9 มีความแน่นเนื้อของเปลือกเงาะสูง คือ 30.82 และ 31.33 นิวตัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับความแน่นเนื้อของผลเงาะที่พ่นด้วยอิมาซาลิล ซึ่งมีค่าความแน่นเนื้อของเปลือกเงาะสูงที่สุด คือ 32.78 นิวตัน ส่วนค่าความแน่นเนื้อของเนื้อเงาะ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ DL 9 มีค่าความแน่นเนื้อของเนื้อเงาะสูงที่สุด เท่ากับ 2.98 นิวตัน ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ มีค่าความแน่นเนื้อของเนื้อเงาะใกล้เคียงกัน คือ 2.31-2.88 นิวตัน (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลของแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อของเปลือกและเนื้อผลเงาะ ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	ความแน่นเนื้อของเปลือกเงาะ ⁽¹⁾ (นิวตัน)	ความแน่นเนื้อของเนื้อเงาะ (นิวตัน)
กรรมวิธีควบคุม (น้ำ)	27.47 c	2.31
อิมาซาลิล 500 มก/ล	32.78 a	2.88
สายพันธุ์ PN10	28.54 bc	2.63
สายพันธุ์ DL7	30.82 abc	2.63
สายพันธุ์ DL9	31.33 ab	2.98
F-test	*	ns
CV (%)	8.55	25.30

⁽¹⁾ ความแน่นเนื้อของเปลือกเงาะ (นิวตัน) ที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ของผลเงาะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ DL 9 มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้มากที่สุด เท่ากับ 20.04 องศาบริกซ์ ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ใกล้เคียงกัน คือ 18.86-19.56 องศาบริกซ์ (ตารางที่ 7) แสดงว่าผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิชีวนะ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลและกรดอินทรีย์

ตารางที่ 7 ผลของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ของผลเงาะ ภายหลังการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (°Brix)
กรรมวิธีควบคุม (น้ำ)	19.32
อิมมูนาลิส 500 มก/ล	18.86
สายพันธุ์ PN10	18.98
สายพันธุ์ DL7	19.56
สายพันธุ์ DL9	20.04
F-test	ns
CV (%)	4.02

การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกของผลเงาะ พบว่าการเปลี่ยนแปลงสีความสว่าง (L) ค่าสีเขียว-แดง (a-value) และค่าสีน้ำเงิน-เหลือง (b-value) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยผลเงาะที่ค่าความสว่างมากที่สุดคือ ผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ PN10 เท่ากับ 37.48 ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ มีค่าความสว่าง อยู่ในช่วง 34.59-36.13 ค่า a value เป็นบวก แสดงว่าอยู่ในช่วงสีแดง และถ้าค่า a เป็นลบแสดงว่ามีช่วงสีเขียว ผลเงาะที่พ่นด้วยอิมมูนาลิส 500 มิลลิกรัม/ลิตร มีค่า a-value มากที่สุด เท่ากับ 15.56 แสดงว่าผลเงาะมีสีแดงมากที่สุด และ ผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ PN10, DL7 มีค่า a น้อย เท่ากับ 11.77 และ 12.47 แสดงว่าผลเงาะมีสีแดงน้อยกว่า ส่วนค่า b เป็นบวก แสดงว่าอยู่ในช่วงสีเหลือง ค่า b เป็นลบแสดงว่ามีช่วงสีน้ำเงิน ผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์มีค่า b อยู่ในช่วง 23.81-24.51 ใกล้เคียงกับผลเงาะที่พ่นด้วยน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) มีค่า b เท่ากับ 23.52 (ตารางที่ 8)

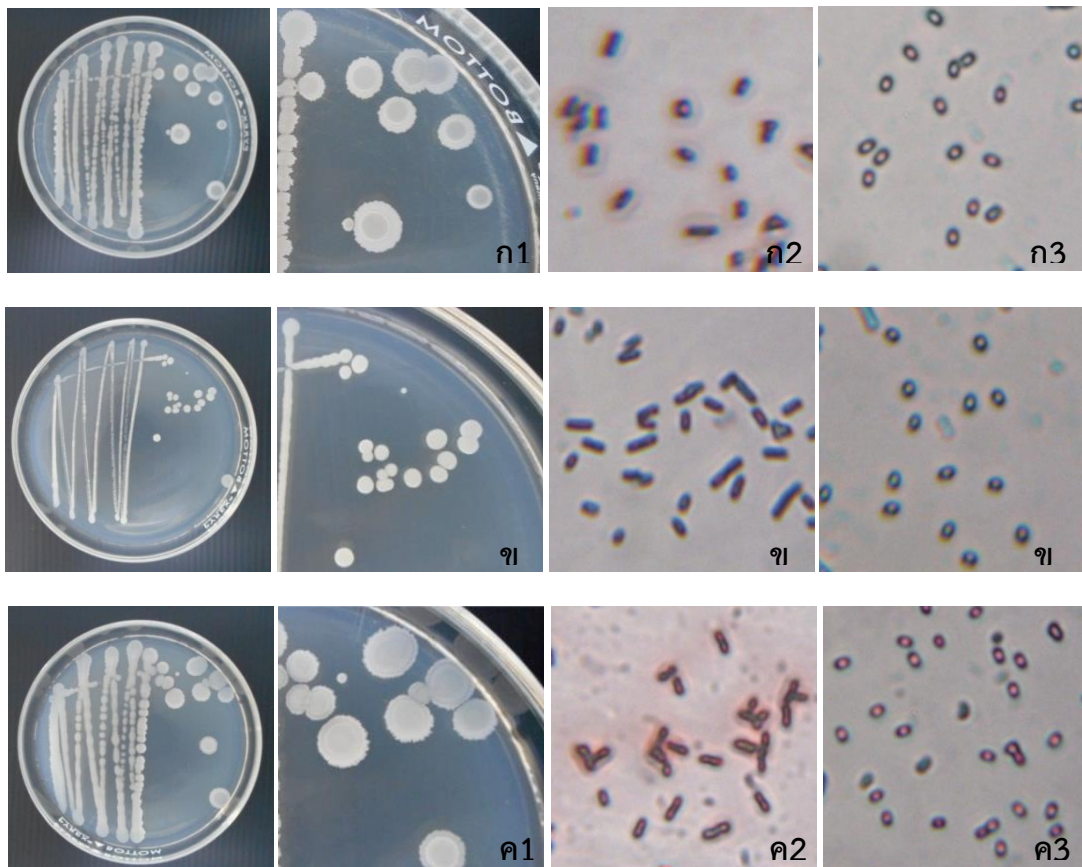
ตารางที่ 8 ผลของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการเปลี่ยนแปลงสีของผลเงาะ ภายหลังการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	L-value	a-value	b-value
กรรมวิธีควบคุม (น้ำ)	34.71	13.76	23.52
อิมมูนาลิส 500 มก/ล	34.59	15.56	20.33
สายพันธุ์ PN10	37.48	11.77	24.51
สายพันธุ์ DL7	35.29	12.47	23.81
สายพันธุ์ DL9	36.13	13.80	24.35
F-test	ns	ns	ns
CV (%)	7.60	38.75	12.75

4. จำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือก

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ PN10 DL7 และ DL9 มาศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และการติดสีแกรม พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ PN10 มีโคโลนีสีขาวขุ่น ลักษณะกลม ขอบหยัก แบน ทึบแสง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ได้ (ภาพที่ 10ก) แบคทีเรียสายพันธุ์ DL7 มีโคโลนีสีขาวขุ่น ลักษณะกลม ขอบเรียบ เป็นเมือกนูน ทึบแสง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ได้ (ภาพที่ 10ข) ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ DL9 มีโคโลนีสีขาวขุ่น ลักษณะกลม ขอบหยัก แบน ทึบแสง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ได้ (ภาพที่ 10ค) แบคทีเรีย PN10 และ DL9 มีลักษณะใกล้เคียงกัน และมีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ (สุรางค์, 2555)



ภาพที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์

- | | |
|-------------------|------------------------|
| ก) สายพันธุ์ PN10 | 1) โคโลนีของแบคทีเรีย |
| ข) สายพันธุ์ DL7 | 2) เซลล์แบคทีเรีย |
| ค) สายพันธุ์ DL9 | 3) เอนโดสปอร์แบคทีเรีย |

4.2 การศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี

4.2.1 ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase)

แบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ คือ PN10 DL7 และ DL9 เมื่อนำแบคทีเรียมาแตะลงในหยดของไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์ ใช้ลูปกวนให้เข้ากัน พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถทำให้เกิดฟองก๊าซขึ้นทันที แสดงว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลสได้

จากคุณสมบัติที่ทำการศึกษเบื้องต้น พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีรูปร่างท่อน สร้างเอนโดสปอร์ ติดสีแกรมบวก สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลสได้ รวมถึงสามารถสร้างสารในการยับยั้งเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา (antifungal) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เข้าเกณฑ์จีแนส *Bacillus* จึงได้นำข้อมูลเบื้องต้นนี้ไปใช้ในการเลือกชุดทดสอบเพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อไป

4.2.2 จำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API Test Kits 50 CHB

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 มาทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยการใช้ API Test Kits 50 CHB เป็นอาหารชุดทดสอบสำหรับจำแนกชนิดของเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* และเชื้อใกล้เคียง หลักการของ API50 CHB Medium เป็นอาหารพร้อมใช้สำหรับศึกษาการหมักของคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ใน API CH strip ในระหว่างการบ่มคาร์โบไฮเดรตถูกหมักกลายเป็นกรด ซึ่งมีผลทำให้ pH ลดลง สังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของ indicator ผลชีวเคมีที่ได้ให้นำไปวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งผลการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากตัวอย่างจะต้องมีค่าความเชื่อมั่นของการจำแนก (% Identification) มากกว่า 85 % พบว่า การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ PN10, DL7 และ DL9 เป็นแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* หรือ *B. amyloliquefaciens* มีค่าความเชื่อมั่นของการจำแนก 99.1-99.9 % (ตารางที่ 9 และ ภาพที่ 11)

