4. วิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

การใช้จุลินทรีย์เพื่อควบคุมการเกิดโรคเป็นทางเลือกหนึ่งทดแทนการใช้สารเคมีกันอย่างมาก สำหรับควบคุมโรคในส้มที่ศึกษากันอย่างแพร่หลายในยีสต์ และแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Janisiewicz and Korsten, 2002) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เหล่านี้มีกลไกที่เกี่ยวข้องในการควบคุมเชื้ออื่น โดยการผลิตสารปฏิชีวนะ การแข่งขันในการครอบครองพื้นที่และอาหาร ผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสลายผนังเซลล์ของเชื้ออื่น (Wisniewski *et al.*, 1991; El-Ghaouth *et al.*, 1998) และเหนี่ยวนำให้พืชสามารถต้านทานการเกิดโรคได้ (Arras, 1996) การพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่พบอยู่ภายในประเทศมาใช้ให้เป็นประโยชน์จะเป็นผลดีอย่างยิ่งต่อประเทศไทย ทั้งในด้านการพึ่งพาตนเอง ลดการนำเข้า และป้องกันการนำเข้าสายพันธุ์จุลินทรีย์จากต่างประเทศ และควรต้องระมัดระวังเป็นอย่างยิ่งเมื่อมีการปล่อยจุลินทรีย์ลงสู่สภาพระบบนิเวศน์ของประเทศ ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนในเรื่องการผลิตสารออกฤทธิ์ที่ใช้ในการควบคุมการเกิดโรคพืชของแบคทีเรียปฏิปักษ์

1. การแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดิน

จากผลการเก็บตัวอย่างดินที่เพาะปลูกไม้ผลซึ่งเป็นบริเวณที่มีปริมาณจุลินทรีย์มาก เมื่อแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบและแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้ง่ายจากธรรมชาติ วิธีที่ง่ายสามารถคัดแยก *Bacillus* spp. ออกจากแบคทีเรียอื่นๆที่ปนมาด้วยเอนโดสปอร์ *Bacillus* sp. sunhua สามารถแยกได้จากดิน (Han *et al.*, 2005 สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptomyces scabies* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากดินแล้ว ยังมีรายงานว่าสามารถแยกได้จากส่วนอื่นๆของพืช เช่น รากของต้นชา (Pandey and Palni, 1997) ต้นบีท (Lilley *et al.*, 1996) ต้นข้าวสาลี (Germida *et al.*, 1998) และเนื้อเยื่อท่อลำเลียงของฝ้าย (Reva *et al.*, 2002)

2. ปฏิกิริยาปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต่อรา *P. digitatum* บนจานอาหาร

จากฤทธิ์การต้านราของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากดินต่อเชื้อรา *P. digitatum* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า แบคทีเรียสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีในช่วง 61-83% ถึง 23 สายพันธุ์ โดยการเกิดบริเวณยับยั้งขึ้นระหว่างเชื้อ แสดงว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถปล่อยสารที่มีฤทธิ์ต้านราบางอย่างออกมาที่สามารถละลายน้ำและแพร่ซึมเข้าไปในวุ้นอาหารได้ สังเกตได้จากการมีบริเวณยับยั้งที่กว้าง ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการผลิตสารเมทาโบไลท์ขั้นที่สอง กลุ่มสารปฏิชีวนะ เช่น subtilin, bacitracin, bacillin and bacillomycin เป็นต้น (Stein, 2005) หรือเอนไซม์ เช่น ไคตินเนส บีตา-1,3-กลูคาเนส เป็นต้น (Helisto *et al.*, 2001; Leelasuphakul *et al.*, 2005) หรือสารระเหยซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Fiddaman and Rossall , 1994; Fernando *et al., 2005*) เมื่อสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราแล้ว *Bacillus* spp. ก็สามารถใช้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ แสดงให้เห็นถึงกระบวนการสร้างสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิซึ่งเป็นกลไกหลักอย่างหนึ่งของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการต้านทานเชื้อรา นอกจากนี้ในกรณีที่แบคทีเรียเจริญได้รวดเร็วหรือมีการเคลื่อนที่ได้ก็จะพบการยับยั้งชนิดที่เชื้อราประชิดกับแนวโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญล้ำเข้าไปหาเชื้อรา โดยที่เชื้อราไม่เจริญข้ามผ่านโคโลนีแบคทีเรียไปนั้นอาจเนื่องมาจากการแข่งขันในด้าน

