

บทที่ 1

บทนำ

เกษตรกรรมเป็นอาชีพหลักของคนไทยมาตั้งแต่โบราณกาล มาในยุคปัจจุบัน ธุรกิจด้านอุตสาหกรรมและการท่องเที่ยว เริ่มเข้ามามีบทบาทสำคัญมากขึ้น แต่ในระดับรากหญ้า การเกษตรก็ยังมีบทบาทสำคัญในชีวิตของผู้คนทั่วไป ด้วยเหตุนี้ภาครัฐจึงได้พยายามผลักดันให้ประเทศไทยก้าวไปสู่ “ประเทศแห่งครัวโลก” พืชเศรษฐกิจที่นิยมปลูกและส่งออก ได้แก่ ข้าว ถั่วเหลือง มะเขือเทศ พริก และหัวหอม เป็นต้น แต่ผลผลิตเหล่านี้มักได้รับความเสียหายทั้งด้านปริมาณ และด้านคุณภาพ จากการทำลายของโรคและแมลงศัตรูพืชอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อราจัดเป็นสาเหตุของโรคพืชมากที่สุด เนื่องจากเชื้อราจะได้อาหารจากพืชเพื่อการเจริญเติบโต เป็นการแย่งอาหารจากพืช ส่งผลให้พืชไม่ได้อาหารอย่างเต็มที่ และในเวลาเดียวกันจะขับถ่ายสารต่างๆ ออกมาทำลายพืชโดยตรง หรือมีอิทธิพลต่อกลไกที่ควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ในเซลล์พืช พร้อมกันนั้นยังสามารถแพร่ขยายการระบาดออกไปได้อย่างกว้างขวาง ประเมินค่าความเสียหายทั่วประเทศคิดเป็นปีละหลายพันล้านบาท จากปัญหาดังกล่าว การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทยจึงเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว ในสองทศวรรษที่ผ่านมา ปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพิ่มมากขึ้นกว่าสามเท่าตัว เนื่องจากสารเคมีเหล่านี้สามารถลดและกำจัดศัตรูพืชได้อย่างรวดเร็วและเห็นผลชัดเจน แต่ผลกระทบที่ตามมา ก็เพิ่มสูงขึ้นเป็นเงาตามตัวเช่นกัน (ชนวน, 2542) การใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืชเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดอันตรายโดยตรงต่อเกษตรกรผู้ใช้ นอกจากนี้ สารพิษที่ตกค้างในอาหารยังเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม รวมไปถึงสารเคมีเมื่อใช้เป็นระยะเวลาอันยาวนานอาจทำให้แมลงศัตรูพืชสร้างความต้านทานและเกิดการระบาดของศัตรูพืชได้ การลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชจึงเป็นนโยบายระดับชาติที่มุ่งเน้นเพื่อการลดความเสี่ยงของผู้บริโภค ลดมลพิษในสิ่งแวดล้อม และมีเป้าหมายในการส่งเสริมการผลิตสินค้าทางการเกษตรให้มีคุณภาพจนได้มาตรฐานสากล เพื่อการบริโภคทั้งภายในประเทศ และเพื่อการส่งออกไปต่างประเทศ (อัศนี, 2546)

แนวทางการลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชมีหลายรูปแบบ ซึ่งสามารถนำมาผสมผสานเพื่อเพิ่มทางเลือกให้เกษตรกรต่อผลผลิตที่มีประสิทธิภาพ มีความปลอดภัย และทำให้สิ่งแวดล้อมปลอดจากมลภาวะของสารเคมีทางการเกษตร จุลินทรีย์กำจัดศัตรูพืช (microbial pesticide) ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อโอบิตัว เป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะเจาะจงต่อชนิดของศัตรูพืชในการป้องกันกำจัด และมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้ ฉะนั้นการใช้จุลินทรีย์หรือผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่นำมาใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช หรือนำมาใช้ประโยชน์ในการผสมผสานกับวิธีการอื่นๆ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่นำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotics)