ตารางที่ 9 ผลการจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ โดยใช้ API Test kits 50 CHB

แบคทีเรียปฏิปักษ์	ผลการจำแนกสายพันธุ์	ค่าความเชื่อมั่นของการจำแนก (% ID)
สายพันธุ์ PN10	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	99.8
สายพันธุ์ DL7	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	99.9
สายพันธุ์ DL9	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	99.1

สอดคล้องกับงานวิจัยของ O'Donnell et al. (1980) ศึกษาแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* จำนวน 4 species มี 8 strains จำแนกชนิดโดยใช้ API 50 tests, DNA reassociation และ porlysis gas liquid chromatography พบว่าสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้เป็น *Bacillus subtilis*, *B. plmilus*, *B. licheniformis* และ *B. amyloliquefaciens* แต่อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถจำแนกแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* จาก *B. subtilis* ได้ โดยวิธีการทดสอบของ Gordon et al. (1973) ซึ่งเป็นการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* และจากการศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* จำนวน

มาก ของ Logan (1980) และ Logan and Berkeley (1981) พบว่าไม่สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียระหว่าง *B. subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* โดยการใช้ API test ได้ ถึงแม้ว่า API 50 CHB เป็นชุดทดสอบสำหรับจำแนกชนิดเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* ที่มีความรวดเร็ว และแม่นยำ ดังนั้นในเรื่องการจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์จึงได้ทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์ใน API Test Kits 50 CHB เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์
ก) สายพันธุ์ PN10 ข) สายพันธุ์ DL7 ค) สายพันธุ์ DL9

4.3 จำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

การจัดจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยส่งแบคทีเรียบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิด ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) โดยนำลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียตัวอย่างเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่า

สายพันธุ์ PN10 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย 2 ชนิด 99.91 % ได้แก่ *Bacillus siamensis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (ตารางที่ 10 และ ตารางผนวกที่ 1)

สายพันธุ์ DL7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* 100.00 % (ตารางที่ 10 และ ตารางผนวกที่ 2)

สายพันธุ์ DL9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย 2 ชนิด 99.86 % ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* และ *Bacillus siamensis* (ตารางที่ 10 และ ตารางผนวกที่ 3)

Bacillus siamensis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้าง endospore รูปฟ่อน strain PD-A10^T แยกมาจากปูเค็ม จากจังหวัดนครปฐม ประเทศไทย มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA มีความเหมือนกับแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* NBRC 15535^T, *B. subtilis* DSM 10^T, *B. vallismortis* DSM 11031^T และ *B. mojavensis* IFO 15718^T เท่ากับ 99.5, 99.4, 99.4 และ 99.2% ตามลำดับ (Sumpavapol et al., 2010) *B. siamensis* KCTC13613 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Botrytis cinerea* เป็นสาเหตุโรคของพืช (Jeong et al., 2012) การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ *Bacillus* species พบว่า *B. amyloliquefaciens* มีความใกล้เคียงกับ *B. siamensis* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เหมือนกันมากกว่า 94 % (Richter and Rossello-Mora, 2009)

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ PN10, DL7 และ DL9

แบคทีเรีย	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')
PN10	16S rDNA	GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGC GGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTA ATACCGGATGGTTGTCTGAAACCGCATGGTTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGG ACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGATGCTAGCCGACCTGAGA GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGATAGGGAAATCTTC CGCAATGGACGAAAGTGTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTG TTGTTAGGGAAAGAAAGTGCCTTCAAATAGGGCGGCACTTGAAGGTAACCTAACCAAGAGCCACGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTTATTGGGCGTAAAG GGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACGGGGAGGGGTCATTGGAAAC GGGAACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGTGGAAATTCACGTGTAGCGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAA CAGGATTAGATACCTCGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTT TAGTGCTGCAGCTAACGCAATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAA TTGACGGGGGCGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAAATCGAAGCAACGCGAAGAACTTACCAAG TCTTGACATCCTCTGACAAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGACAGGTGACAGGTGGTGCATG GTTGTCTGACGTCTGTGTGAGATGTTGGGTTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTTGATCTTAGTT GCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC
DL7	16S rDNA	GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGC GGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTA ATACCGGATGNTTGTGTTGAAACCGCATGGTTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGG ACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGCTCACCAGGCGACGATGCTAGCCGACCTGAGA GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGATAGGGAAATCTTC CGCAATGGACGAAAGTGTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTG TTGTTAGGGAAAGAAAGTGCCTTCAAATAGGGCGGCACTTGAAGGTAACCTAACCAAGAGCCACGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTTATTGGGCGTAAAG GGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACGGGGAGGGGTCATTGGAAAC TGGGGAACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCTAGAGATGTGGAA GGAAACACAGTGGCGAAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGGA ACAGGATTAGATACCTGGTGTGCTCAAGCGCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCT TTAGTGCTGCAGCTAAACGCAATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGA ATTGACGGGGGCGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAAATCGAAGCAACGCGAAGAACTTACCAAG GTCTTGACATCCTCTGACAAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGACAGGTGACAGGTGGTGCATG GGTGTCTGACGTCTGTGTGAGATGTTGGGTTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTTGATCTTAG TTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC
DL9	16S rDNA	ACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAGGGTGA GTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACGCG ATGGTTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGAGACCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGG CTCACCAAGGCGAGATGCGTGAAGCGACCTGAGAGGGTGAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACG GGAGGCGAGTAGGGAATTTCCGCAATGGAGCAAGTCTGAGGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGTTTTTCGGAT CGTAAAGCTCTGTGTTAGGGAAAGCAAGTGCCTTCAAATAGGGCGGCACTTGAAGGTAACCTAACCAAGAAAGCCAG GCTAACTACGTGCCAGCAGCGGCTAATAGTGGTGGCAAGGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGG CGGTTTTCTTAAAGTGTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAAGTGCAGAGGA GGAGAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAGTGCCTGAGAGATGTTGGAGGAACACAGTGGGAGAGG

5. การผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และ โปรตีเอส ของแบคทีเรียปฏิปักษ์

ทดสอบการผลิตเอนไซม์ในอาหารแข็ง โดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ลงหลุมที่เจาะอาหารในจานเลี้ยงเชื้อด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุม/จานเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 3 ชนิด คือ อะไมเลส, เซลลูเลส และโปรตีเอส สังเกตวงใสรอบโคโลนีจากการย่อยสลายซัสเตรด เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ แต่ละสายพันธุ์ จากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Cz/Co) พบว่า การผลิตเอนไซม์อะไมเลสของแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความแตกต่างกันทางสถิติ แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL7 มีความสามารถสูงในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส มีค่า Cz/Co เท่ากับ 2.24 รองลงมาคือ PN10 และ DL9 มีค่า Cz/Co เท่ากับ 2.14 และ 1.99 (ตารางที่ 11 และภาพที่ 12)

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL7 มีความสามารถสูงในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส มีค่า Cz/Co เท่ากับ 3.44 รองลงมาคือ PN10 และ DL9 มีค่า Cz/Co เท่ากับ 2.70 และ 2.21 (ตารางที่ 11 และภาพที่ 12)

ส่วนการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL7, DL9 และ PN10 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ใกล้เคียงกัน มีค่า Cz/Co เท่ากับ 1.96, 1.72 และ 1.68 ตามลำดับ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 12)

แบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 3 ชนิด ที่มีการทดสอบ คือ เอนไซม์อะไมเลส, เซลลูเลส และโปรตีเอส สอดคล้องกับการศึกษาของ สิรินันท์ (2550) พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD3a และ LDD3b ที่คล้าย *B. subtilis* ผลิตเอนไซม์ 4 ชนิด คือ โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส และ ไซลาลเนส และแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD1 ที่คล้าย *B. subtilis* ผลิตเอนไซม์ 3 ชนิด คือ โปรตีเอส อะไมเลส และเซลลูเลส

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และโปรตีเอส โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์
เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

