# บทที่ 5
# สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างขยะเปียก ขยะแห้ง และตัวอย่างดินจากแหล่งทิ้งขยะจากจุดกำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น บ้านซำจาน อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น โดยคาดว่าจะมีแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici* (Fol) ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 151 ไอโซเลต จากการทดสอบด้วยวิธี well diffusion technique พบว่ามีเพียง 30 isolates ที่สามารถแสดงกิจกรรมต้านการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici* ในจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้ง 30 isolates มีเพียง 3 isolates ที่แสดงออกฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้สูง คือ แบคทีเรีย isolate B11, D168 และ S 32 ในจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 isolates มีเพียง isolate S32 ที่ถูกเลือกมาทำการศึกษาต่อ เชื้อแบคทีเรีย isolate S32 ที่คัดแยกได้จากแหล่งทิ้งขยะจากจุดกำจัดขยะเทศบาลขอนแก่น สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Fol ได้โดยพบว่าฤทธิ์การยับยั้งได้มาจาก culture supernatant และเชื้อแบคทีเรีย isolate S32 นี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีที่สภาวะอุณหภูมิ 35$^{o}$C มีอายุการเลี้ยงเชื้อน่น 48 ชั่วโมง ซึ่งสังเกตเห็นได้จากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition Zone จะมีขนาดความกว้างมากที่สุด หรือเท่ากับ 32 มิลลิเมตร

เนื่องจากกลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อราอาจเป็นกลไกคล้ายการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะ โดยปกติแล้วเชื้อจุลินทรีย์จะสร้างสารปฏิชีวนะก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญโดยจะเริ่มสร้างในช่วง late log phase เรื่อยไปจนถึงช่วง stationary phase แม้ในการทดลองไม่ได้มีวัดการเจริญควบคู่ไปด้วย แต่ผลการทดลองพบว่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition Zone ของเชื้อที่อายุการเลี้ยงเชื้อ 48 และ 72 ชั่วโมง มีแนวโน้มจะอยู่ในช่วงในช่วง late log phase และช่วง stationary phase ซึ่งจะแตกต่างจากที่ 24 ชั่วโมงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งแสดงว่าช่วง 48 และ 72 ชั่วโมง น่าจะเป็นช่วงใกล้เข้าสู่ stationary phase มากที่สุด จากหลายรายงานก่อนหน้านี้ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาคุณลักษณะของสารต้านเชื้อราที่เชื้อแบคทีเรียผลิตออกมา ส่วนใหญ่มักเป็นสารองค์ประกอบในกลุ่มโปรตีน จากการตกตะกอนสารละลาย crude fungicide 65% ammonium sulfate saturation และเก็บตะกอนในรูปแห้งแล้ว เมื่อนำตะกอนแห้งมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งอีกครั้ง พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งยังคงอยู่ เมื่อศึกษาความคงทนของสารต้านเชื้อราที่สภาวะอุณหภูมิระดับต่างๆ พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งของสารต้านเชื้อราดังกล่าวจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและคงทนได้ถึงระดับ

สูงสุด 70$^0$C เป็นเวลา 20 นาที และเมื่อศึกษาความคงทนสารต้านเชื้อราที่ระดับ pH ต่างๆ พบว่าสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรายังคงประสิทธิภาพที่ระดับ pH ในช่วง 5-8 จะเห็นว่า เมื่ออุณหภิสูงขึ้นหรือสภาะความเป็นกรด-ด่าง เปลี่ยนแปลงไปมากกว่านี้ ได้ส่งผลทำให้สารยับยั้งการเจริญของเชื้อราเสียสภาพทางธรรมชาติ (denature) จนไม่สามารถแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งได้อีก ดังนั้นสารต้านเชื้อราที่เชื้อแบคทีเรีย isolate S32 ผลิตออกมานี้ จึงสันนิฐานว่าคุณลักษณะเบื้องต้นของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ว่าน่าจะมีองค์ประกอบเป็นโปรตีน เพื่อเป็นการยืนยันว่าองค์ประกอบเป็นโปรตีน ในการศึกษาครั้งต่อไป ควรจะสกัดสารยับยั้งชนิดนี้ให้ได้สารละลายโปรตีนให้บริสุทธิ์ เพื่อให้มีการทดสอบการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ protease ชนิดต่าง เป็นการยืนยันการมีคุณสมบัติขององค์ประกอบที่เป็นโปรตีน และหาก ในขั้นตอนนี้จึงไม่สามารถยืนยันคุณสมบัติของสารต้านเชื้อราแน่นอน ซึ่งยังจะต้องมีขั้นตอนการทำสารต้านเชื้อราให้บริสุทธิ์เพื่อการศึกษาโครงสร้างของสารและคุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพให้แน่ชัดเสียก่อน จึงจะนำไปทดลองใช้ในแปลงเพาะปลูกได้จริง

ผลการทดลองการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค Fol โดยการทดสอบกับต้นกล้ามะเขือเทศในกระถาง เมื่อทำการ challenged ต้นกล้ามะเขือเทศด้วยเชื้อรา Fol ทางราก พบว่ากระถางที่ต้นกล้ามะเขือเทศที่ถูก challenged ด้วยเชื้อรา Fol อย่างเดียว ต้นกล้าจะเจริญช้ามาก ในบางกระถางเหี่ยวจนเห็นได้ชัด ส่วนกลุ่มต้นกล้ามะเขือเทศที่ถูก challenged ด้วยเชื้อรา Fol พร้อมกับการใช้ culture supernatant รดน้ำต้นกล้าสลับกับน้ำธรรมดา ภายหลัง 3 สัปดาห์ ต้นกล้ามะเขือเทศยังเจริญเหมือนปกติ แสดงให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรีย isolate S32 สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Fol ได้

นอกจากนี้สารต้านเชื้อราที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย isolate S32 ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Macrophomina* sp. ซึ่งก่อโรคในต้นถั่วเหลือง และเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เชื้อก่อโรคในต้นพริกได้ (ไม่ได้รายงานในผลการทดลอง) จากการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าในธรรมชาตินั้นสิ่งมีชีวิตต่างก็มีกลไกการแข่งขันเพื่อการอยู่รอด มีการสร้างสารออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่นเพื่อการเจริญเติบโตของตน และกลไกนี้เองที่สามารถประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ในการควบคุมการเกิดโรคโดยชีวะวิธี แต่ประสิทธิภาพของสารที่สิ่งมีชีวิตผลิตออกมานี้จะคงออกฤทธิ์อยู่ในธรรมชาติได้นานหรือไม่นั้น ขึ้นกับปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ pH องค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมีของสาร ดังนั้นจึงควรศึกษาคุณลักษณะทางเคมีและทางกายภาพของสาร ความเป็นพิษต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อมตลอดจนรูปแบบการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อไม่ให้เกิดผลกระทบตามมาภายหลัง อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังศึกษาอยู่ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น การจะนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง ต้องทำการศึกษาในระดับเรือนทดลองและแปลงปลูกจริงเสียก่อน การวิจัยนี้จึงเป็นขั้นตอนเริ่มต้นเพิ่มเป็นแนวทางในการศึกษาและปรับประยุกต์ได้จริงต่อไป

การศึกษาทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี และการหาค่า % similarity พบว่าเชื้อแบคทีเรีย isolate S32 เป็นแบคทีเรีย Gram บวก มีการสร้าง endospore ภายในเซลล์ การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีและการคำนวณทาง % similarity เมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีค่า % similarity เท่ากับ 91% ผลการทดลองนี้สามารถคาดได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย isolate S32 น่าจะถูกจัดให้อยู่ในสกุล (Genus) Bacillus และ specific epithet เป็น subtilis เพื่อความแน่นอนในจัดวางเชื้อแบคทีเรีย isolate S32 ในสกุล *Bacillus* มีความจำเป็นต้องศึกษาต่อทางด้านอณูพันธุศาสตร์ด้วยการหาลำดับเบสของ 16S rDNA ในลำดับต่อไป

การศึกษาวิจัยเพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในต้อนกล้ามะเขือเทศครั้งนี้ สอดคล้องในทางเดียวกันกับนักวิจัยหลายท่านด้วยกัน (Tsou และ Tsay, 1988; Pattanamahakul และ Strange, 1999; Sivapalan และ Browning, 1992; Wu, 1979; Maude และ Humpherson-Jones, 1980; Babadoost และ Gabrielson, 1979) ข้อแตกต่างของการศึกษาครั้งนี้ ถือได้ว่าเป็นครั้งแรกที่ได้คัดแยกเชื้อจากจุดทิ้งขยะ กลุ่มผู้วิจัยกลุ่มอื่นจะคัดแยกเชื้อแบคทีเรียออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคจากดินในไร่เพาะปลูกมะเขือเทศ