การครอบครองพื้นที่ และอาหารระหว่างเชื้อทั้งสอง โดยไม่อาศัยผลิตสารเมทาโบไลท์ทุติยภูมิก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ *Bacillus* spp. หลายสายพันธุ์มีที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* และเชื้อราอื่นๆเช่น *A. citri*, *G. candidum*, *P. italicum* (Singh และ Deverall, 1984 ; Obagwu and Korsten, 2002) ซึ่งเชื้อราเหล่านี้ก่อให้เกิดโรคเน่าเสียในผลส้ม อย่างเช่นจากการศึกษาของ สุปรียา และคณะ (2546) แยก *Bacillus* spp. จากดิน เมล็ดข้าว และเปลือกผลไม้ พบว่า *Bacillus* spp. สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ถึง 5 ชนิด คือ *C. gloeosporioides*, *Didymella bryoniae*, *F. oxysporum* f. sp. lycopersici, *Sclerotium rolfsii* และ *R. solanacearum* Gong และคณะ (2006) พบว่า *B. subtilis* PY-1 ที่แยกได้จากท่อลำเลียงของฝ้ายสามารถยับยั้งเชื้อรา *Exserohilum turcicum*, *F. oxysporum* และ *P. digitatum* ได้ดี แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถควบคุมเชื้อราก่อโรคในพืชได้หลากหลายชนิด และเป็นจุลินทรีย์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ จึงเหมาะสมที่จะนำไปศึกษากลไกการยับยั้งก่อนนำไปใช้ต่อไป

3. กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

3.1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

สุชล ในปี 2539 พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* บนอาหาร PDB สามารถส่งเสริมหรือชักนำให้ผลิตสารปฏิชีวนะได้มากเมื่อเทียบกับอาหาร CDB และ NB เนื่องจากในอาหาร PDB นั้นมีแหล่งกลูโคสถึงร้อยละ 2 ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่ดีในการผลิตสารปฏิชีวนะออกมา และแบคทีเรียผลิตสารปฏิชีวนะได้มากในวันที่ 3 ต่อจากนั้นปริมาณเริ่มคงที่เช่นเดียวกับ Gong และคณะ ในปีค.ศ.2006 ซึ่งเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* PY-1 ในอาหารเหลวพบว่าที่ 72 h น้ำเลี้ยงเชื้อมีประสิทธิภาพการยับยั้ง *F. oxysporum* ได้สูงสุด แต่จากการศึกษาของวาสนา (2542) พบว่า *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารสูตร Mckeen มีระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าว *P. oryzae* และ *R. solani* คือ 48 ชั่วโมง ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงที่แบคทีเรียอยู่ในช่วงที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว ถ้ามีสภาวะอาหารที่มีความเหมาะสม (Haavik, 1973) การศึกษาคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของสารที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค การทดลองครั้งนี้ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ในอาหาร PDB อายุ 3 วัน เมื่อนึ่งด้วยความดันไอที่ 121 °ซ นาน 10 นาที ยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* ได้ดีโดยมีค่ายับยั้งในช่วง 84-100% ถึง 33 สายพันธุ์ ถึงแม้ทำการเจือจางน้ำเลี้ยงเชื้อถึง 32 เท่า แสดงถึงสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. มีปริมาณสูง มีคุณสมบัติที่ค่อนข้างเสถียรและทนต่อความร้อนได้ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Van der Weid และคณะ (2003) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *Paenibacillus peoriae* สายพันธุ์ NRRLBD-62 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *Micrococcus* spp. และ *A. tumefaciens* มีความเสถียรหลังจากนึ่งด้วยความดันไอ 121 °ซ นาน 10 นาที และทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ เอนไซม์ และช่วง pH ที่กว้าง และสารยับยั้งที่ผลิตขึ้นโดย *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่คงทนต่อความร้อนถึง 121 °ซ นานถึง 15 นาที (Sandrin *et al.*, 1990; Gong *et al.*, 2005) น้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. sunha สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptomyces scabies* ได้แต่ในบางรายงานพบว่าเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปผ่านความร้อนถึง 121 °ซ 15 นาทีแล้วไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. scabies* (Han *et al.*, 2005) นอกจากอุณหภูมิที่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อแล้ว pH ยังมีผลต่อการยับยั้งโดย pH ในช่วง 5-13 น้ำเลี้ยงเชื้อสามารถแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งได้ดี และดีที่สุดเมื่อ

pH เป็นกลาง (Han *et al.*, 2005, Gong *et al.*, 2006) ระยะการสร้างสารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่สารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* ถูกสร้างในระยะ stationary phase ซึ่งเป็นช่วงเริ่มเข้าสู่การสร้างสปอร์ และเป็นสภาวะที่เซลล์เริ่มขาดสารอาหารในการดำรงชีวิตจึงมีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น แต่ยังมีสารปฏิชีวนะบางชนิดที่สร้างในช่วง exponential phase ซึ่งตรงกับผลทดลองครั้งนี้ พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากดินนั้น มี pH ของน้ำเลี้ยงเชื้ออายุ 3 วันอยู่ในช่วง 4-6 ซึ่งยังคงแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งต่อเชื้อรา *P. digitatum* ได้ดี