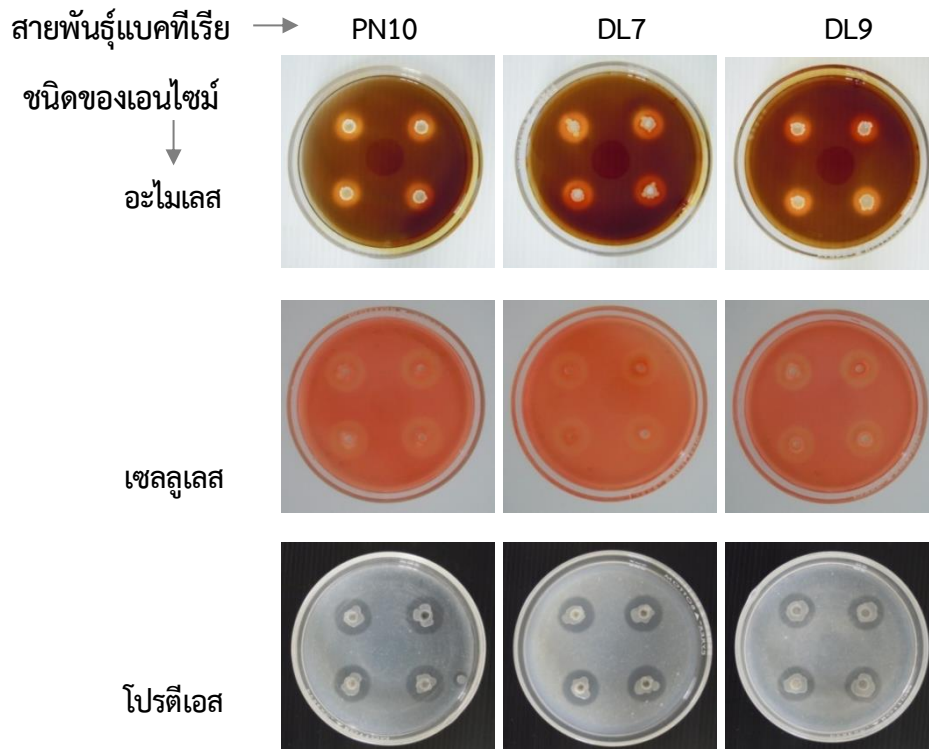
สายพันธุ์แบคทีเรีย	ขนาดของวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรีย (ซม.)								
	อะไมเลส ⁽¹⁾			เซลลูเลส ⁽²⁾			โปรตีเอส		
	Cz	Co	Cz/Co	Cz	Co	Cz/Co	Cz	Co	Cz/Co
PN10	1.51	0.71	2.14 ab	2.12	0.80	2.70 b	1.90	1.14	1.68
DL7	1.70	0.77	2.24 a	2.07	0.60	3.44 a	1.89	0.98	1.96
DL9	1.55	0.78	1.99 b	2.05	0.94	2.21 c	1.90	1.11	1.72
<i>F</i> -test	*			**			ns		
CV (%)	5.13			9.55			9.59		

(1) ค่า Cz/Co ของเอนไซม์อะไมเลส ที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

(2) ค่า Cz/Co ของเอนไซม์เซลลูเลส ที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

หมายเหตุ Cz คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีแบคทีเรียปฏิปักษ์(เซนติเมตร)

Co คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแบคทีเรียปฏิปักษ์(เซนติเมตร)

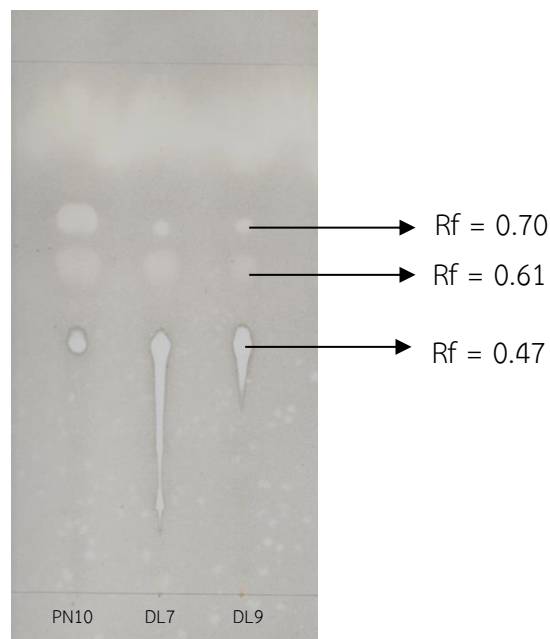


ภาพที่ 12 การผลิตเอนไซม์ อะไมเลส, เซลลูเลส และโปรตีเอส บนอาหารแข็ง
โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9

6. ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียปฏิปักษ์

6.1 แยกสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกด้วย thin layer chromatography (TLC)

แยกสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 บนแผ่น TLC ซึ่งมีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ (65:25:4 v/v/v) พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีแถบสารที่มีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 3 แถบสาร ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ Rf เฉลี่ย 0.47, 0.61 และ 0.70 (ภาพที่13) สังเกตได้จากบริเวณยับยั้ง (clear zone) เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Arrebola *et al.* (2010b) ทำการศึกษาสารทุติยภูมิของแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* PPCB004 เป็นสารต้านเชื้อรา โดยทำการทดสอบบนแผ่น TLC พบบริเวณยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* และ *Rhizopus stolonifer* ที่ Rf = 0.4 ได้ทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC เป็น iturin A และ Arrebola *et al.* (2010a) พบแถบสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *L. theobromae* ที่ Rf เฉลี่ย 0.75 นำไปตรวจวิเคราะห์ พบว่าเป็นสาร surfactin



ภาพที่ 13 โครมาโตแกรมสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PN10, DL7 และ DL9 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อรา

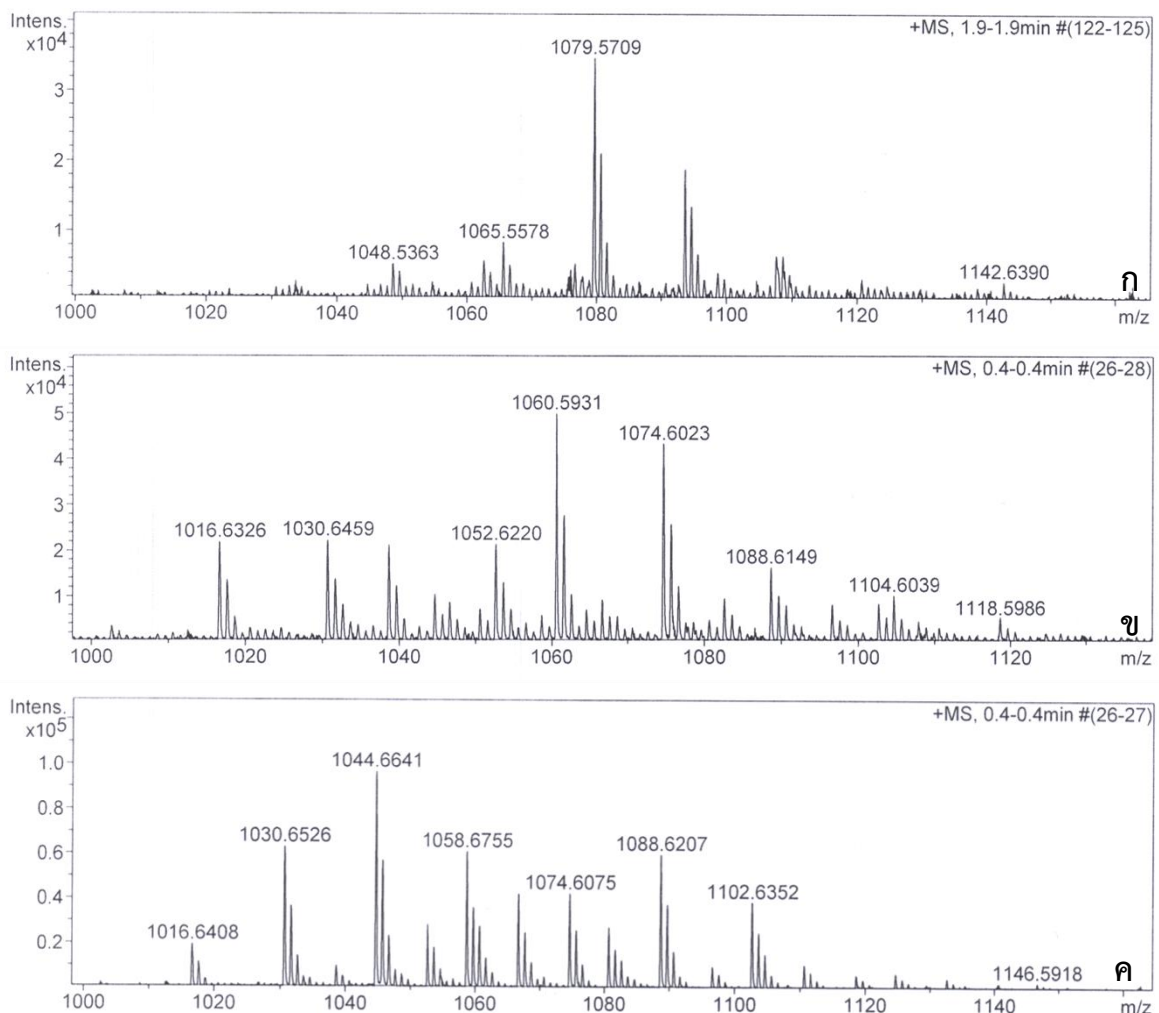
6.2 ศึกษาองค์ประกอบของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ

สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10 (เลือกเป็นตัวแทนของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น เนื่องจากมีบริเวณยับยั้งที่ชัดเจน) ที่แยกได้จากบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนแผ่น TLC ที่ Rf เฉลี่ย 0.47, 0.61 และ 0.70 นำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสาร ด้วยเครื่อง Bruker Daltonics-microTOF-benchtop ESI-TOF MS ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่า

สารที่ 1 ค่า Rf = 0.47 มีค่า main mass peak (m/z) ที่ 1079.57, 1093.58 (ภาพที่ 14 ก และภาพผนวกที่ 1)

สารที่ 2 ค่า Rf = 0.61 มีค่า main mass peak (m/z) ที่ 1060.5, 1074.6 (ภาพที่ 14 ข และภาพผนวกที่ 2)

สารที่ 3 ค่า Rf = 0.70 มีค่า main mass peak (m/z) ที่ 1044.7, 1058.7, 1074.6, 1088.6 (ภาพที่ 14 ค และภาพผนวกที่ 3)



ภาพที่ 14 Mass spectrum ของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของแบคทีเรียปฏิปักษ์

ก) สารที่ 1 ค่า Rf = 0.47 ข) สารที่ 2 ค่า Rf = 0.61

ค) สารที่ 3 ค่า Rf = 0.70

จากการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนแผ่น TLC พบว่า สารที่ 1 มีค่า main mass peak (m/z) ที่ 1079.57, 1093.58 สารที่ 2 มีค่า main mass peak (m/z) ที่ 1060.59, 1074.60 และ สารที่ 3 มีค่า main mass peak (m/z) ที่ 1044.66, 1058.67, 1074.60, 1088.62 ตรงกับการศึกษาของ Gong *et al.* (2015) สารสกัด lipopeptides จากแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* S76-3 วิเคราะห์ด้วย RP-HPLC และ ESI-CID-MS แยกได้สารประกอบ 3 ชนิด คือ iturin, plipastatin และ surfactin ซึ่งจากงานวิจัยนี้ สารที่ 1 ตรงกับสารประกอบ iturin A และ สารที่ 2 และ 3 ตรงกับสารประกอบ surfactin เมื่อเปรียบเทียบค่า mass peaks (m/z) ของ iturin A ตรงกัน ที่ 1079, 1094 [M+H, NA, K]⁺ และ ค่า mass peaks (m/z) ของ surfactin ตรงกัน ที่ 1044, 1060 [M+H, NA, K]⁺ 1036, 1058, 1074[M+H, NA, K]⁺ 1050, 1072, 1088[M+H, NA, K]⁺

งานวิจัยของ Kim *et al.* (2010) วิเคราะห์ lipopeptides ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *B. subtilis* CMB32 โดยเครื่อง MALDI-TOF mass spectrometry พบว่า สารที่ 1 จากงานวิจัยนี้ ตรงกับ fraction ที่ 31 มีค่า mass peak (m/z) 1080, 1094, 1096, 1110 เป็นสารในกลุ่ม iturin สารที่ 2 ตรงกับ fraction ที่ 43-45 มีค่า mass peak (m/z) 1060, 1074 และ สารที่ 3 ตรงกับ fraction ที่ 55 มีค่า mass peak (m/z) 1044, 1058, 1074 เป็นสารในกลุ่ม surfactin

งานวิจัยของ Cho *et al.* (2003) วิเคราะห์ lipopeptide surfactin fraction ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. CY22 โดยเครื่อง MALDI-TOF mass spectrometry มีค่า mass peak (m/z) 1030.68, 1044.69 และ 1058.71 ตรงกับ ค่า main mass peak ของสารที่ 3 เป็นสารในกลุ่ม surfactin

จากการเปรียบเทียบค่า mass peak กับงานวิจัยที่มีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน สรุปได้ว่าสารที่ 1 เป็นสารในกลุ่ม iturin A เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างในการยับยั้งเชื้อรา ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นจุลินทรีย์ชีวภาพ (biological control agent) เป็นเป้าหมายในการลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร (Hsieh *et al.*, 2008) ส่วนสารที่ 2 และ 3 เป็นสารในกลุ่ม surfactin เป็นสารลดแรงตึงผิวในกลุ่ม lipopeptide โดยมีไขมันจับอยู่กับสายเปปไทด์ เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง surfactins ไม่เป็นพิษต่อเชื้อราสาเหตุโรค มีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ iturin A ในการต้านเชื้อรา (Mager-Dana, *et al.*, 1992, Kim *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Arrebola *et al.* (2010a) พบแถบสารที่ Rf เฉลี่ย 0.75 บนแผ่น TLC เป็นสาร surfactin สามารถยับยั้งเชื้อรา *L. theobromae* และสามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusicoccum aromaticum* และ *Phomopsis persea* ได้เพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับ iturin A ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ

7. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียปฏิชีวนาต่อเซลล์

สารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิชีวนาที่ทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ไตของลิง (African green monkey kidney) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความใกล้เคียงกับเซลล์มนุษย์ พบว่า สารสกัดของแบคทีเรียปฏิชีวนา PN10, DL7 และ DL9 จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่ส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตลิง (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียปฏิชีวนาสายพันธุ์ PN10, DL7 และ DL9 ต่อเซลล์ไตลิง (African green monkey kidney)

Test: Cytotoxicity against Vero cells (African green monkey kidney) Method: Green Fluorescent Protein (GFP)-based assay IC₅₀ of positive control: Ellipticine = 0.541 µg/ml Reported date (dd/mm/yy): 10/03/2015										
Item	Screening code	Sample code	Final concentration (µg/ml)	Fluorescence unit at Day0		Fluorescence unit at Day4		% Cell growth	Cytotoxicity	IC ₅₀ (µg/ml)
				Average	SD	Average	SD			
	Negative	Cell+DMSO	0.5% DMSO	1490	49	3209	167	100.00	-	-
	Positive	Ellipticine	4.00	1508	51	1579	66	4.11	Cytotoxic	0.541
			2.00	1533	53	1739	80	11.99	Cytotoxic	
			1.00	1526	46	1975	113	26.12	Cytotoxic	
			0.50	1502	46	2438	138	54.47	Non-cytotoxic	
			0.25	1482	52	2788	206	75.92	Non-cytotoxic	
			0.13	1493	52	3050	197	90.57	Non-cytotoxic	
1	V9557	PN10	50.00	1574	32	4839	315	189.85	Non-cytotoxic	-
			16.67	1490	30	3949	95	142.99	Non-cytotoxic	-
			5.56	1480	25	3662	157	126.87	Non-cytotoxic	-
			1.85	1451	21	3479	125	117.88	Non-cytotoxic	-
			0.62	1441	21	3437	127	116.05	Non-cytotoxic	-
			0.21	1460	18	3410	50	113.40	Non-cytotoxic	-
2	V9558	DL7	50.00	1572	59	4875	168	192.06	Non-cytotoxic	-
			16.67	1518	39	4138	132	152.35	Non-cytotoxic	-
			5.56	1488	21	3774	109	132.90	Non-cytotoxic	-
			1.85	1467	25	3587	94	123.29	Non-cytotoxic	-
			0.62	1499	27	3578	89	120.93	Non-cytotoxic	-
			0.21	1549	86	3611	159	119.89	Non-cytotoxic	-
3	V9559	DL9	50.00	1537	40	3819	78	132.71	Non-cytotoxic	-
			16.67	1496	5	3701	71	128.20	Non-cytotoxic	-
			5.56	1493	20	3558	75	120.05	Non-cytotoxic	-
			1.85	1438	5	3385	61	113.22	Non-cytotoxic	-
			0.62	1454	16	3401	110	113.22	Non-cytotoxic	-
			0.21	1473	21	3364	133	109.94	Non-cytotoxic	-

Cytotoxicity against Vero cells

% Cell growth

>50%

≤ 50%

Cytotoxicity

Non-cytotoxic

Cytotoxic

8. การพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะในรูปแบบสารชีวภัณฑ์

การประเมินความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะในสารชีวภัณฑ์สูตรต่างๆ จำนวน 3 สูตร ที่ผลิตจากแบคทีเรียปฏิชีวนะ 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยประเมินความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 ของแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 3 สายพันธุ์ มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะสูงที่สุด แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ DL7, DL9 และ PN10 มีจำนวนแบคทีเรียปฏิชีวนะในเดือนที่ 6 เท่ากับ 7.55×10^8 , 3.73×10^8 และ 8.53×10^7 cfu/g ตามลำดับ แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ DL7 และ DL9 ชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะสูงกว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 ส่วนแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ PN10 คือ ชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะสูงกว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 (ตารางที่ 13) สอดคล้องกับการทดลองของนิชานันต์ (2554) ผลิตสารชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะ 5 ไอโซเลทในรูปแบบผง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง หลังการผลิต 4-6 เดือน แบคทีเรียปฏิชีวนะมีชีวิตรอดมากกว่า 75-100 % อาจเนื่องมาจากสูตรชีวภัณฑ์นี้มีส่วนผสมของแป้งข้าวเจ้า ทำให้แบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารก่อนที่จะมีชีวิตรอดจะถูกทำให้แห้ง ทำให้มีปริมาณของเซลล์แบคทีเรียมากกว่าชีวภัณฑ์ชนิดอื่นๆ ตั้งแต่เดือนที่ 1 แต่อย่างไรก็ตามความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะในชีวภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร หลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ตารางที่ 13 ความมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะในสารชีวภัณฑ์ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน

ชนิดแบคทีเรีย	สูตรชีวภัณฑ์	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (cfu/g)					
		เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่ 5	เดือนที่ 6
สายพันธุ์ PN10	สูตรที่ 1	3.45×10^6	1.72×10^6	6.93×10^6	5.38×10^6	4.75×10^6	4.53×10^6
	สูตรที่ 2	2.23×10^5	1.57×10^5	1.56×10^5	6.88×10^5	2.96×10^5	8.00×10^4
	สูตรที่ 3	8.45×10^7	1.19×10^7	8.65×10^7	8.08×10^7	9.18×10^7	8.53×10^7
สายพันธุ์ DL7	สูตรที่ 1	7.90×10^6	5.33×10^6	1.05×10^7	9.30×10^6	9.73×10^6	1.18×10^7
	สูตรที่ 2	2.21×10^7	1.31×10^7	1.42×10^7	1.38×10^7	3.28×10^7	1.98×10^7
	สูตรที่ 3	1.17×10^9	4.68×10^8	3.18×10^8	8.60×10^8	3.48×10^8	7.55×10^8
สายพันธุ์ DL9	สูตรที่ 1	1.73×10^7	2.55×10^6	9.65×10^6	8.73×10^6	1.04×10^7	9.83×10^6
	สูตรที่ 2	1.48×10^7	8.95×10^6	1.22×10^7	1.23×10^7	1.25×10^7	1.25×10^7
	สูตรที่ 3	2.23×10^9	8.70×10^8	1.19×10^9	1.25×10^9	1.39×10^9	3.73×10^8

9. ทดสอบชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ

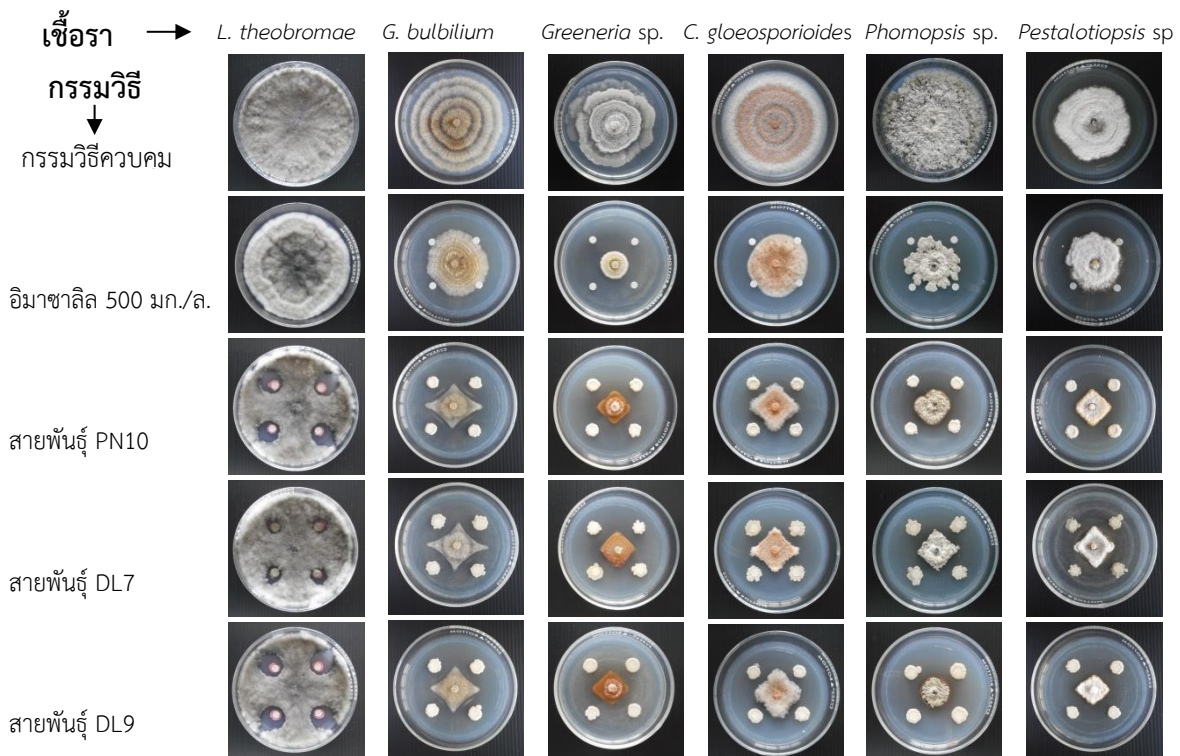
ทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 ในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ พบว่าชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ได้รับการคัดเลือกมาแล้ว มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL9 มีประสิทธิภาพสูงที่สุด สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *L. theobromae* ได้ 55.67 % รองลงมาคือ PN10 และ DL7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *L. theobromae* 51.45 และ 50.00 % (ตารางที่ 14)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งระหว่างแบคทีเรียปฏิปักษ์กับอิมิซาลิล พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพสูงกว่าในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะ คือ *L. theobromae*, *G. bulbilium*, *C. gloeosporioides*, *Phomopsis* sp., และ *Pestalotiopsis* sp. และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ยกเว้น เชื้อรา *Greeneria* sp. ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 15)

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใย (%) ของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (%) ⁽¹⁾					
	<i>L. theobromae</i>	<i>G. bulbilium</i>	<i>Greenria</i> sp.	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
อิมิซาลิล 500 มก/ล	0.00 d	46.22 b	65.35	39.66 b	42.89 b	6.76 b
สายพันธุ์ PN10	51.45 b	73.67 a	66.80	63.45 a	68.89 a	57.06 a
สายพันธุ์ DL7	50.00 c	73.22 a	66.13	67.89 a	71.67 a	56.17 a
สายพันธุ์ DL9	55.67 a	74.22 a	65.60	66.78 a	73.45 a	60.63 a
F-test	**	**	ns	**	**	**
CV (%)	2.69	10.75	8.40	7.80	5.56	13.63

(1) การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (%) ที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %



ภาพที่ 15 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใย
ของเชื้อราสาเหตุโรครดเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

10. ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ

10.1 ทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมที่เกิดจากการปลูกเชื้อรา

สาเหตุโรครดเน่าของเงาะ

ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 ในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ ที่เกิดจากการปลูกเชื้อรา *L. theobromae* พบว่า ชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งความรุนแรงของโรคผลเน่าบนผลเงาะเมื่อเปรียบเทียบกับ การพ่นน้ำ และอิมซาลิล 500 มิลลิกรัม/ลิตร มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ DL9, PN10 และ DL7 มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะ มีขนาดแผล 3.82, 3.99 และ 4.85 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดแผลที่เล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับ การพ่นด้วยน้ำ และ อิมซาลิล 500 มิลลิกรัม/ลิตร มีขนาดแผล 7.32 และ 7.32 เซนติเมตร และเมื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง พบว่า แบคทีเรียปฏิชีวนะ DL9, PN10 และ DL7 สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคผลเน่าของเงาะที่เกิดจากการปลูกเชื้อรา *L. theobromae* ได้ 47.92, 45.44 และ 33.83 % ตามลำดับ (ตารางที่ 15) ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับการใช้เซลล์แบคทีเรียโดยตรง (ผลการทดลองข้อ 3.1) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ชีวภัณฑ์โดยตรงทำให้ผลเงาะมีคราบผงสีขาวติดอยู่

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะที่เกิดจากการปลูกเชื้อรา *Lasiodiplodis theobromae* เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	ขนาดของผล (ซม.) ⁽¹⁾	การยับยั้งความรุนแรงของโรค (%)
กรรมวิธีควบคุม (น้ำ)	7.32 b	-
อิมมูนาไลต์ 500 มก/ล	7.31 b	6.84 c
สายพันธุ์ PN10	3.99 a	45.44 ab
สายพันธุ์ DL7	4.85 a	33.83 b
สายพันธุ์ DL9	3.82 a	47.92 a
F-test	**	**
CV (%)	15.76	30.05

(1) ขนาดของผลบนผลเงาะที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

10.2 ศึกษาผลของการใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลเงาะหลังการเก็บรักษา

ผลเงาะที่พ่นด้วยชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะ 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PN 10, DL 7 และ DL 9 เปรียบเทียบกับผลเงาะที่พ่นด้วยน้ำ และ อิมมูนาไลต์ 500 มิลลิกรัม/ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ความแน่นเนื้อของเปลือกเงาะ และความแน่นเนื้อของเนื้อเงาะ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ผลเงาะที่พ่นด้วยชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะ มีความแน่นเนื้อของเปลือกเงาะ อยู่ในช่วง 33.1-34.90 นิวตัน เปรียบเทียบกับความแน่นเนื้อของเปลือกผลเงาะที่พ่นด้วยน้ำ มีความแน่นเนื้อของเปลือกเงาะ เท่ากับ 33.73 นิวตัน ส่วนค่าความแน่นเนื้อของเนื้อเงาะ ผลเงาะที่พ่นด้วยชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะมีค่าความแน่นเนื้อของเนื้อเงาะอยู่ในช่วง 4.07-4.42 นิวตัน เปรียบเทียบกับความแน่นเนื้อของเนื้อเงาะที่พ่นด้วยน้ำ มีความแน่นเนื้อของเปลือกเงาะ เท่ากับ 3.12 นิวตัน (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ผลของชีวภัณฑ์ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อของเปลือกและเนื้อผลเงาะ ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

Treatment	ความแน่นเนื้อของเปลือกเงาะ (นิวตัน)	ความแน่นเนื้อของเนื้อเงาะ (นิวตัน)
กรรมวิธีควบคุม (น้ำ)	33.73	3.12
อิมมูนาไลต์ 500 มก/ล	36.11	4.36
สายพันธุ์ PN10	33.10	4.23
สายพันธุ์ DL7	34.90	4.42
สายพันธุ์ DL9	33.71	4.07
F-test	ns	ns
CV (%)	8.42	21.34

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ของผลเงาะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยผลเงาะที่พ่นด้วยชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PN10 มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้มากที่สุด เท่ากับ 19.56 องศาบริกซ์ ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ใกล้เคียงกัน คือ 18.76-19.32 องศาบริกซ์ (ตารางที่ 17) แสดงว่าผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลและกรดอินทรีย์

ตารางที่ 17 ผลของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

Treatment	ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (°Brix)
กรรมวิธีควบคุม (น้ำ)	18.86
อิมซาลิล 500 มก/ล	19.32
สายพันธุ์ PN10	19.56
สายพันธุ์ DL7	18.76
สายพันธุ์ DL9	18.96
<i>F</i> -test	ns
CV (%)	5.30