และปลดปล่อยมาในสิ่งแวดล้อมซึ่งมีผลต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่ปฏิบัติที่สร้างสารปฏิชีวนะ เช่น เชื้อรา *Gliocladium* spp. จะผลิตสาร gliotoxin, เชื้อรา *Trichoderma* spp. ผลิตสาร viric นอกจากนี้ *Trichoderma* spp. ยังผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง Gram positive และ Gram negative (วีรศักดิ์, 2544) การผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยตรงเป็นปัจจัยร่วมอย่างหนึ่งของการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัติสามารถเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้อย่างกว้างขวาง จากรายงานการวิจัยหลายฉบับทั้งในประเทศและต่างประเทศที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมเชื้อโรคพืชทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และในเรือนทดลองปลูก ตลอดจนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม อันเป็นตัวบ่งชี้ได้ถึงความสำเร็จและการส่งเสริมเพื่อพัฒนางานด้านนี้ในอนาคตต่อไป

แนวคิดในความพยายามศึกษาเพื่อนำกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาใช้เป็น biopesticides ในการป้องกันกำจัดโรคพืช แทนการใช้ chemical pesticides เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมี และรักษาสสมดุลของสภาพแวดล้อมไว้ให้นานที่สุด ได้แนวคิดริเริ่มมาจากการที่ได้มีการแนะนำการใช้สาร EM (Effective Micro-organisms) ซึ่งเป็นประชากรรวมของจุลินทรีย์หลากหลายชนิดมาใช้เป็นปุ๋ยธรรมชาติ ประกอบกับการรายงานว่ามีแบคทีเรียหลายสกุล สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์เป็น biopesticides ได้ดี และควรได้รับความสนใจนำมาใช้ในการผลิต biopesticides เชื้อเหล่านี้ ได้แก่แบคทีเรียใน genus *Pseudomonas* spp. และ *Bacillus* spp. โดยเฉพาะ *Pseudomonas fluorescence* สามารถสร้างสารต้าน fungal root pathogens (Weller 1988) และยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะชะงักการเจริญของโรคในปลาซึ่งมีเชื้อต้นเหตุคือ *Vibrio anguillarum* (Gram et al., 1999) สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช สาร antimicrobial metabolites เหล่านี้คือ 2,4-diacetylphloroglucinol, pyoluteorin, hydrogen cyanide, salicylic acid และ pyochelin (Schmidli-Sacherer et al., 1997) Ellis และคณะ (1999) ยังรายงานว่า *Pseudomonas fluorescens* 54/96 ที่คัดเลือกจาก rhizosphere ของต้น sugar beet สามารถสร้างสารยับยั้งโรคเชื้อรากินเมล็ดอย่างได้ผล นอกจากนั้น สารดังกล่าวยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pythium ultimum* ซึ่งถือว่าเป็นต้นเหตุของโรค damping-off disease นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* DR54 สร้างสารที่เป็นปรปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค potato ring rot, black root rot ในดินยาสูบ (Nielsen et al., 1998) เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* strain Pf1 ได้ถูกผลิตในรูปของแป้งฝุ่น เพื่อผสมคลุกเคล้ากับเมล็ดข้าว เมื่อนำไปเพาะ เชื้อแบคทีเรียจะแพร่กระจายไปสู่ราก ลำต้น และใบ ป้องกันต้นข้าวจากโรค rice blast ซึ่งมีเชื้อ *Pyricularia oryzae* เป็นต้นเหตุ (Vidhyasekaran, 1997) และยังป้องกันโรค damping-off disease ของหัว sugarbeet จากเชื้อรา *Pythium* spp. (Moenne-Loccoz, 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (cell-free culture filtrates) ของเชื้อ *Pseudomonas antimicrobica* ที่มีผลต้านโรคราสีน้ำตาลชื่อ *Botrytis cinerea* ทั้งในการทดสอบแบบ *in vitro* และ *in vivo* (Walker et al., 1996) Clarkson และ Lucas (1997) ได้รายงานว่า cell-free culture filtrate ใน nutrient broth ของ *Pseudomonas fluorescens* สามารถยับยั้งการเจริญ และการงอกของสปอร์ของเชื้อ *Pseudocercospora herpotrichoides* ซึ่งเป็นต้นเหตุของโรค eyespot disease ในดินธัญพืชข้าว นอกจากนี้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ยังถูกนำไปใช้เป็นกรณีพิเศษในด้านของ biocontrol ยัง

มีการศึกษาเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคประเภท soil-borne และ seed-borne ได้เช่นกัน (Weller 1988; O'Sullivan และ O'Gara 1992; Clark และ Lucas, 1997; Whipps 1997)