3.2. การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* โดยสารระเหยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

ถึงแม้ว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้สร้างสารระเหยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ในระดับไม่สูงเท่ากับน้ำเลี้ยงเชื้อ แต่ก็สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* ที่จะเป็นหน่วยแพร่พันธุ์ต่อเนื่องซึ่งเชื้อราจะสร้างสปอร์เมื่อมีอายุประมาณ 3 วันบนจานอาหาร PDA ซึ่งระหว่างนั้นเชื้อราได้มีการสะสมสารระเหยไว้ภายใน และเกิดการขัดขวางการเมตาบอลิสมทำให้เกิดการหยุดการเจริญเติบโต (McKeen *et al.*, 1986) แสดงให้เห็นว่าสารระเหยมีคุณสมบัติสามารถละลายน้ำและแทรกซึมเข้าสู่เชื้อราก่อโรคได้และไม่จับกับ solid matrices (Mackie and Wheatley, 1999) สารระเหยที่แบคทีเรียผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ได้ชั่วคราวเท่านั้น ความสามารถในการผลิตสารระเหยนั้นขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม เช่น อาหารและอุณหภูมิซึ่งจากการทดลองของสุชล (2539) และ Fiddaman และ Rossall (1993) ได้รายงานว่า อาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสมากช่วยเสริมให้มีอัตราการผลิตสารระเหยได้ในปริมาณที่สูง โดยน้ำตาลกลูโคสไปมีบทบาทต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ คือปริมาณน้ำตาลกลูโคส 2% ในอาหาร PDA ช่วยเร่งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* เร็วขึ้น (Ferreira *et al.*, 1991) และการนำธาตุ C H O ที่ได้จากย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสใช้สร้างสารระเหยได้ไม่ยุ่งยาก Fiddaman และ Rossall (1994) พบว่าสารระเหยที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *F. solani, F. culmorum, R. solani, P. ultimum, B. cinerea* และ *A. brassicicola* เป็นต้น และการยับยั้งของเชื้อไอโซเลตต่างๆมีประสิทธิภาพแตกต่างกันเมื่อเทียบระหว่างการยับยั้งโดยน้ำเลี้ยงเชื้อและสารระเหยซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Montealegre และคณะ (2003) ซึ่งแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จากรากต้นมะเขือเทศ เพื่อยับยั้งเชื้อรา *R. solani* พบว่าการยับยั้งการเจริญโดยสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อและสารระเหยที่สร้างจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. มีความแตกต่างกัน นอกจาก *Bacillus* spp. แล้ว Bruce และคณะ (2003) พบว่าแบคทีเรีย *Serratia* spp. (B 675, B2675) หรือยีสต์ *Williopsis mrakii* (Y500), *Saccharomyces cerevisiae* (Y1001) และ *Debaryomyces* spp. (Y1036) สามารถผลิตสารระเหยที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Ophiostoma piceae, O. piliferum, B. theobromae, S. pithyophila* และ *A. pulluans* ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหาร tryptone soya agar (TSA)

Chuankun และคณะ (2004) ได้ศึกษาถึงสารระเหยจากดินซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์โดยเฉพาะ *Pseudomonas* spp. พบว่าประกอบด้วย trimethylamine, 3-methyl-2-pentanone, dimethyl disulfide, methyl pyrazine, *N,N*-dimethyloctylamine, nondecane and benzadehyde สารเหล่านี้สามารถยับยั้งเชื้อ *Pochnia chlamydosporus* ZK7, *Paecilomyces lilacinus* IPC และ *Clonostachys roseai* GR87 ได้ดี นอกจาก *B.*

subtilis ที่มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพการยับยั้งโดยสารระเหยแล้วยังมี *B. cereus* ที่ผลิตสารระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. viride*และ *Gelasinospora cerealis* ได้

4. การจำแนกสปีชีย์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. โดยการตรวจด้วยวิธีจุลชีววิทยาและชีวเคมี