การเปลี่ยนแปลงสีของผลเงาะ พบว่าการเปลี่ยนแปลงสีความสว่าง (L) และ ค่าสีเขียว-แดง (a-value) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยผลเงาะที่ค่าความสว่างมากที่สุดคือผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PN10 เท่ากับ 37.44 ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ มีค่าความสว่าง อยู่ในช่วง 31.87-36.93 ค่า a value เป็นบวก แสดงว่าอยู่ในช่วงสีแดง และถ้าค่า a เป็นลบแสดงว่ามีช่วงสีเขียว ผลเงาะที่พ่นด้วยอิมซาลิล 500 มิลลิกรัม/ลิตร มีค่า a-value มากที่สุด เท่ากับ 15.64 แสดงว่าผลเงาะมีสีแดงมากที่สุด และ ผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PN10 มีค่า a น้อย เท่ากับ 11.62 แสดงว่าผลเงาะมีสีแดงน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนค่า b เป็นบวก แสดงว่าอยู่ในช่วงสีเหลือง ค่า b เป็นลบแสดงว่ามีช่วงสีน้ำเงิน ผลเงาะที่พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์วิธีมีค่า b อยู่ในช่วง 16.14-16.42 มีความแตกต่างทางสถิติกับผลเงาะที่พ่นด้วยน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) และพ่นด้วยอิมซาลิล 500 มิลลิกรัม/ลิตร มีค่า b เท่ากับ 22.98 และ 21.06 (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 ผลของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงสีของผลเงาะภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	L-value	a-value	b-value ⁽¹⁾
กรรมวิธีควบคุม (น้ำ)	36.93	12.05	22.98 a
อิมมูนาไลต์ 500 มก/ล	32.87	15.64	21.06 a
สายพันธุ์ PN10	37.44	11.62	16.42 b
สายพันธุ์ DL7	35.23	12.99	16.14 b
สายพันธุ์ DL9	34.84	14.90	16.32 b
F-test	ns	ns	**
CV (%)	8.58	26.70	12.51

⁽¹⁾ ค่า b-value ที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

โรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยว มีสาเหตุจากเชื้อราหลายชนิด คือ *Lasiodiplodia theobromae*, *Gliocephalotrichum* spp., *Greeneria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phomopsis* sp. และ *Pestalotiopsis* sp., ลักษณะอาการของโรคผลเน่าเริ่มแรกเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อนขยายไปตามเปลือกของเงาะต่อมาแผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือดำอย่างรวดเร็ว บางผลพบว่าการสร้างเส้นใยสีเทาฟู หรือเส้นใยสีขาวแกมเหลืองบนผลเงาะ ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราสาเหตุของโรคผลเน่าของเงาะ ลักษณะภายในผลเงาะที่เป็นโรคผลเน่าในระยะแรกไม่รุนแรง เปลือกเงาะด้านในเป็นสีน้ำตาลอ่อน ส่วนของเนื้อเงาะยังมีสีขาว ไม่มีน้ำเยิ้ม เมื่อแผลขยายลุกลามมากขึ้น เปลือกเงาะด้านในเป็นสีน้ำตาลเหลืองขยายลามใกล้เคียงกับเปลือกที่แสดงอาการด้านนอก เนื้อเงาะจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนจนถึงสีน้ำตาลอมเหลือง เนื้อจะนิ่มและละ มีน้ำเยิ้ม และมีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว

คัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะจากเมล็ดถั่วลิสง เมล็ดถั่วแดง ลำไยอบแห้ง ขั้วหวีของกล้วยหอมทอง สามารถแยกแบคทีเรียได้ 10 สายพันธุ์ คือ PN2, PN-A3, PN-A5, PN7, PN10, DL7, DL9, BA1 และ BP พบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ PN10, PN12, DL9 และ DL7 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae*, *G. bulbilium*, และ *Greeneria* sp. และสารจากแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ PN7, DL9, PN10 และ PN12 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *L. theobromae*, *G. bulbilium*, และ *Greeneria* sp. จากการศึกษาพบว่า เชื้อรา *L. theobromae* และ *G. bulbilium* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะที่ทำให้เกิดอาการของโรครุนแรง และ *Greeneria* sp. เป็นเชื้อราที่พบมาก

แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ DL9, PN10 และ DL7 มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะสามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ 57.82, 55.82 และ 52.97 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการพ่นด้วยอิมมูนาไลต์ 500 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคได้ 16.91 %

การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารละลายส่วนใสจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ 10 สายพันธุ์ พบว่าไม่เป็นพิษต่อการงอกของเมล็ดข้าว (พืชใบเลี้ยงเดี่ยว) และเมล็ดถั่วเขียว (พืชใบเลี้ยงคู่) และนำสารสกัดหยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 จำนวน 3 สายพันธุ์ มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่ส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ใด

จำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ ด้วยชุดทดสอบ API Test Kits พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PN10, DL7 และ DL9 เป็นแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* หรือ *B. amyloliquefaciens* มีค่าความเชื่อมั่นของการจำแนก 99.1-99.9 % และเมื่อจำแนกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่า สายพันธุ์ DL7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* 100.00 % ส่วน PN 10 และ DL 9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เหมือนกับแบคทีเรีย 2 ชนิด 99.91 และ 99.86 % ได้แก่ *Bacillus siamensis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*

แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 3 ชนิด คือ อะไมเลส, เซลลูเลส และโปรตีเอส

สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 บนแผ่น TLC ซึ่งมีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ (65:25:4 v/v/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 3 ตำแหน่ง ที่ Rf เฉลี่ย 0.47, 0.61 และ 0.70 นำมาวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยเครื่อง MS-MS ได้สาร 2 ชนิด คือ iturin และ surfactin

ชีวภัณฑ์สูตรที่ 3 ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงที่สุด แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ DL7 และ DL9 ชีวภัณฑ์สูตรที่ 2 มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงกว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PN10 คือ ชีวภัณฑ์สูตรที่ 1 มีอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงกว่าชีวภัณฑ์สูตรที่ 2

ชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ PN10, DL7 และ DL9 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของเงาะและการควบคุมโรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยวเช่นเดียวกับการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ข้อเสียของการใช้ชีวภัณฑ์โดยตรง คือ ผลเงาะจะมีลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาวติดอยู่บนผล

10. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าหลังเก็บเกี่ยวของเงาะ
2. แบคทีเรียปฏิปักษ์มีการสร้างสารต้านเชื้อรา แต่ประสิทธิภาพแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา สารต้านเชื้อราสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับเชื้อราสาเหตุชนิดเดียวแต่เป็นโรคผลเน่าของผลไม้ชนิดอื่น
3. สารต้านเชื้อราของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ PN10, DL7 และ DL9 คือ iturin และ surfactin สามารถสกัดสารและนำไปใช้ในงานอื่นได้

11. เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร, 2551, เก็บรักษาผลเงาะสดอย่างไรให้ยาวนาน, จดหมายข่าว ผลิใบ ก้าวใหม่กับการวิจัยและพัฒนาการเกษตร, 5: 1-4.
- ณิกานต์ นเรศวรกุล. 2554. สูตรชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคทางดินของมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 109 หน้า.
- ทศวรรณ ศรีระอุไร. 2547. การคัดเลือกจุลินทรีย์ผิวพืชเพื่อการควบคุมรา *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) สาเหตุโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะพันธุ์โรงเรียน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 84 หน้า.
- บุญยวดี จิระวุฒิ และ สุภา อโนธามณ. 2552. การใช้สารในกลุ่ม GRAS ในการควบคุมโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของเงาะ. น. 80-96. ใน : การประชุมวิชาการ วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ปี 2552 28-30 มิถุนายน 2552 ณ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช, ชะอำ, เพชรบุรี.
- วาริน อินทนา, มนตรี อิศรไกรศรี, ปัญจพร เลิศรัตน์ และ ประคอง เย็นจิตต์. 2548. การควบคุมโรคผลเน่าของเงาะที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* โดยใช้สารต่อต้านเชื้อราจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum*. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 36 (3-4) : 171-178.
- วรารณ ภูักัดดีพันธ์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2553. การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขอบใบแห้งข้าว. ที่มา : kuon.lib.ku.ac.th/Fulltext/KC4801027 18/5/2555
- สมศิริ แสงโชติ, อุดม ฟ้ารุ่งแสง และ นวลวรรณ ฟ้ารุ่งแสง. 2540. การเข้าทำลายของผลเงาะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่า และการควบคุมโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยว. ใน รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 35 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ : 108-116.
- สิรินันท์ ชมภูแสง. 2550. การจัดจำแนกและศึกษาคุณสมบัติของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ N10. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 161 หน้า.

สุรางค์ สุธิราวุธ. 2555. การตรวจสอบปริมาณและชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้ทางการเกษตรจากผลิตภัณฑ์นำเข้า.

ที่มา: www.doa.go.th/biotech/pdf-ktk/i_book_1.pdf 25/2/2559

- Arrebola, E., R. Jacobs and L. Korsten. 2010a. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogen. *Applied Microbiology* 108:386-395.
- Arrebola, E., D. Sivakumar, R. Bacigalupo, L. Korsten. 2010b. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest disease. *Crop Production* 29:311-410.
- Cho, S.J., S.Y. Hong, J.Y. Kim, S.Y. Park, M.K. Kim, W.J. Lim, E.C. Shin, E.J. Kim, Y.U. Cho and H.D. Yun. 2003. Endophytic *Bacillus* sp. CY22 from a Ballon Flower (*Platycodon grandiflorum*) Produces Surfactin Isoforms. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13:859-865.
- Gong A-D, Li H-P, Yuan Q-S, Song X-S, Yao W, He W-J, Zhang J-B, Liao Y-C. 2015. Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS One*. 10:e0116871
- Gordon, R.E, Hayne, W. C.& Pang, C. H.-N. 1973. The genus *Bacillus*. Washington, DC. United States Department of Agriculture.
- Hsieh, F.C., T.C. Lin, M. Meng and S.S. Koa. 2008. Comparing method for identifying *Bacillus* stains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr Microbiol* 56:1-5.
- Jeong, H., D-E. Jeong, S.H. Kim, G.C. Song, S-Y. Park, C-M, Ryu, S-H. Park and S-K. Choi. 2012. Draft Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Bacillus siamensis* KCTC 13613^T. *Journal of Bacteriology* 194:4148-4149.
- Kim, P.I., J. Ryu, Y.H. Kim, Y.T. Chl. 2010. Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20:138-145.
- Leelasuphakul, W., P. Hemmanee and S. Chuenchitt. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 48: 113-121.
- Logan, N. A. 1980. Studies on The taxomomy and identification of members of the genus *Bacillus*: application of miniaturized, standardized, commercially available test systems. PhD thesis, University of Bristol.