การผลิต biopesticides ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ส่วนมากจะใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นวัตถุดิบในการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันนี้พบว่าอุตสาหกรรมการผลิตสารเคมีหรือเอนไซม์ต่างก็ใช้ จุลินทรีย์เป็นฝ่ายผลิตทั้งในประเทศและต่างประเทศโดยการใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นวัตถุดิบจึงทำให้มีการส่งออกเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้กากน้ำตาล มีราคาสูง เนื่องจากไม่ใช่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานน้ำตาลอีกต่อไป ดังนั้นหากใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ จะทำให้ราคาค้นทุนของการผลิต biopesticide สูงขึ้นไปด้วย ดังนั้นจึงควรเลือกวัตถุดิบที่หาง่าย มีจำนวนมาก ราคาถูกหรือไม่ต้องซื้อ และควรมีวิธีการผลิตอย่างง่าย หรืออาจขยายขนาดการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้เช่นกัน ขยะอินทรีย์น่าจะถือได้ว่าเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจ ด้วยเหตุว่า ขยะอินทรีย์มีองค์ประกอบที่เป็นอินทรีย์สารหลากหลายชนิด เช่น malate, citrate, acetate, lactate, levurinate, glutamate และ asparaginate (Ishii et.al., 2000) จึงน่าลองนำมาใช้เป็น substrate เนื่องจากจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากร โดยเฉพาะขยะจากชุมชนเมืองยังเป็นปัญหาในการกำจัดอยู่เสมอทำให้เทศบาลต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่จะกองรวมไว้ที่พื้นดิน หรือเผา หรือฝังกลบ

ขยะจากชุมชนเมืองในส่วนที่เป็นสารอินทรีย์นั้นพบว่าประกอบด้วย โปรตีน 2-8 %, ไขมัน 5-10 %, น้ำตาลทั้งหมด 5-9 %, เซลลูโลส 30-60%, แป้ง 2-8 %, ลิกนิน 3-8 %, เส้นใยดิบ 35-40 % และยังพบว่ามีจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับขยะมากมายที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในกองขยะทั้งที่กองรวมไว้ที่พื้นดิน หรือฝังกลบ การย่อยสลายจะเร็วหรือช้าขึ้นกับตัวแปรต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก จุลินทรีย์ที่พบได้แก่ เชื้อรา แอคติโนมัยซีทีส และแบคทีเรีย ในส่วนที่เป็นแบคทีเรียได้แก่แบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Cytopaga*, *Cellovibrio*, *Chromobacter* แบคทีเรียเหล่านี้สามารถใช้ขยะเป็น substrate ได้และอาจสร้างสารหลายอย่าง สารดังกล่าวอาจนำมาใช้ในการกำจัดโรคพืช หรือสารส่งเสริมหรือเร่งการเจริญเติบโตของพืชได้ เท่าที่ทราบ ยังไม่พบว่ามีรายงานการนำขยะมาใช้ในการผลิต biopesticide หรือสารส่งเสริมหรือเร่งการเจริญของพืช

มีการรายงานน้อยมากที่จะพบว่ามีการศึกษาเพื่อนำแบคทีเรียมาผลิตสาร biopesticides. King and Parke (1993) และ Zaki และคณะ (1998) รายงานว่ามีการใช้เชื้อ *Pseudomonas cepacia* ที่ผลิตสาร biopesticides แทน chemical pesticides ในการยับยั้ง pathogenic soil fungi และพวก nematodes ที่เป็นต้นเหตุของการทำลายพืชอย่างมีประสิทธิภาพ เชื้อ *Pseudomonas cepacia* ยังสามารถย่อยสลายมลพิษในสภาพแวดล้อม เช่น สาร trichloroethylene, 2,4,5-trichlorophenoxy-acetic acid เมื่อมีลักษณะเด่นร่วมในการยับยั้ง pathogenic soil fungi และพวก nematodes ดังกล่าวมาข้างต้น จึงได้มีการแนะนำให้ปล่อยเชื้อ *Pseudomonas cepacia* ลงสู่สิ่งแวดล้อมอย่างมีประสิทธิภาพ (Anatoli et. al., 2000) อย่างไรก็ตาม ถ้าต้องใช้เชื้อแบคทีเรียในการสร้างสาร biopesticide หรือ สารเสริมการเจริญของพืช ควรต้องคำนึงถึงอันตรายของการกลายเป็น

