1. บทนำ

ส้มเป็นผลไม้ที่สำคัญทางเศรษฐกิจของทั่วโลกมีต้นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีสารอาหารที่มีคุณค่าอาหารสูง ส้มที่ปลูกในประเทศไทยจะมีรสอมเปรี้ยวอมหวาน เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มบางมด ส้มโชกุน ส้มสายน้ำผึ้ง เป็นต้น ส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata*) เป็นส้มที่คนไทยนิยมบริโภคมากที่สุด ส้มเขียวหวานที่ผลิตได้ในแต่ละปี ใช้บริโภคกันทั้งภายในประเทศและส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ นำเงินตราต่างประเทศเข้าสู่ประเทศมีมูลค่าหลายล้านบาท อย่างไรก็ตามปริมาณการผลิตที่ผ่านมายังไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภคภายในประเทศ ซึ่งมีความต้องการสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 8 (2540-2544) จึงได้มีการจัดทำแนวทางการพัฒนาส้มเขียวหวาน โดยการขยายพื้นที่การเพาะปลูกให้มีผลผลิตที่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและการตลาด และเพื่อปรับปรุงคุณภาพให้ได้มาตรฐานสอดคล้องกับความต้องการของตลาด (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2540) และจากสถิติข้อมูลการส่งออกของกรมศุลกากรพบว่าในปี 2545-2548 มูลค่าการส่งออกส้มเขียวหวานมีมูลค่าเพิ่มขึ้นทุกปีอย่างต่อเนื่อง (http://www.customs.go.th)

โรคจัดเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการเพาะปลูกพืชที่สามารถทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้ปลูก ซึ่งเกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มเพาะปลูกจนกระทั่งหลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะผักและผลไม้ การเน่าเสียของผัก และผลไม้ทั่วโลกเกิดภายหลังการเก็บเกี่ยวสูงถึง 25-50 เปอร์เซ็นต์ (Fajardo *et al.*, 1998; Spadaro and Gullino, 2004) ส้มก็เช่นกัน สาเหตุที่สำคัญคือเชื้อราที่เป็นสาเหตุหลักในการเข้าทำลายผลส้ม ได้แก่ *Penicillium italicum* Wehmer (รานำ้เงิน) และ *P. digitatum* Sacc. (ราเขียว) โดยราเขียวเข้าทำลายผลส้มได้เร็วกว่ารานำ้เงิน นอกจากนี้ยังมีโรคเน่าเปรี้ยว (sour rot) เกิดจากเชื้อ *Geotrichum candidum* ซึ่งเป็นสาเหตุรองในการเน่าของผลส้ม โดยเฉพาะบริเวณเพาะปลูกที่มีปริมาณฝนต่อปีสูง (Plaza *et al.*, 2004; Lopez-Garcia *et al.*, 2003) ในธรรมชาติเชื้อราเหล่านี้มีอยู่ทั่วไปบนผิวของผลไม้ แต่มักจะไม่ทำให้ผลเน่าเสียก่อนการเก็บเกี่ยว เพราะผลไม้ดิบนั้นมีสารประกอบต่างๆที่สามารถป้องกันราได้ตามธรรมชาติ เช่น cutin, organic acids, hydrolytic enzymes, protopectin และ phytoalexin เป็นต้น แต่เมื่อผลไม้สุก สารต่างๆเหล่านี้จะลดลง นอกจากนั้นการเก็บเกี่ยวทำให้เกิดบาดแผล ทำให้ผลไม้เน่าเสียได้ง่าย (มลศิริ, 2535) โรคหลังเก็บเกี่ยวของผักและผลไม้ อาจจะลดความรุนแรงลงได้โดยการเพิ่มความต้านทานให้กับผักและผลไม้ เช่น เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ เก็บรักษาในสภาพออกซิเจนต่ำและการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชะลอกระบวนการเสื่อม สภาพของผลิตผล อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวอาจจะไม่พอเพียงต่อการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องเก็บรักษาผลิตผลไว้เป็นระยะเวลานานๆ หรือในระหว่างการขนส่งผลิตผลไปยังตลาดต่างประเทศ

ปัจจุบันการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราจะฉีดพ่นตั้งแต่ระยะปลูกอยู่ในสวน แล้วฉีดพ่นยาฆ่าเชื้อราซ้ำอีกครั้งหลังเก็บเกี่ยว (Eckert, 1990; http://www.thai.net/happyhort/LS9.htm) การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคทั้งในช่วงก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวมักผสมกับแวกซ์เคลือบผิวผลส้ม เป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต ก่อให้เกิดการปนเปื้อนเกิดมลภาวะในสิ่งแวดล้อมและการตกค้างของสารเคมีในผลผลิตที่ออกไปสู่ผู้บริโภค

การใช้ยาฆ่าเชื้อราเพื่อควบคุมโรคยังทำให้เกิดผลเสียต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (nature microflora) ซึ่งสามารถควบคุมโรคพืชได้ และยังเป็นสาเหตุให้เชื้อก่อโรคด้านทานสารเคมีได้ อนึ่งการใช้สารฆ่าเชื้อราบางชนิดยังไม่เป็นที่ยอมรับของบางประเทศส่งผลให้เกิดการกีดกันทางการค้าในการส่งไปจำหน่าย หรือส่งออกผลผลิตอีกด้วย (San-Lang *et al.*, 2002) เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว การใช้ความรู้ทางการควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี ซึ่งมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในพืชหลายชนิดโดยนำจุลินทรีย์ทั้งที่เป็นเชื้อราและแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคต่อคนและสัตว์ มาพัฒนาและใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคที่มีสาเหตุมาจากทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาหรือควบคุมโรคระยะก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว

การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นในเรื่องศักยภาพของ *Bacillus* spp. ที่แยกจากดินและสารสกัดหยาบ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ที่ก่อให้เกิดโรคเน่าของผลส้ม เพื่อนำมา ใช้ในการลดการสูญเสียผลส้มหลังการเก็บเกี่ยว ลดการใช้สารเคมี ป้องกันการตกค้างของสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และเป็นอุปสรรคต่อการส่งออก

1.1 ส้ม (Citrus Fruit)

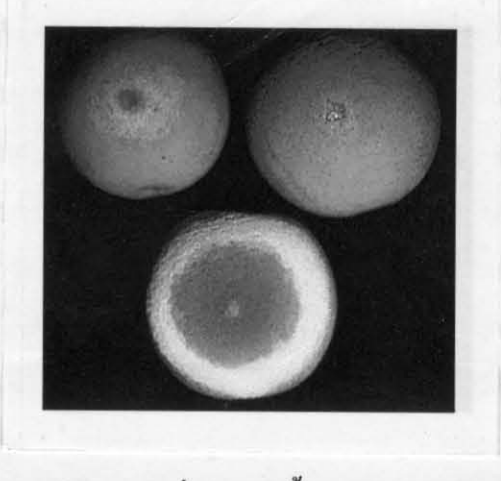
ผลไม้ตระกูลส้มที่ปลูกตามภูมิภาคต่างๆของโลกมีอยู่ด้วยกันหลายชนิดและหลาย สายพันธุ์ โดยทั่วไปแล้วส้มที่ปลูกในสภาพกึ่งร้อนจะมีผิวสีเหลืองสดจนถึงสีส้ม ส่วนส้มในเขตร้อนจะมีผลสีเขียว ซึ่งไม่เป็นที่นิยมของตลาดโลกจึงใช้บริโภคภายในท้องถิ่นเป็นส่วนใหญ่ การจัดแบ่ง กลุ่มของส้มตามหลักชองพืชสวน โดยใช้ความสำคัญทางเศรษฐกิจ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ (มงคล, 2535) คือ กลุ่มออเรนซ์ แบ่งเป็น สวีทออเรนซ์ และ ซาวออเรนซ์ กลุ่มแมนดาริน เป็นกลุ่มส้มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในเขตร้อนบางครั้งเรียกแทนเจอรีน กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุ๊ท และกลุ่มผลที่มีรสเปรี้ยว นอกจากนี้ยังมีสกุลใกล้เคียงกันกับส้ม และมีความสำคัญโดยใช้เป็นต้นตอพืชสกุลส้ม พันธุ์ส้มที่ปลูกในประเทศไทย ได้แก่ (1) ส้มเกลี้ยง (2) ส้มตรา หรือ ส้มเช้ง (3) ส้มเขียวหวาน ได้แก่ ส้มบางมด เช่น ส้มผิวทอง ส้มสีทอง เป็นต้น และส้มโชกุน เป็นพันธุ์ส้มเปลือกล่อนที่อาจรู้จักในนามของส้มสายน้ำผึ้ง หรือ ส้มเพชรยะลาเป็นพันธุ์ที่มีลักษณะทรงต้นและขนาดต้นใกล้เคียงกับส้มเขียวหวาน (4) ส้มจุก ส้มแก้ว (5) ส้มโอ และ (6) มะนาว

1.2 โรคส้ม (Citrus disease)

ส้มเป็นไม้ผลที่มีโรคและแมลงรบกวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับไม้ผลทั่วไป สายพันธุ์ส้มเขียวหวานที่ปลูกในประเทศไทยมีข้อจำกัดในการแปรรูป และไม่คงทนในการขนส่ง เนื่องจากเป็นส้มเปลือกบาง และมีความหวานสูง (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2540) โรคส้มหากจำแนกตามสาเหตุจำแนกได้ 2 สาเหตุ คือ Abiotic diseases เป็นโรคที่เกิดจากธาตุอาหาร สภาพแวดล้อมที่ผิดปกติ ผลจากพันธุกรรม หรือสารเคมีบางชนิด โดยพืชแสดงอาการเป็นโรคได้เช่นเดียวกับเชื้อโรคแต่ไม่แพร่ระบาดและมักพบในเฉพาะบางพื้นที่หรือเฉพาะบางเวลาเท่านั้น Biotic diseases เป็นโรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต รวมถึง แบคทีเรีย รา ไส้เดือนฝอย ไวรัส และ prion ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถเข้าสู่ผลไม้ได้ทางบาดแผลที่อาจเกิดจากการกระแทกของผล

และอิทธิพลจากสภาพอากาศ เช่นปัญหาเชื้อราก่อโรคจะปรากฏและรุนแรงในช่วงที่มีความชื้นสูง และการเกิดราที่ใบมักเกิดในที่ร้อนชื้นฝนตกชุกมากกว่าที่ชื้นหนาวเย็น ส่วนในบริเวณพื้นที่เพาะปลูกที่มีสภาพอากาศแห้งแล้งมากและมีฝนตกเล็กน้อยโรคอาจไม่เป็นปัญหาเนื่องจากเชื้อไม่สามารถเข้าทำลายหรืออยู่รอดได้ ผลส้มหลังเก็บเกี่ยวที่ยังไม่ได้เคลือบผิว เมื่อเก็บรักษาในห้องเย็น จะเกิดปัญหาขึ้นหลายประการ เช่น การเน่าเสียเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ผลผลิตที่เก็บรักษาไว้เสียหาย

เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคที่พบภายหลังการเก็บเกี่ยวผลส้มหากแบ่งตามช่วงการติดเชื้อได้ 2 ประเภท ประเภทแรกติดเชื้อเกิดก่อนเก็บเกี่ยว เช่น เชื้อ *Diplodia natalensis, Phomopsis citri, Colletotrichum gloeosporioides, Phytophthora* sp. และ *Alternaria citri* เข้าสู่ผลทางรอยที่เกิดจากการปลิดผลออกจากต้น เชื้อราไม่เจริญเติบโตในช่วงแรก แต่จะเจริญเติบโตเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน ประการหลังการติดเชื้อเกิดหลังการเก็บเกี่ยวเชื้อราที่สำคัญ คือ *P. digitatum* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้รุนแรงที่สุดในผลส้ม เนื่องจากสปอร์นับล้านที่ติดบนผิวเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ สามารถพบได้ทั้งในสวน พื้นที่บรรจุ ห้องเก็บ ตู้ขนส่ง และตลาดจำหน่าย เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ราเขียวสามารถงอกผ่านผิวส้มเข้าไปทางบาดแผลที่เกิดจากการเก็บเกี่ยว หรือขั้นตอนของการซ้อนทับในภาชนะบรรจุ และต่อมน้ำมันที่ผิว อาการเริ่มปรากฏที่ผิวของผลโดยเกิดเป็นจุดฉ่ำน้ำที่เปลือก มีจุดซีด ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีขาวและขยายขนาดเป็น 2-4 เซนติเมตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ดังรูปที่ 1 เนื้อเยื่อจะนิ่มเมื่อกดด้วยนิ้วจะทะลุถึงส่วนที่เป็นเนื้อได้ เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวที่ส่วนของเปลือก หลังจากนั้นสร้างสปอร์สีเขียวมะกอกขึ้นตรงกลางแผลและแผ่คลุมทั้งผลในที่สุด เนื่องจากสปอร์สีเขียวมะกอกดังกล่าวสามารถฟุ้งกระจายได้ง่ายทำให้โรคนี้แพร่ระบาดจากผลหนึ่งไปสู่อีกผลหนึ่งได้อย่างรวดเร็ว (http://www. fdocitrus. com) ความรุนแรงของการเกิดโรคขึ้นกับสภาพแวดล้อม เช่น ในสภาพความชื้นต่ำ แผลอาจแห้งไป แต่ถ้ามีความชื้นอาการของโรคจะรุนแรง และอาจมีเชื้อราชนิดอื่นเข้าทำลายต่อในกรณีที่เกิดร่วมกับอาการโรคเน่าราน้ำเงิน (*P. italicum*) อาการของโรคเน่าราเขียวปรากฏขึ้นก่อน ต่อมาอาการของโรคเน่าราน้ำเงินปกคลุมแผลทั้งหมด นอกจากนี้ *P. digitatum* ยังสามารถทำให้เกิดโรคเน่าเปรี้ยว (sour rot) โดยผลิตเอนไซม์ที่หลั่งออกมาย่อยผนังเปลือก ทำให้ผลนิ่มและช้ำน้ำ การทำลายของโรคเน่าราเขียวจะเกิดเฉพาะส่วนเปลือกเท่านั้นแต่คุณภาพของเนื้อและน้ำในผลจะเสียไปด้วย (ดนัย, 2543)



รูปที่ 1 อาการของโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* บนผลส้ม

(http://www.andaluciainvestiga.com)

1.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Penicillium digitatum*

เชื้อรา *P. digitatum* จัดเป็น Mitosporic Ascomycetes เจริญได้ดีบนอาหารเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โคโลนีมีลักษณะแบน ผิวหน้าคล้ายกำมะหยี่ เส้นใยมีสีขาว กลุ่ม โคนิเดียขณะยังอ่อนมีสีเขียวถึงเขียวมะกอก และมีสีอ่อนลงหรือสีน้ำตาลเมื่อโตเต็มที่ โคนิดิโอฟอร์เกิดจากเส้นใยบริเวณผิวหน้าหรืออยู่ในอากาศ ลักษณะโคนิเดียเป็นแบบรูปกลมไข่ (ellipsoidal) ถึง รูปทรงกระบอก (cylindrical) ผนังเรียบ มีขนาด 6-8 × 2.5-5 ไมโครเมตร stipes ยาว 70-150 ไมโครเมตร รูปร่างผอมมีผนังเซลล์เรียบ rami มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก ขนาด 20-30 × 5-6 ไมโครเมตร metulae มีขนาด 15-2 × 5-6 ไมโครเมตร ไฟอะไลด์มีขนาด 10-20 × 4-5 ไมโครเมตร (Pitt, 1988; Holliday, 1980) ดังรูปที่ 1 เมื่อผลไม้ติดเชื้อในรูปสปอร์ เมื่อสภาวะเหมาะสมสปอร์ที่ผิวเปลือกของผลจะทำการงอกผ่านเข้าไปทางบาดแผล และต่อมน้ำมันทำให้เชื้อแพร่กระจายไปทั่ว จะสังเกตเห็นอาการคล้ายแผลที่ช้ำจากการได้รับความเย็นเชื้อราสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 24°ซ แต่เจริญช้าที่อุณหภูมิมากกว่า 30°ซ และที่ต่ำกว่า 10°ซ และไม่เจริญที่ 1°ซ (Holliday, 1980) Faid และ Tantaoui-Elaraki (1989) พบว่า *P. digitatum* ผลิตสารเมตาบอไลท์ที่เป็นพิษต่อแบคทีเรีย พืชและสัตว์ได้