B. subtilis, B. pumilus และ *B. megaterium* เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินมีความปลอดภัยไม่ก่อให้เกิดโรคในคน มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายและมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ดี และ (Munimbazi and Bullerman, 1998; Zheng and Sinclair, 2000; Shoda, 2000) จากการศึกษาของ Fall และคณะ (2004) ได้จัดจำแนก *B. subtilis* โดยอาศัย phenotype test คือ Gram-stain, aerobic spore formation, nitrate reduction, gelatin hydrolysis และ citrate utilization ร่วมกับ ใช้เทคนิค PCR-based 16S rDNA ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง (Fall *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Souto *et al.* 2004) การทดสอบในครั้งนี้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 7.146 มีความใกล้เคียง *B. anthracis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบว่าก่อให้เกิดโรคอันตรายในมนุษย์ได้ ซึ่งนอกจาก *B. anthracis* แล้วยังมี *B. cereus* ที่ก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์ได้ จึงไม่ควรนำมาใช้เพื่อการควบคุมการเกิดโรคในพืช

5. สารปฏิชีวนะจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

การสกัดสารปฏิชีวนะด้วยกรดไฮโดรคลอริก จนน้ำเลี้ยงเชื้อมี pH เป็น 2.0 จะเห็นตะกอนของสาร เมื่อนำมาสกัดด้วยเอทธานอลเพื่อแยกสารปฏิชีวนะซึ่งส่วนใหญ่เป็น amphiphilic peptide ring ที่ประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว คือ วงแหวนเปปไทด์ ส่วนที่ไม่มีขั้วคือสายไฮโดรคาร์บอนทำหน้าที่ในการเพิ่มหรือลดความเป็น hydrophobicity บริเวณผิวของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับการหันหมู่ในโครงสร้างโมเลกุล (Ahimou *et al.*, 2000) Gong และคณะ (2006) ได้จำแนกสารปฏิชีวนะจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* PY-1 โดย RP-HPLC พบว่าประกอบด้วยสาร 5 กลุ่มของ iturin มีโครงสร้างเป็นวงแหวนทำหน้าเปลี่ยนแปลงการยอมให้สารและตำแหน่งของไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลยับยั้งการเจริญของสายราและการสร้างสปอร์

สปอร์ราเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดโรคในพืช โดยทั่วไปแล้วสปอร์จะปลิวไปตกบนพืชเมื่อมีความชื้นเหมาะสม สปอร์จะงอก germ tube แทงทะลุผิวพืช เมื่อสารใดยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ก็มีศักยภาพที่จะยับยั้งหรือชะลอการเกิดโรคได้ การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกของสปอร์ของรา *P. digitatum* ในสไลด์หลุม สปอร์สามารถงอกได้ดีในอาหารวุ้น 1.5% ที่มีน้ำกลั่นและเอทธานอล 80% โดยสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของเชื้อราโดยทำให้เกิดการบวมของสปอร์รา ซึ่งน่าจะเกิดจากสารปฏิชีวนะกลุ่ม iturins ซึ่งเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ sterol บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อก่อโรค ทำให้ช่องทางขนส่งไอออนขยายใหญ่ขึ้น ทำให้ potassium ion รั่วซึมออกจากเยื่อหุ้มเซลล์อย่างรวดเร็ว ส่งผลต่อการงอกของสปอร์ หรือ การขยายตัวของเส้นใยเชื้อราก่อโรค โดยพบว่ามีการผลิตใน *B. subtilis* ทุกสายพันธุ์ (Ahimou *et al.*, 2000) และเมื่อเปรียบเทียบค่า EC_{50}ของสารสกัดหยาบ *B. subtilis* 7.155 ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *P. digitatum* ก่อโรคใกล้เคียงกันคือ 77 และ 82 µg/ml แสดงถึงสารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพดีสามารถยับยั้งเส้นใยและสปอร์ราได้ใกล้เคียงกัน เนื่องจากสปอร์รามีผนังหนาและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

6. สารปฏิชีวนะในสารสกัดหยาบของ *B. subtilis* แยกด้วย TLC และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของรา *P. digitatum*