opportunistic pathogens เอง เนื่องจากเคยมีรายงานว่า เชื้อ *Pseudomonas cepacia* มีลักษณะแสดงออกทาง non-oxidative killing โดย neutrophils (Speert et. al., 1994) และยังสามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ melanin-like pigments ส่งเสริมความทนทานต่อการถูกฆ่าจากเซลล์เม็ดเลือดขาว (Zughaier et. al., 1999) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น lipases, proteases และ haemolysin ลักษณะเหล่านี้ ล้วนแล้วแต่เป็นลักษณะของแบคทีเรียก่อโรค แต่ยังไม่พบหลักฐานการก่อโรคในมนุษย์ (Govan et. al., 1996; Govan and Vandamme, 1998)

การศึกษาค้นคว้าในที่นี้ ผู้ทำวิจัยต้องการมุ่งเน้นการคัดเลือกแบคทีเรียจากขยะอินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici รวมไปถึงการศึกษาถึงความเป็นได้ในการตรวจสอบหาสารยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคพืชทั้งในกลุ่มเชื้อรา โดยที่จะดูการปลดปล่อยสารละลายที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคพืชจากประชากรแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในกองขยะทั้งในระดับอุณหภูมิปกติ (mesophilic bacteria) เหตุผลที่ต้องการแยกเชื้อจากประชากรแบคทีเรียในขยะ เพราะว่า ในขยะมีสารอาหารหลากหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์ในรูปของสารอาหาร และที่เป็นโทษในรูปของกาสสารพิษทางเคมีที่อาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ที่นี้ถือได้ว่าเป็นที่รวมของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด Deportes และ คณะ (1998) ได้รายงานว่า มีจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งเชื้อก่อโรคและเชื้อทั่วไป เจริญอยู่ในกองขยะตลอดระยะเวลาการหมักของขยะอินทรีย์ Ishii และ คณะ (2000) ใช้เทคนิคทาง DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) และการหาลำดับเบสบน 16SrRNA gene ในการตรวจสอบประเภทของเชื้อแบคทีเรียในกองขยะ พบว่ามีทั้งเชื้อในสกุล *Lactobacillus* spp. และเชื้อในกลุ่ม thermophilic bacillus จากผลการวิเคราะห์หาประเภทของจุลินทรีย์ในขยะ ด้วยเทคนิคทาง 16SrRNA ในระยะต่าง ๆ เช่น ในระยะ S-phase (0-4 วัน) พบว่ามีเชื้อ *Leuconostoc paramesenteroides*, *Pediococcus acidilactici* และ *Staphylococcus piscifermentans* ในระยะ T-phase (4-13 วัน) พบเชื้อ *Bacillus coagulans*, *Virdibacillus proomii* และ *Gracilibacillus halotolerans* และในช่วง C-phase พบเชื้อ *Sphingobacterium multivorum*, *Alloiococcus otitis*, *Clostridium fervidus*, *Clostridium filamentosum* และ *Alcaligenes* spp. แต่ละชนิดต้องการมีชีวิตรอดอยู่ในสภาวะดังกล่าว การแข่งขันเพื่อความอยู่รอดมิให้เล็กลงไม่มากนัก นอกจากการสร้างสารปฏิชีวนะหรือสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยตัวเอง สารออกฤทธิ์เหล่านี้จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะได้ศึกษา เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช และถ้าได้ผลลัพธ์ดังที่คาดการณ์ไว้ จะได้นำมาสกัด เพื่อนำไปใช้ได้โดยปราศจากสารพิษตกค้างต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแสวงหาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)
2. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารต้านเชื้อราที่ผลิตจากแบคทีเรีย
3. ศึกษาความเสถียรของสารต้านเชื้อราที่สภาวะต่างๆ เช่น pH, การทนต่ออุณหภูมิสูง
4. ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชปลูกลงในกระถาง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เมื่อคัดแยกได้แบคทีเรียที่มีการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบเหี่ยว (tomato wilt จากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียให้ได้สารละลายออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค คาดว่าจะนำมาทำเป็นผงแห้งโดยไม่จำเป็นต้องทำให้สารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ สามารถนำไปใช้งานจริงได้เลย