- Logan, N. A. and Berkeley, R. C. W. 1981. Classification and identification of members of the genus *Bacillus* using API tests. *In* The Aerobic Endospore-forming Bacteria : Classification and identification. pp. 105-140. Edited by R. C. W. Brekeley & M. Goodfellow, London : Academic Press.
- Mager-Dana, R., L. Thimin, F. Peypoux and M. Ptack. 1992. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74:1047-1051.
- Richter, M. and R. Rossello-Mora. 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:19126-19131.
- Sumpavapol, P., L. Tongyonk, S. Tanasupawat, N. Chokesajjawatee, P. Luxananil and W. Visessanguan. 2010. *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (*poo-khem*) in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:2364-2370.
- Yoshida, S., S. Hiradate, T. Tsukamoto, K. Hatakeda and A. Shirata. 2001. Antimicrobial Activity of Culture Filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry. *Phytopathology* 91:181-187.
- Zhang, S.M., Y.X Wang. L.Q. Meng, J. Li, X.Y. Zhao, X. Cao, X.L. Chen, A.X. Wang and J.F. Li. 2012. Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens*. *African Journal of Microbiology Research* 6:1747-1755.

12. ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ PN10

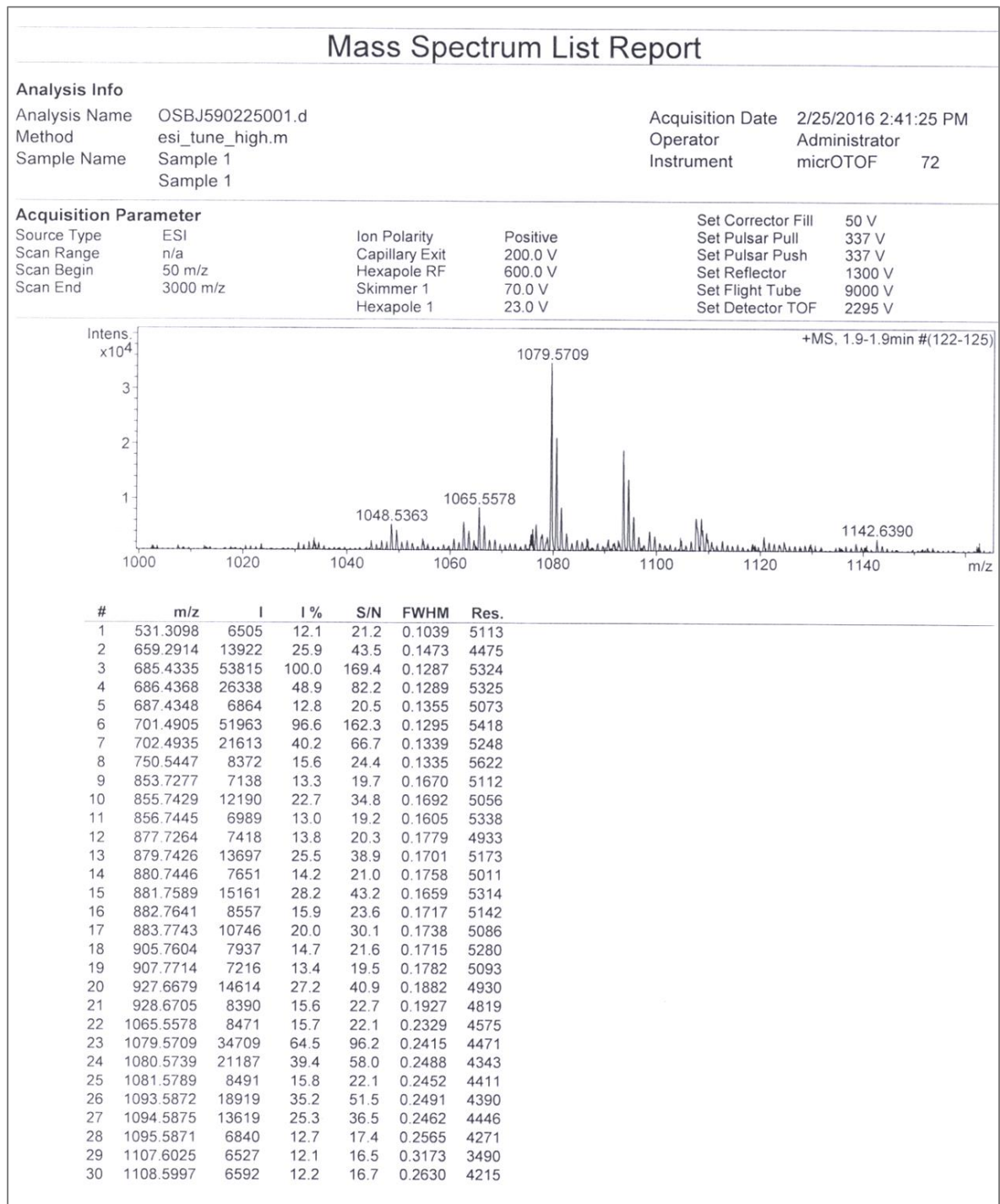
Rank	Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise Similarity (%)	Diff/Total nt
1	<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613(T)	Sumpavapol et al. 2010	AJVF01000043	99.91	1/1145
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	FZB42(T)	Borriss et al. 2011	CP000560	99.91	1/1145
3	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	CBMB205(T)	Madhaiyan et al. 2010	EU194897	99.74	3/1133
4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>amyloliquefaciens</i>	DSM 7(T)	Borris (ex Fukumoto 1943) Priest et al. 1987	FN597644	99.65	4/1145
5	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCIB 3610(T)	(Ehrenberg 1835) Nakamura et al. 1999	ABQLO1000001	99.65	4/1145
6	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	KCTC 13429(T)	Rooney et al. 2009	AMXN01000021	99.39	7/1145
7	<i>Bacillus tequilensis</i>	10b(T)	Gatson et al. 2006	HQ223107	99.39	7/1144
8	<i>Bacillus atrophaeus</i>	JCM 9070(T)	Nakamura 1989	AB021181	99.30	8/1145
9	<i>Bacillus vallismortis</i>	DV1-F-3(T)	Roberts et al. 1996	JH600273	99.30	8/1145
10	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-23049(T)	Nakamura et al. 1999	CP002905	99.21	9/1145
11	<i>Bacillus mojavensis</i>	RO-H-1(T)	Roberts et al. 1994	JH600280	99.21	9/1145
12	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	DSM 8802(T)	Delaporte and Sasson 1967	AM747812	99.21	9/1145
13	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580(T)	(Weigmann 1898) Chester 1901	AF017333	97.82	25/1145
14	<i>Bacillus sonorensis</i>	NBRC 101234(T)	Palmisano et al. 2001	AYTN01000016	97.55	28/1145
15	<i>Bacillus aerius</i>	24K(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831843	97.55	28/1143
16	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831842	97.12	33/1144
17	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831841	97.12	33/1144
18	<i>Bacillus aerophilus</i>	28K(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831844	97.12	33/1144
19	<i>Bacillus safensis</i>	FO-036b(T)	Satomi et al. 2006	AF234854	96.96	34/1118