1.4 การควบคุมโรคเน่าเชื้อรา *P. digitatum* ด้วยสารเคมีกำจัดเชื้อรา

การควบคุมโรคควรเริ่มตั้งแต่ในแปลงโดยอาจฉีดพ่นสารเคมีก่อนการเก็บเกี่ยว 3 สัปดาห์ เก็บเกี่ยวด้วยความระมัดระวังไม่ให้เกิดบาดแผล หรือรอยช้ำ ภาชนะบรรจุการควรทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่อาจตกค้างด้วย chlorine, quaternary ammonium compounds, formaldehyde และ alcohol เป็นต้น จากนั้นเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ หรือในสภาพควบคุมบรรยากาศ โดยก่อนเก็บรักษานั้นอาจควบคุมการเข้าทำลายของเชื้อโดยสารเคมี

การใช้สารเคมีควบคุมโรคของผลส้มหลังการเก็บเกี่ยวมีพื้นฐานการใช้ 2 วิธี คือการรมควัน หรือการใช้สารละลาย (เกษม, 2532; Eckert, 1990) การพ่นรมควันด้วยสารเคมี มักใช้ไบฟีนิล (biphenyl) เพื่อควบคุมการเน่าในระหว่างการขนส่ง และเก็บรักษา โดยใช้กับวัสดุห่อผลและในแผ่นกระดาษที่วางรองพื้น ไบฟีนิลสามารถระเหิดหรือระเหยไปในบรรยากาศรอบๆผล และยับยั้งการเน่าเสียจากรา *P. digitatum* โดยยับยั้งการงอกของสปอร์ และป้องกันการเน่าเสียของผลที่อยู่ข้างเคียง แต่พบปัญหาพิษตกค้างบนผลผลิตซึ่ง หากมีค่าเกิน 70 มก.ต่อกก.จะไม่ยอมรับในตลาดญี่ปุ่นและยุโรป นอกจากนี้ *P. digitatum* บางสายพันธุ์ยังสามารถด้านทานต่อสารไบฟีนิล และเกิด cross-resistant ต่อ Sodium-O-phenylphenate (SOPP) ได้ในกล่องบรรจุที่มีการใช้สาร SOPP ร่วมกับไบฟีนิลในรูปของสารละลาย หรือสารแขวนลอย การใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราร่วมกับการทำความสะอาดและกำจัดสิ่งสกปรก จัดเป็นวิธีมาตรฐานที่ปฏิบัติกันมาในการรักษาผลส้ม โดยสารเคมีที่นิยมใช้ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว คือ เบนโนมิล (benomyl), อิมาซาลิล (imazalil), และ ไทอะเบนดาโซล (thiabendazole) (Fajardo *et al.*, 1998) โดย อิมาซาลิล และ ไทอะเบนดาโซล มักใช้ในรูปสารละลายก่อนใช้เคลือบผล เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *P. digitatum* และ เชื้อรา *P. italicum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (มีผลยับยั้งการสร้างสปอร์) การใช้ร่วมกับ wax ต้องใช้ในความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า นอกจากนี้การใช้ความร้อนร่วมกับอิมาซาลิลทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีขึ้น

ในปี ค.ศ. 1970 พบว่าการใช้ไทอะเบนดาโซล เพื่อควบคุมโรคบนผลส้มหลังการเก็บเกี่ยวนานถึง 30 ปีนั้น ส่งผลทำให้เชื้อรา *Penicillium* spp. ต้านทานสารเคมี ในปี ค.ศ. 1981 ในแคลิฟอร์เนียจึงเปลี่ยนมาใช้อิมาซาลิลควบคุมโรคในส้มหลังการเก็บเกี่ยว หลังจาก 5 ปีพบว่าเชื้อรา *P. digitatum* สามารถต้านยานี้ได้ (Holmes and Eckert, 1999) พบว่าการใช้เบนโนมิลเพื่อควบคุมเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้ม เชื้อราสายพันธุ์ที่มาจากสหรัฐอเมริกาและออสเตรเลียสามารถต้านโรคได้ (Wild, 1994) แต่สามารถใช้กัวซาทีน (Guazatine) ควบคุมได้ในออสเตรเลีย จึงได้มีแนวคิดใช้สารเคมีมากกว่า 2 ชนิด หรือใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราผสมในขี้ผึ้ง (wax) เพื่อเคลือบผลส้มเพื่อลดปัญหาการต้านทานสารเคมี แต่ยังพบว่า *P. digitatum* เกิดการต้านทานเนื่องจากมีการใช้ในปริมาณที่มากและระยะยาวเกินไปส่งผลให้เชื้อราสามารถดื้อต่อสารเคมีที่ใช้ จึงใช้ไม่ได้ผลเท่าที่ควร และต้องใช้ในปริมาณที่สูงขึ้นเรื่อยๆ การตกค้างของสารเคมีจำพวกนี้ก่อให้เกิดมลพิษทางดิน ปนเปื้อนในแหล่งน้ำเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคโดยตรง (Shoda, 2000) และยังเป็นมลภาวะด้านกลิ่นรบกวนผู้พักอาศัยในบริเวณใกล้เคียง และการใช้สารกำจัดเชื้อราบางชนิดยังไม่เป็นที่ยอมรับของบางประเทศส่งผลให้เกิดการกีดกันทางการค้าในการส่งไปจำหน่าย ดังในสหรัฐอเมริกาห้ามใช้กัวซาทีนเพื่อควบคุมโรคบนผลส้มหลังการเก็บเกี่ยว (Eldon, 1988) และยังได้กำหนดปริมาณอิมาซาลิลที่ตกค้างสูงสุดในผลส้มไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกรัม (Smilanick, 1997) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าปริมาณที่มีการใช้เพื่อควบคุมโรคส้มในประเทศที่ส่งออกผลส้ม นอกจากนี้การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราเป็นการทำลายจุลินทรีย์ประจำถิ่น (nature microflora) ที่ควบคุมเชื้อก่อโรคได้ในพืชไป เช่น พบ *Alternaria citri* ในผลส้ม หลังการใช้เบนโนมิลเพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Penicillium* spp.