การแยกสารสกัดหยาบของ *B. subtilis* สายพันธุ์ ABS-S14 และ7.155 ด้วย PTLC ด้วยสารทำละลายเคลื่อนที่ $CHCl_3$:MeOH:H_2O ในอัตราส่วน 65:25:4 (v/v/v) ซึ่งเป็นระบบตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ (non polar) ในปริมาณสูง คือ คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) ทำให้สารที่มีขั้วต่ำเคลื่อนที่ได้ดีกว่าสารที่มีขั้วสูง เมื่อฉีดพ่นด้วยน้ำ หรือส่องดูด้วย UV ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร แถบของสารแยกออกเป็นกลุ่มๆ และส่วนใหญ่อยู่ในระยะทางที่ใกล้จุดเริ่มต้น โดยเฉพาะสารประเภทที่ละลายได้ดีในน้ำ และประกอบด้วย aromatic hydrocarbon ที่ซ้อนกันอยู่ดังเช่นแถบที่ 3, 4, 5 และ 9 มี R_f เป็น 0.14, 0.19, 0.28 และ 4.90 ตามลำดับที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของรา *P. digitatum* แสดงถึงสารมีคุณสมบัติเป็น hydrophilic หรือ lipophilic และมี conjugated double bond สามารถดูดซับพลังงานจาก UV ได้ เช่น กลุ่ม hetero atom-substituted benzene compounds, aryl ketones และ aryl aldehydes ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cho และคณะ (2003) พบว่าสารปฏิชีวนะที่ *B. subtilis* KS03 ผลิตในการยับยั้ง *Gloeosporium gloeosporioides* เมื่อแยกด้วย TLC และตรวจด้วยแสง UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร มีค่า R_f = 0.29 และมีโครงสร้างที่ศึกษาด้วย Fourier transform infrared (FTIR) และ mastrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) ระบุได้ว่าเป็นสารกลุ่ม iturin ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ วิจิตรา และคณะ ในปี 2542 โดย รศ.ดร. วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล พบว่า *B. subtilis* TRF007 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะร่วมกัน 3 ชนิด คือ surfactin (R_f = 0.43), iturin A (R_f = 0.32) และ pliplastatin A (R_f = 0.08) ที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าวได้ดี ในขณะที่ Li และคณะ(2005) ได้ศึกษาสารปฏิชีวนะสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* C2 เมื่อนำมาแยกด้วย TLC พบว่าเป็น สารปฏิชีวนะ iturin A มี R_f = 0.49 สารปฏิชีวนะ iturin ประกอบด้วย iturin A-E, bacillomycins D, F และ L และ mycosubtilin เมื่อศึกษาด้วย mastrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) พบว่า สารกลุ่มนี้เป็น cyclic peptide มีคุณสมบัติเป็น amphiphilic peptide ring ส่วนของ cyclic peptide ประกอบด้วย Asparagine, Glutamine, Serine, Proline และ Tyrocine ในอัตราส่วน 3:1:1:1:1 ซึ่งสอดคล้องกับ Yu และคณะ (2003 ที่ศึกษา iturin A ที่ผลิตจาก *B. amyloliquefacien* มีค่า R_f บนแผ่น TLC เป็น 0.46 ซึ่งการทำงานของ iturin เกิดโดยแทรกเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ แล้วรวมตัวเป็นช่องทำให้เกิดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา อย่างไรก็ตามสารชนิดนี้สามารถละลายได้ดีในน้ำ เมธานอล และเอธานอล (Maget-Dana *et al.*, 1994; Gong *et al.*,2006)

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดหยาบจาก *B. subtilis* ที่แยกโดย TLC ในแถบที่ 3, 4 และ 5 ได้สูงใกล้เคียงกัน น่าจะเป็นสารในกลุ่มเดียวกัน ค่า R_f คุณสมบัติในด้านต่างๆ เช่น การละลายน้ำ ดูดกลืนแสง UV และความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา จึงอาจสรุปได้ว่าสารในแถบดังกล่าวนี้อยู่ในกลุ่ม iturin A จากการศึกษาของ Pinchuk และคณะในปี 2002 พบว่าเมื่อแยกสารปฏิชีวนะบนแผ่น TLC โดยมี $CHCl_3$:MeOH:H_2O ในอัตราส่วน 65:25:4 (v/v) เป็นสารละลายเคลื่อนที่ ตรวจด้วย UV ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร แล้วมีการพิสูจน์ว่าเป็น Amicoumacin A สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แสดงค่า R_fเป็น 0.47 ซึ่งใกล้เคียงกับสารในแถบที่ 9 ของสารสกัดหยาบจาก *B. subtilis* 7.