ตารางผนวกที่ 2 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ DL7

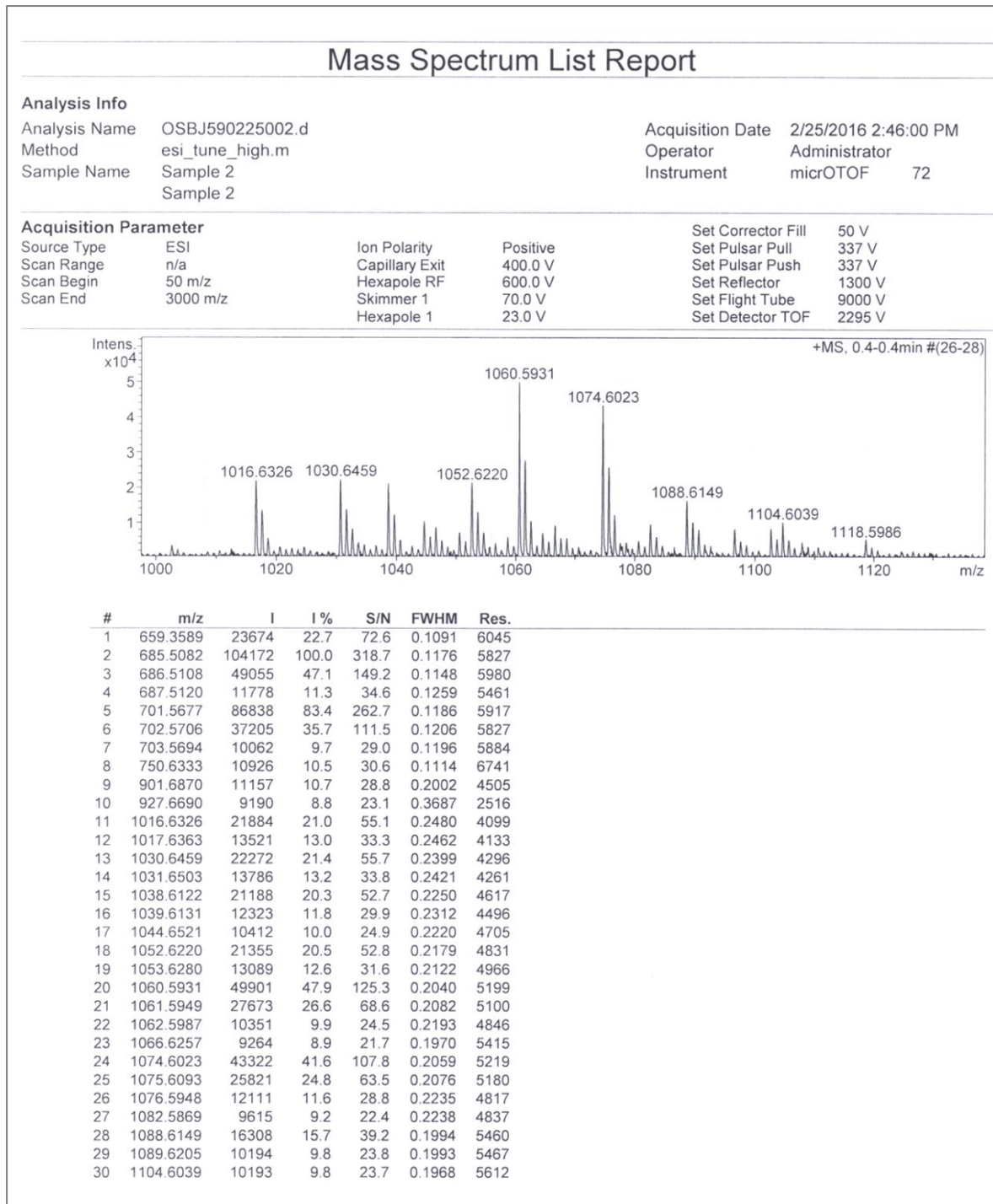
Rank	Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise Similarity (%)	Diff/Total nt
1	<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613(T)	Sumpavapol et al. 2010	AJVF01000043	100.00	0/1144
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	FZB42(T)	Borriss et al. 2011	CP000560	99.83	2/1144
3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>amyloliquefaciens</i>	DSM 7(T)	Borris (ex Fukumoto 1943) Priest et al. 1987	FN597644	99.83	2/1144
4	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCIB 3610(T)	(Ehrenberg 1835) Nakamura et al. 1999	ABQLO1000001	99.74	3/1144
5	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	KCTC 13429(T)	Rooney et al. 2009	AMXN01000021	99.56	5/1144
6	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	CBMB205(T)	Madhaiyan et al. 2010	EU194897	99.56	5/1133
7	<i>Bacillus vallismortis</i>	DV1-F-3(T)	Roberts et al. 1996	JH600273	99.48	6/1144
8	<i>Bacillus atrophaeus</i>	JCM 9070(T)	Nakamura 1989	AB021181	99.48	6/1144
9	<i>Bacillus tequilensis</i>	10b(T)	Gatson et al. 2006	HQ223107	99.48	6/1143
10	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-23049(T)	Nakamura et al. 1999	CP002905	99.39	7/1144
11	<i>Bacillus mojavensis</i>	RO-H-1(T)	Roberts et al. 1994	JH600280	99.39	7/1144
12	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	DSM 8802(T)	Delaporte and Sasson 1967	AM747812	99.39	7/1144
13	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580(T)	(Weigmann 1898) Chester 1901	AF017333	97.99	23/1144
14	<i>Bacillus sonorensis</i>	NBRC 101234(T)	Palmisano et al. 2001	AYTN01000016	97.73	26/1144
15	<i>Bacillus aerius</i>	24K(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831843	97.72	26/1142
16	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831842	97.20	32/1143
17	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831841	97.20	32/1143
18	<i>Bacillus aerophilus</i>	28K(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831844	97.20	32/1143
19	<i>Bacillus safensis</i>	FO-036b(T)	Satomi et al. 2006	AF234854	97.05	33/1117
20	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061(T)	Meyer and Gottheil 1901	ABRX01000007	96.94	35/1143

ตารางผนวกที่ 3 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ DL9

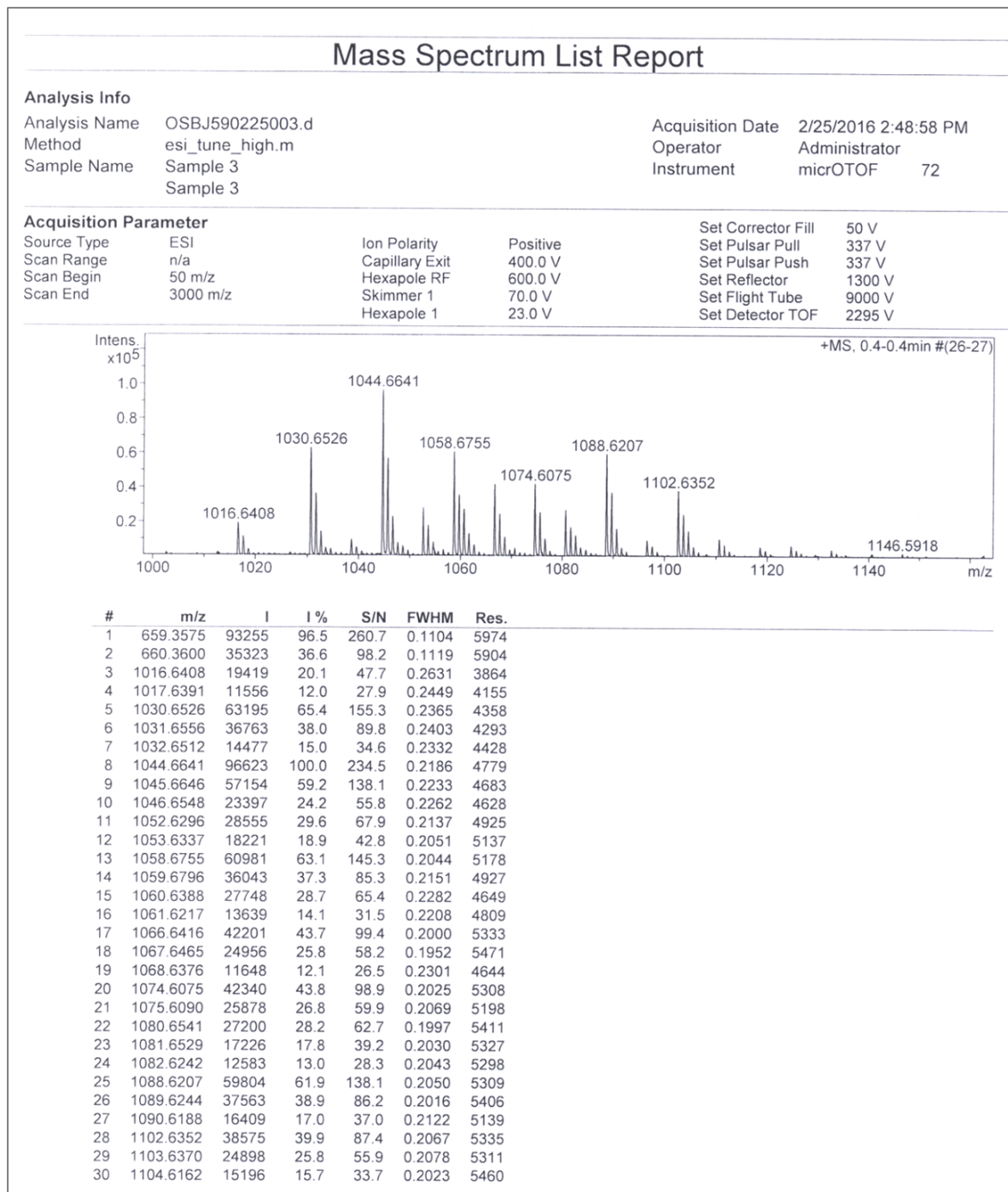
Rank	Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise Similarity	Diff/Total nt
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	FZB42(T)	Borriss et al. 2011	CP000560	99.86	1/707
2	<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613(T)	Sumpavapol et al. 2010	AJVF01000043	99.86	1/707
3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>amyloliquefaciens</i>	DSM 7(T)	Borris (ex Fukumoto 1943) Priest et al. 1987	FN597644	99.58	3/707
4	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	CBMB205(T)	Madhaiyan et al. 2010	EU194897	99.57	3/697
5	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCIB 3610(T)	(Ehrenberg 1835) Nakamura et al. 1999	ABQLO1000001	99.43	4/707
6	<i>Bacillus atrophaeus</i>	JCM 9070(T)	Nakamura 1989	AB021181	99.43	4/707
7	<i>Bacillus vallismortis</i>	DV1-F-3(T)	Roberts et al. 1996	JH600273	99.01	7/707
8	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	KCTC 13429(T)	Rooney et al. 2009	AMXN01000021	99.01	7/707
9	<i>Bacillus tequilensis</i>	10b(T)	Gatson et al. 2006	HQ223107	99.01	7/706
10	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-23049(T)	Nakamura et al. 1999	CP002905	98.87	8/707
11	<i>Bacillus mojavensis</i>	RO-H-1(T)	Roberts et al. 1994	JH600280	98.87	8/707
12	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	DSM 8802(T)	Delaporte and Sasson 1967	AM747812	98.73	9/707
13	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580(T)	(Weigmann 1898) Chester 1901	AF017333	97.45	18/707
14	<i>Bacillus sonorensis</i>	NRRL B-23154(T)	Palmisano et al. 2001	AF302118	97.03	21/707
15	<i>Bacillus aerius</i>	24K(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831843	97.02	21/705
16	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831841	96.03	28/706



ภาพผนวกที่ 1 ค่า Mass spectrum ของสารที่ 1 ค่า Rf = 0.47



ภาพผนวกที่ 2 ค่า Mass spectrum ของสารที่ 2 ค่า Rf = 0.61



ภาพผนวกที่ 3 ค่า Mass spectrum ของสารที่ 3 ค่า Rf = 0.70