1.5 การควบคุมโรคเน่าเชื้อรา *P. digitatum* ด้วยความร้อนและสารเคมี

Porat และคณะ (2000) ควบคุมเชื้อรา *P. digitatum* และ *P. italicum* ในเกรพฟรุทโดยใช้ความร้อนตั้งแต่ 30 °ซ ขึ้นไปพบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ และโรคจากเชื้อรา *P. digitatum* เกิดขึ้นได้อย่างช้าๆ แต่การใช้ความร้อนเป็นการเสี่ยงที่จะทำให้เกิดบาดแผลบนเปลือกผลส้ม (Palou *et al.*, 2001) และพบว่าความร้อนที่ 45 °ซ ไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้อย่างสมบูรณ์ เพียงแต่ทำให้เชื้อราก่อโรคเจริญได้ช้าลง (Obagwu and Korsten, 2003) จึงได้มีการนำสารเคมีมาใช้ควบคู่ไปด้วย เช่น การใส่โซเดียมไบคาร์บอเนต บอแรกซ์ และกรดบอริกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา หรือการใส่แคลเซียมโพลีซัลไฟด์ ทำให้มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์ราเพิ่มขึ้น แต่การใช้แคลเซียมโพลีซัลไฟด์ทำให้เกิดกลิ่นของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งเป็นพิษต้องมีการควบคุมให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อคนงาน และ Kinay และคณะ (2005) พบว่า การใช้สารผสมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์ จิบเบอร์เรอลิน และเบนโนมิลในผลส้มก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวสามารถควบคุมเชื้อรา *P. digitatum* ได้อย่างสมบูรณ์

1.6 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control)

ในปัจจุบันได้มีการค้นคว้าหาวิธีการควบคุมโรคพืชใหม่ๆ เพื่อลดปัญหาอันตรายจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่เพิ่มขึ้น และช่วยควบคุมเชื้อราก่อโรคที่เกิดการกลายพันธุ์ โดยให้เกษตรกรหันมาใช้การ

ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งเป็นการลดจำนวนเชื้อก่อโรค หรือ กิจกรรมของเชื้อโรคโดยสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่ายกเว้นมนุษย์ (Cook and Baker, 1983) มีการยอมรับว่าใช้ได้ผลดี ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และลดต้นทุนในการควบคุมโรค (Spadaro and Gullino, 2004) การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนิยมกระทำกันอยู่ 2 ประเภท คือใช้เชื้อที่มีอยู่หรือที่ผลิตขึ้นมาใหม่ทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยตรง โดยอาจมีการปรับสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสม หรือเร่งการเจริญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และการใช้เชื้อพันธุ์ที่อ่อนแอกว่าทำลายหรือต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคพืชพันธุ์ปกติ การใช้วิธีนี้คล้ายการฉีดวัคซีนป้องกันโรคเป็นการสร้างภูมิคุ้มกันหรือ cross protection (สืบศักดิ์, 2540) การศึกษาถึงกลไกการควบคุมโรคและระบบการควบคุมโรคโดยวิธีต่างๆ โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา โดยมีกลไกควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้ 4 ลักษณะ คือ

1. การแข่งขัน (competition) เป็นลักษณะที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยเฉพาะยีสต์มีความสามารถแข่งขันกับเชื้อก่อโรคพืชในด้านต่างๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโต หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ได้ พืชจึงเจริญเติบโตแข็งแรง และมีผลผลิตสูงขึ้น (Spadaro and Gullino, 2004)

2. การทำลายชีวิต (antibiosis) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจคัดเลือกมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้น จะเน้นคุณสมบัติการทำลายชีวิตของเชื้อโรคเป็นส่วนใหญ่ โดยเชื้อปฏิปักษ์นี้ผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ เช่นการผลิตสารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) พบว่ากลไกชนิดนี้เป็นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่สำเร็จเป็นครั้งแรกโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 ผลิตสาร bacteriocin ที่มีชื่อว่า agrocin 84 ไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *A. tumefaciens* biotype 1 และ 2 สาเหตุโรคปุ่มปม (crown gall) ของพืชได้ (Vicedo *et al.*,1992) สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้มักเป็นสารอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ นอกจากนี้ยังมีกลุ่มของสารระเหย (volatile substance) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา Mackie และ Wheatley (1999) พบว่าสารระเหยมีผลต่ออัตราการเจริญของเส้นใยราและแอคติวิตี้ของเอนไซม์ของเชื้อรา การตอบสนองของเชื้อราแต่ละชนิดต่อสารระเหยนั้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด สิ่งแวดล้อม และอายุของเชื้อราและแบคทีเรีย