155 ที่แยกบน PTLC ในระบบเดียวกัน ส่วนแถบที่ 11 มีฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์การเจริญของรา *P. digitatum* แต่ไม่สามารถตรวจพบด้วยน้ำและ UV แสดงว่าสารในแถบที่ 11 เป็นสารกลุ่ม hydrophobic ไม่มี conjugated double bond ซึ่งน่าจะเป็น surfactin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเดียวกันที่ Souto และคณะ (2004) แยกสารสกัดจากเชื้อ *Bacillus* BNM 122 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. และ *Sclerotinia* spp. ได้ ซึ่งผลจาก TLC มีค่า R_f เป็น 0.68 และ 0.51 คือ สารปฏิชีวนะ sufactin และ iturin A ตามลำดับ Vater และคณะ (2002) พบว่ามีการสร้าง surfactin มากเมื่อแบคทีเรียเจริญอยู่ในช่วง exponential phase (10-12 ชั่วโมง) ในช่วงดังกล่าวพบว่าสร้าง iturin และ fengycin ได้น้อยแต่สารทั้งสองพบมากขึ้นเมื่อแบคทีเรียเจริญอยู่ในระยะ stationary phase surfactin ประกอบด้วยกรดอะมิโน D-leucine, L-isoleucine, L-valine, L-glutamic acid และ L-aspartic acid (3:1:1:1:1) การที่มี D-Leucine และ L-valine เป็นองค์ประกอบสูงทำให้ surfactin มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic (Ahimou *et al.*, 2000)

7. ฤทธิ์ของสารสกัดและเซลล์แบคทีเรียในการควบคุมโรคราเขียวบนผลส้ม

การทดสอบฤทธิ์ของ ตัวเซลล์ น้ำเลี้ยงเชื้อ สารสกัดหยาบ และสารเคมีกำจัดเชื้อราในการควบคุมโรคราเขียวของผลส้มในห้องทดลอง ที่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อราเขียวบนผลส้ม คือที่ 24-25 °ซ และ ความชื้นสัมพัทธ์ 95 % การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* 155 ครั้งนี้ เนื่องจากมีผลการยับยั้งเชื้อ *P. digitatum* บนจานอาหารซึ่งพิสูจน์แล้วว่ามีฤทธิ์ยับยั้งสูง ซึ่งก็เป็นทางเลือกอย่างหนึ่งในแง่ที่จะนำเฉพาะสารจากแบคทีเรียมาใช้ควบคุมรา ถ้าหากสำเร็จก็จะมีความปลอดภัยกว่าใช้ตัวเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้อง (Janisiewicz and Roitman.,1988) กับการใช้สาร iturin ที่สร้างมาจาก *B. subtilis* B-3 (Gueldner *et al.*, 1988), pyrrolnitrin จาก *P. cepacia* LT-4-12 ในการควบคุมโรคหรือลดการงอกของสปอร์เชื้อ stone fruit, *M. fructicola* เชื้อ pome fruit , *P. expansum* และ *B.cinerea* ในระดับห้องทดลอง ซึ่งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ข้างต้นนี้สามารถควบคุมการเน่าบนผลไม้เมล็ดแข็งและส้มได้ นอกจากนี้ปริมาณสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการงอกของสปอร์ราในผลส้ม ก็ต้องทดสอบให้เหมาะสมกับปริมาณของสปอร์ที่จะทำให้เกิดอาการของโรคภายในเวลาที่เก็บก่อนเข้าสู่ตลาด ซึ่งจากการทดสอบขั้นต้นก็พบว่า 200 สปอร์ต่อแผล ทำให้ผลส้มเน่าภายใน 5 วัน ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ใช้ครั้งนี้จึงเป็น 1 และ 10 mg/ml (ซึ่งสูงกว่าค่า EC_{50} มาก) สำหรับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เหมาะสมคือ 10^7-10^8CFU/ml ซึ่งมากเพียงพอระดับหนึ่ง หากใช้ปริมาณมากเกินไปก็จะมีผลต่อต้นทุนการผลิต ในบางกรณีพบว่าต้องใช้เซลล์ปริมาณสูง 10^{10}CFU/ml ของ *E. eloacae* จึงยับยั้งการงอกของสปอร์ *Rhizopus stolonifer* บนผลพืช (Wisniewski and Wilson, 1989)

การทดลองได้แบ่งกลุ่มตามวิธีการพื้นฐานหรือโอกาสของการเกิดโรค คือ (1) การรักษาโรค คือ ปลูกเชื้อราก่อนใส่สาร/เซลล์นาน 1 วัน เพื่อให้สปอร์งอกและเส้นใยขยายครอบคลุมพื้นที่ก่อน (2) การป้องกัน คือ ลดการงอกของสปอร์รา โดยผสมสารหรือเซลล์ แบคทีเรียด้วยกับสปอร์รา ซึ่งเป็นการสัมผัสหรือมีปฏิกิริยาเกิดขึ้นกันโดยตรงแล้ว ขึ้นอยู่กับฝ่ายใดจะมีโอกาสรอดชีวิตและแสดงฤทธิ์ต่อไป หากยับยั้งไม่ได้สปอร์ก็สามารถเจริญเติบโตขยายเส้นใยครอบครองผลส้มได้ หรือ (3) การป้องกันโดยการให้สารหรือเซลล์แบคทีเรียเข้าไปครอบครองพื้นที่และเจริญพร้อมที่จะทำงาน เมื่อสปอร์ราผ่านเข้ามาในภายหลัง คือ 1 วันถัดมา จากผลการทดลองทั้งสามลักษณะดังกล่าวนี้พบว่าการใส่เชื้อรา *P. digitatum* ก่อน 24 ชั่วโมง

ตัวเซลล์ น้ำเลี้ยงเชื้อ สารสกัดหยาบ และสารเคมีกำจัดเชื้อราไม่สามารถควบคุมเชื้อราได้เลยนั้น เนื่องจากสารข้างต้นไม่มีฤทธิ์เพียงพอในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค และการควบคุมโดยชีววิธีมักใช้เพื่อการป้องกันมากกว่าการกำจัด ซึ่งตัวเซลล์และสารสกัดหยาบ (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถป้องกันการเกิดโรคเน่าราสีเขียว (*P. digitatum*) บนผลส้มได้ แต่น้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบ (1 mg/ml) ไม่มีฤทธิ์เพียงพอในการป้องกันการเกิดโรคได้ดีพอ เมื่อทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคเน่าราสีเขียวบนผลส้มพบว่า การใส่เชื้อราพร้อมสารสกัดหยาบ (10 mg/ml) สามารถยับยั้งการเกิดเชื้อ *P. digitatum* ได้ เนื่องจากสารสกัดหยาบได้สัมผัสกับสปอร์ของเชื้อราโดยตรงจึงทำให้มีฤทธิ์การยับยั้งดีกว่าการใส่ตัวเซลล์แบคทีเรียพร้อมเชื้อรา ซึ่งให้ผลสอดคล้องการศึกษาของ Jiang และคณะ (2001) ที่ใช้ตัวเซลล์ (10^8 CFU/ml) และสารสกัดหยาบ (250 mg/l) ในการควบคุมเชื้อ *Peronophythora litchi* ในขณะที่ Meziane และคณะ (2006) ศึกษาสารปฏิชีวนะ pyrrolnitrin จาก *Serratia plymuthica* พบว่า pyrrolnitrin ความเข้มข้น 0.1 mg/ml สามารถควบคุมการเกิดโรครา *P. digitatum* บนผลส้มได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการใส่ตัวเซลล์ *B. subtilis* และสารสกัดก่อนปลูกเชื้อรา 24 ชั่วโมงพบว่าการใส่ตัวเซลล์ *B. subtilis* ก่อน 24 ชั่วโมงสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าเมื่อใช้สารสกัดหยาบ แต่ใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่ใส่เชื้อราพร้อมสารสกัด เนื่องจากการใส่แบคทีเรียลงไปก่อนทำให้เชื้อแบคทีเรียมีโอกาสเจริญ และสามารถครอบครองพื้นที่ ดูดซึมอาหารได้ก่อนเชื้อราก่อโรค รวมทั้งเหนี่ยวนำให้ผลส้มเกิดการต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคได้ หรือแบคทีเรียเองสามารถผลิตสารออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อรา ซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวเป็นกลไกธรรมชาติในการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต เมื่อพิจารณาการใช้ตัวเซลล์และเอนโดสปอร์ *B. subtilis* เพื่อยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* พบว่าการใช้ตัวเซลล์สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่า เนื่องจากตัวเซลล์สามารถเจริญเติบโตต่อได้ทันทีเพื่อครอบครองพื้นที่และอาหาร และเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งเป็นช่วงที่ *B. subtilis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณเดียวกัน แต่ข้อดีของการใช้เอนโดสปอร์ *B. subtilis* คือ ความคงทนต่อสภาพแวดล้อมในธรรมชาติ ความร้อน และอาหารไม่เพียงพอได้ดีกว่าตัวเซลล์ การคงตัวในรูปสปอร์ยังคงคุณสมบัติจึงสามารถทำเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งสะดวกต่อการใช้งานและนำไปใช้ ดังเช่น *P. syringae* ไม่สามารถใช้ในรูปอื่นๆ จึงต้องใช้ตัวเซลล์ และเก็บในที่เย็น และมีอาหารเพียงพอจนกว่าจะใช้ (Emmert and Handelsman, 1999) ศึกษาการใช้ *B. subtilis* F_1 ที่แยกได้จากจากผิวผลส้ม Obagwu และ Korsten, (2003) พบว่าสามารถควบคุมเชื้อรา *P. digitatum* ได้แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคบนผลส้มได้ดีไม่เท่าสารกำจัดเชื้อราอิมาซาลิล (75% a.i.) แต่เมื่อใช้เชื้อ *B. subtilis* F_1 ร่วมกับโซเดียมไบคาร์บอเนต หรือน้ำอุ่น (45 °ซ) มีประสิทธิภาพในการควบคุม *P. digitatum* ได้ดีใกล้เคียงกับสารกำจัดเชื้อราอิมาซาลิล จากทดสอบบนจานอาหารแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ABS-S14 และ7.155 สามารถยับยั้งรา *P. digitatum* ได้โดยอาศัยความสามารถในครอบครองพื้นที่ ดูดซึมอาหาร และการผลิตสารออกมาภายนอกเซลล์ เช่น สารปฏิชีวนะ สารระเหย และสารออกฤทธิ์โปรตีน เมื่อเปรียบเทียบการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าราสีเขียวมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เช่น การใช้ยีสต์ *C .oleophila* สามารถควบคุมโรคโดยเหนี่ยวนำให้ผลส้มสร้างสาร PR-protein เช่น ไคติเนส กลูคาเนส เปอร์ออกซิเดส เป็นต้น และ phytoalexin โดยประสิทธิภาพในการควบคุมโรคขึ้นกับระยะห่างระหว่างการใส่เชื้อราและยีสต์ ปริมาณยีสต์ที่ใช้ และระยะเวลาการบ่มเชื้อ (Fajardo *et al.*, 1998 ; Droby *et al.*, 2002) หรือการใช้ *Guilliermondii* US-7 เพื่อ