3. การเป็นปรสิต (parasitism) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (parasite) หมายถึง การที่เชื้อเข้าไปเจริญอาศัยทำลายส่วนต่างๆภายในสิ่งมีชีวิตอื่นซึ่งพบได้ไม่มากนัก การใช้ควบคุมโรคพืชยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนปฏิกิริยาแบบการทำลายชีวิต โดยขึ้นกับสภาพแวดล้อมเป็นตัวกำหนด เช่นการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจน การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ แสง ความเป็นกรดด่าง และสารอาหารอื่นๆ (สุมาลี, 2539) จุลินทรีย์ที่เป็นปรสิต ได้แก่ *Erwinia urediniolytica* เข้าทำลาย pedicel ของสปอร์เชื้อราสนิมหรือเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม หรือจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา เอนไซม์หลักที่สำคัญ คือ chitinase และ β-1,3 glucanase (Tweddell *et al.*, 1992)

4. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) เป็นกลไกที่น่าศึกษา ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราหรือแบคทีเรีย โดยเฉพาะพวกที่เคยเป็นเชื้อโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคแล้ว สามารถชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น การเกิดกลายพันธุ์ในยีนเดียวของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพืชพวกแตง จะไม่ทำให้เกิดโรคแต่จะเจริญอยู่ในพืช ช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิมได้หรือในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรงสามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine ปลดปล่อยออกมาที่บริเวณรากทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้ และ *Candida famata* F35 ที่แยกมาจากใบมะเดื่อ กระตุ้นให้ผลส้มที่มีแผลสร้างสาร phytoalexin ต้านทานต่อการทำลายของเชื้อรา *P. digitatum* ได้ เป็นต้น หรือในกรณีของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Pichia guilliermondii* กระตุ้นการสร้าง ethylene ซึ่งเป็นฮอร์โมนในองุ่นที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (Wisniewski *et al.*, 1991) และ Rodov และคณะ (1994) พบว่าเมื่อใส่เชื้อยีสต์บนผลส้มมีการสะสมของ phytoalexins (scoparon and scopoletin) ในผลส้ม

1.7 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีเซลล์เป็นรูปท่อนตรง แกรมบวก มีขนาดของเซลล์ต่างๆ กัน 0.5 x 1.2 - 2.5 x 10 ไมโครเมตร สร้างเอนโดสปอร์ซึ่งมีรูปร่างแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาแบบรอบตัว พบได้ทั่วไปตามพื้นดินต้นไม้ส่วนใบ ลำต้น และบริเวณราก ย่อยสลายสารอินทรีย์ (organic polymers)ในดิน (Emmert and Handelsman, 1999; Bais *et al.*, 2004) เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม mesophile เจริญได้ดีในอุณหภูมิปกติ และ pH เป็นกลาง เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีมักมีรูปร่างกลม ผิวด้านหน้าทึบแสง มีสีครีมถึงสีน้ำตาล การเลี้ยงในอาหารเหลวจะทำให้อาหารมีสีคล้ำขึ้น สามารถเก็บไว้ได้นานในรูปเอนโดสปอร์ทนทานต่อความแห้งแล้ง ความร้อน รังสี UV และตัวทำละลายอินทรีย์ (Obagwu and Korsten , 2003) เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ (Boer and Diderichsen, 1991; http://www.epa.gov) พบได้ในอาหารหมักดองหลายชนิด ซึ่ง *B. subtilis* ได้ถูกพิจารณาแล้วว่ามีความปลอดภัยในการใช้ (Westers *et al.*, 2004) นอกจากนี้ *B. subtilis* แก่งแย่งอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดแคลน สามารถควบคุมโรคพืชได้รวมถึงการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวและยังใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ยับยั้งเชื้อ *Monilinia fructicola* ในเชอรี่ (Utkhede and Scholberg, 1983) ในท้อ (Pusey *et al.*, 1988) เชื้อรา *P. digitatum*, *A. citri*, *Geotrichum candidum*, *P. italicum* ในส้ม (Singh and Deverall, 1984) การจัดจำแนกและบ่งชี้ *Bacillus* spp. อาศัยลักษณะทางจุลชีววิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี *Bacillus* spp.มีลักษณะที่ดีสามารถนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เนื่องจาก

1. ผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถใช้ควบคุมเชื้อก่อโรคที่เป็นทั้งเชื้อราและแบคทีเรียได้หลายชนิด (Helisto *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2006)

2. สร้างสปอร์ได้ทำให้ง่ายต่อการทำสูตรผลิตภัณฑ์และสามารถอยู่รอดได้มากกว่าเมื่อเทียบกับ vegetative cell

3. สารที่ผลิตโดย *Bacillus* spp. เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในบริเวณรากพืช และยังสามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคได้ พบได้ทั่วไปในธรรมชาติในดิน ตามผิวพืชที่มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตสูง (สุปรียาและคณะ, 2546)

4. ใช้ผนังเซลล์เชื้อราที่ประกอบด้วยไคตินและเบต้ากลูเคนเป็นแหล่งอาหารได้ (Collins *et al.*, 2003) *Bacillus* spp. ถูกนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด เช่น โรคใบจุดในถั่วลิสง โรคใบจุดในมันแกว โรคราสีเทาในแอปเปิ้ลหลังการเก็บเกี่ยว โรคราสีเทาในสตรอเบอร์รี่ และพบว่าเอนโดสปอร์ของ *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum acutatum* ได้ดีกว่า vegetative cell (Collins *et al.*, 2003) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่สำคัญและมีการศึกษามาก คือ *B. subtilis* ส่วนสปีชีส์อื่นๆที่มีการศึกษา ได้แก่ *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. pumilus* และ *B. polymyxa* เป็นต้น (Shoda, 2000)

1.7.1.สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.

สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแบคทีเรียจำนวน 360 ชนิด (reviewed in Stein, 2005) จากรายงานของ Katz และ Demain ในปีค.ศ. 1977 พบว่า *Bacillus* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ทั้งหมด 167 ชนิด และเป็นเปปไทด์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* 68 ชนิด (Katz and Demain, 1977; Lee *et al.*, 1985) และ *B. brevis* 23 ชนิด สารเหล่านี้เป็นสารเมทาโบไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต แต่เกิดประโยชน์ต่อเซลล์ที่ผลิต ส่วนใหญ่สร้างในช่วง late log phase จนถึงช่วง stationary phase (Nakano *et al.*,1988) อันเป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีการเจริญคงที่ สารปฏิชีวนะที่ถูกผลิตขึ้นในช่วงนี้ยับยั้งการสร้างสารโมเลกุลใหญ่บางชนิดในเซลล์ได้ ช่วยรักษาพลังงานส่วนหนึ่งไว้ นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดลงไปได้ จึงช่วยยืดชีวิตของจุลินทรีย์ที่ผลิตอยู่ให้นานขึ้น ส่วนใหญ่ที่สร้างเป็นสารปฏิชีวนะเปปไทด์ (peptide antibiotic) มักมีขนาดเล็กกว่าโปรตีน และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 270-4,500 ดาลตัน ซึ่งมีโครงสร้างที่แข็งทนทานต่อการย่อย (hydrolysis) โดย peptidases และ proteases ไม่ละลายน้ำและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย โครงสร้างเป็นวงแหวน ที่ประกอบไปด้วย D-amino acid ที่ประกอบขึ้นด้วยพันธะ disulphides และ/หรือ C-S (thioether) จึงทำให้ทนต่อการ oxidation จากรายงานของ Shoda ในปี 2000 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* ในอาหารเหลว คือที่ 30 °ซ และที่ 25 °ซ ในอาหารแข็ง

Surfactin ประกอบด้วยอะมิโน 7 ตัว อะมิโนตัวที่ 7 อาจมีการยึดจับด้วยหมู่คาร์บอกซิล และไฮดรอกซิล ของกรดไขมันที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดแรงตึงผิว emulsifying, antifoaming ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ, ไวรัส และ mycoplama และ มีคุณสมบัติอื่นๆ เช่น ยับยั้งการจับกลุ่มของ fibrin (Arima et al., 1968) และ cyclic AMP phosphodiesterase (Hodona and Suzuki , 1983)

Iturins มีลักษณะโครงสร้างเป็น amphiphilic peptide ring ซึ่งประกอบด้วยอะมิโน 7 ตัว (Gong *et al.*, 2006) สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ iturin bacillomycin mixirin และ mycosubtilin ออกฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์เป็นส่วนใหญ่ โดยเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ sterol บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อก่อโรค ทำให้ช่องทางขนส่งไอออนขยายใหญ่ขึ้น ทำให้ potassium ion รั่วซึมออกจากเยื่อหุ้มเซลล์อย่างรวดเร็ว ส่งผลต่อการงอกของสปอร์ หรือ การขยายตัวของ mycelia ของเชื้อก่อโรค พบว่ามีการผลิต itulin A ใน *B. subtilis* ทุกสายพันธุ์ (Ahimou *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังมี bacillomycin D, F และ L Ohno และคณะ (1995) พบว่า *B. subtilis* RB14 มีการผลิต itulin A และ surfactinพร้อมกัน โดย surfactin เพียงอย่างเดียวไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ แต่ช่วยส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา ทำให้ itulin A สามารถเข้าทำลายเชื้อราก่อโรคได้ นอกจากนี้ iturin A และ surfactin สามารถคงตัวอยู่ได้นานมากกว่า 1 เดือน (Shoda, 2000)

Fengycin (plipastatin) ประกอบด้วย β-hydroxy fatty acid ต่อกับ N-terminal ของ 10 amino acidซึ่งจะมี 4 D-amino acid และ amino acid L-ornithine เล็กน้อย ปลาย C ของ peptide moiety เชื่อมกับ ไทโรซีนที่ตำแหน่งที่ 3 มีผลเจาะจงในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา

Bacillibactin ประกอบด้วย dihydroxybutyrate (DHB), glycine และ threonine 3 กลุ่มประกอบกันเป็นวงแหวนขนาดใหญ่ ทำหน้าที่เป็น siderophore โดยใช้ OH^- ของ DHB จับ ferric iron

1.7.2. กลุ่ม extracellular hydrolytic enzymes ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.

Bacillus spp. นอกจากการผลิตสารปฏิชีวนะแล้ว ยังมีการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายได้หลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่าง (alkaline protease) และเสถียรที่อุณหภูมิสูง (Priest, 1977) เช่น ไคตินเนส ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 46 และ 35 kDa ไคโตซานเนส มีน้ำหนักโมเลกุล 27 kDa lipase ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 62 kDa ลามินาลิเนส และ โปรติเอส เอนไซม์เหล่านี้มีบทบาทในการย่อยสลายผนังเซลล์ของรา (Helisto *et al.*, 2001) ซึ่งประกอบด้วยไคติน และบีตา-1,3-กลูเคน จากการศึกษาคุณสมบัติของบีตา-1,3-กลูคาเนส ที่ผลิตโดย *B. subtilis* NSRS89-24 ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำการผลิตโดยเพิ่มไคตินในอาหาร พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 95.5 kDa ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ 64.6 และ 32.4 kDa มีช่วง pH เหมาะสมในการทำงานที่ 6.5-9.5 และสามารถทำงานได้ดีที่แม้อุณหภูมิสูง 50 °ซ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani* และ *Pyricularic grisea* ได้ดี (Leelasuphakul *et al.*, 2006) ซึ่งบีตา-1,3-กลูคาเนส จากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีขนาดที่แตกต่างกันออกไป เช่น Aono และคณะ (1995) ศึกษาบีตา-1,3-กลูคาเนส จาก *B. circulans* IAM1165 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. oryzae* พบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 91 kDa (Yamamoto *et al.*, 1998) และ ได้ศึกษา *B. clausii* NM-1 ผลิตบีตา-1,3-กลูคาเนส ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 71 kDa (Miyanishi *et al.*, 2003) Helisto และคณะ (2001) พบว่าการเลี้ยง *Bacillus* sp. X-b ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการชักนำการสร้างเอนไซม์การเติมไคติน Chantawannakul และคณะ (2002) พบว่า มีการผลิต proteases มากที่สุดเมื่อ *B. subtilis* อยู่ในช่วงปลายการเจริญที่จะเข้าสู่การเข้าสปอร์

1.7.3. กลุ่มสารระเหย (Volatile Organic Compounds; VOCs) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.

แบคทีเรียและเชื้อราจากดินหลายชนิดสามารถผลิตสารระเหยประเภทไฮโดรคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น ethylene, ethane, propane, propene , isoamyl alcohol และ isoprene (2-methyl-1,3-butadiene) โดยเฉพาะ isoprene เป็นสารระเหยที่มีการผลิตทั่วไปจากสิ่งมีชีวิต *Bacillus* spp. สามารถสร้างสารระเหย isoprene ได้จำนวนมากที่สุด มีออกฤทธิ์ต้าน Cyanobacteria และเชื้อราก่อโรคพืช โดย *B. subtilis* สามารถผลิต isoprene ได้มากถึง 100 เท่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียกลุ่มอื่น (Ladygina *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมี *B. amyloliquefaciens* 10A1, *B. megaterium* 7A2 และ *B. polymyxa* 25A1 ผลิต isoprene ได้มากใกล้เคียงกับ *B. subtilis* (Shirk *et al.*, 2002) Fiddaman และ Rossall (1993) และ (1994) พบว่า *B. subtilis* ผลิตสารระเหยที่สามารถควบคุมจุลินทรีย์ในดินได้ เช่น *R solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium solani*, *F. culmorum* และ *A. brassicicola* เป็นต้น โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแตกต่างกัน สารระเหยนี้จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามปริมาณ complex carbohydrate เช่น D-glucose และ peptones ในอาหาร เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย พบว่า สารระเหยที่ผลิตได้ขึ้นกับปริมาณไนเตรตในอาหาร โดยปริมาณไนเตรตต้องมีความเข้มข้นตั้งแต่ 10 mM ขึ้นไป (Knox *et al.*, 2000) Chaurasia และคณะ (2005) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งระหว่างสารระเหย และสารประกอบที่แพร่กระจายได้ที่ผลิตโดย *B. subtilis* จากดิน พบว่าสารระเหยมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราโรคหลายชนิดได้ดีกว่าสารปฏิชีวนะที่แพร่กระจายได้ โดยสารสองชนิดสามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างเชื้อราเหมือนกัน โดยเส้นใยเชื้อราจะถูกทำลาย โคนิเดียบวมและมีผนังเซลล์หนา ที่อาจเกิดจากการสะสมของสารระเหยภายในเซลล์ของสปอร์ และสุชล (2539) ที่ศึกษาผลของสารระเหยต่อเส้นใยของเชื้อ *P. grisea*, *R. oryzae* และ *R. solani* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ แต่เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารระเหยจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 เกี่ยวข้องกับการขัดขวางขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการเมทาโบลิสมภายในเซลล์เชื้อรา ทำให้เซลล์หยุดเจริญเติบโตเพียงชั่วคราว แต่เมื่อทดสอบผลของสารระเหยต่อการงอกของสปอร์ *R. oryzae* พบว่าการงอกสปอร์ของเชื้อราถูกยับยั้ง และเกิดการบวมของสปอร์ซึ่งอาจเกิดจากการสะสมของสารระเหยภายในสปอร์ ทำให้ไม่สามารถงอกได้ตามปกติ *B. cereus* ผลิตสารระเหยยับยั้ง *Trichoderma viride* และ *Gelasinospora cerealis* ได้ (Moore-Landecker and Stotzky, 1972)

วัตถุประสงค์

(1) แยกเชื้อราเขียวสาเหตุโรคเน่าที่พบในส้มที่เกิดระหว่างการเก็บเกี่ยว คัดเลือก และบรรจุ

(2) คัดเลือกสายพันธุ์ที่เป็น antagonist *Bacillus spp.* ต่อราเขียว

(3) ศึกษาการยับยั้งเชื้อราของ *Bacillus spp.*ที่ได้โดยวิธี Dual culture techniques

(4) สกัดสารออกฤทธิ์และทำบริสุทธิ์โดยวิธีทางเคมี

(5) ศึกษาการออกฤทธิ์ต้านราของสารสกัดที่แยกได้จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์