ควบคุม *P. digitatum* ในเกรฟฟรุท ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วทำให้สามารถแย่งอาหารและครอบครองพื้นที่ได้มากกว่าเชื้อราก่อโรค มีการผลิต เบต้ากลูคาเนส เพื่อต้านเชื้อรา และสามารถชักนำให้ผลส้มมีสร้างสารกลุ่ม phytoalexin เช่น scoparone and scopoletin (Mari and Guizzardi, 1996 ซึ่งเป็นกลไกที่ยังต้องศึกษาต่อไปว่า *B. subtilis* จะมีความสามารถเหนี่ยวนำให้ผลส้มเกิดการต้านทานต่อเชื้อ *P. digitatum* หรือสร้างสารต่างๆ ขนาดที่อยู่บนผลส้ม เพื่อควบคุมโรค กฤษฎา และดนัย (2545) ได้ศึกษาการควบคุมโรคเน่าราสีเขียวและคุณภาพของผลส้มเขียวหวาน โดยวิธีการรมด้วยไอระเหยของเอทธานอล และอะซีตัลดีไฮด์ต่อพบว่า เอทธานอลที่ความเข้มข้น 0.05 % (v/v) และ อะซีตัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 0.01 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน สามารถชะลอการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. digitatum* ออกไปได้นาน 4.25 วัน และ 2.63 วัน ตามลำดับ โดยไอระเหยของสารทั้งสองมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีผิวของผลส้ม โดยทำให้ผลส้มมีสีเหลืองกว่าชุดควบคุม อย่างไรก็ตามผลที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นกับทั้งรสชาติ และกลิ่นของผลส้ม

การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวมักแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งได้ดี เนื่องจากสิ่งแวดล้อมในการเก็บรักษาผลไม้สามารถควบคุมได้เพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ แต่การควบคุมเชื้อราก่อโรคอาจใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ร่วมกับการดูแลรักษาแบบอื่นๆ เช่นการใช้ความร้อน นอกจากนี้การเก็บรักษาผลส้มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ สามารถยับยั้งการเกิดโรคเน่าราสีเขียวและสีฟ้าบนผลส้มได้ (Plaza *et al.*, 2004) จากการศึกษา Ben-Yehoshua และคณะ (1989) พบว่าการเก็บรักษาผลส้มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 90-100% สามารถเหนี่ยวนำให้ผลส้มสร้างลิกนินและสารตั้งต้นในการสร้างสารประกอบ pheolic หรือการใช้ UV-C ในการควบคุมโรคเน่าราสีเขียวบนผลส้มพบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้โดยกระตุ้นการสร้าง phytoalexins (Ben-Yehoshua, 2003) หรือ มีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนการเก็บเกี่ยว เพื่อลดจำนวนเชื้อก่อโรคและ ป้องกันการเกิดโรค (Jiang *et al.*, 2001) ข้อควรคำนึงในการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาควบคุมโรคพืชโดยเฉพาะเมื่อนำลงสู่ดินที่จะปลูกพืชนั้น ควรคำนึงถึงผลเสียที่อาจเกิดกับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น Mycorrhiza หรือ แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนให้แก่พืช