ปัจจุบัน เชื้อราก่อโรคพืชที่มีต้นเหตุมาจากเชื้อรา Fol (*Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici) ได้ก่อให้เกิดความเสียหายสำหรับพืชไร่มากมาย ถ้ามองดูทั้งประเทศมีพื้นที่การระบาดถึงประมาณ 1.07 ล้านไร่ คิดเป็นมูลค่าของผลผลิตที่เสียหายไม่ต่ำกว่า 300 – 500 ล้านบาทต่อปี (ชนวน, 2542) ซึ่งมาในรูปของโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อราฟิวซาเรียม (Fusarium wilt) โรคเน่าคอดินของกล้าพืช (Damping off of seedlings) (สุนทรี, 2525) ผลลัพธ์ของการมุ่งใช้สารเคมีกำจัดสัตรูพืชและปุ๋ยเคมีจำนวนมากก่อให้เกอิดสารพิษตกค้างจำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็นสารกำจัดศัตรูพืชพวกสารประกอบฟอสฟอรัส (Organophosphorus Compounds) แม้จะสลายตัวได้เร็วกว่าพวกแรก แต่ก็สามารถตกค้างอยู่ในดินได้นานไม่น้อยกว่า 3 เดือน หรือ 1 ฤดูเพาะปลูก ส่วนสารกำจัดศัตรูพืชที่มีส่วนผสมของปรอท ทองแดง ตะกั่ว และสารหนูนั้นเมื่ออยู่ในดินแล้วจะไม่สลายตัวเลย (ประยูร 2517) นอกจากนั้นยังทำให้สารกำจัดศัตรูพืชหมุนเวียนในระบบนิเวศน์ และเข้าไปสะสมในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ทางโซ่อาหาร (Food chains) เนื่องจากสารกำจัดศัตรูพืชส่วนมากจะไม่ละลายน้ำตกตะกอนและปะปนลงแหล่งน้ำต่าง สะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิตมีผลทำให้แพลงตอน (Plankton) และสัตว์น้ำขนาดเล็กซึ่งเป็นโซ่อาหารของปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ ที่เป็นอาหารของมนุษย์ตายไปเป็นจำนวนมาก (ชนวน, 2542) ดังนั้น การควบคุมศัตรูพืชด้วยชีวะวิธี ไม่ว่าจะเป็นการควบคุมแมลงศัตรูพืช หรือเชื้อราก่อโรคพืช จึงเป็นทางเลือกกลยุทธการใช้ที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมที่ยั่งยืน (Cook, 1993; Jacobsen and Backman, 1993)

รายงานการนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มาใช้ในการควบคุมโรคพืชที่มีต้นเหตุจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ได้แก่การนำเชื้อ *B .subtilis* สายพันธุ์ CH4 ใช้ควบคุมโรคเน่าของมันฝรั่ง ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* sub sp. Carotovora. (ปริญญา และคณะ, 2533) การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น *B. subtilis* มาใช้ควบคุมโรครากเน่า โคนเน่า ของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivara* อย่างได้ผล (มลจันทร์ และชัยวัฒน์, 2537) นอกจากนี้ยังมีการนำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis.* และ *Pseudomonas fluorescens* ไปใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ (อุรัจฉทา และคณะ, 2535; สุภกิจ, 2536) McKeen และคณะ (1986) ได้รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สามารถผลิตสารต้านเชื้อราที่สามารถละลายได้ใน ethanol, methanol, isopropanol และน้ำ ได้ดี มีโครงสร้างเป็นแบบ Cyclic polypeptide และยังรายงานอีกว่า ใช้สารต้านเชื้อราเพียง 1μg/ml ก็สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ นอกจากนี้ Podile และ Prakash (1996) พบว่า ammonium sulfate precipitated extracellular proteins จาก *B. subtilis* AF1 ความเข้มข้น 1 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus niger* สาเหตุของโรค crown rot ของถั่วลิสง

รายงานทางวิชาการที่มีความสอดคล้องกับการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราในการศึกษาครั้งนี้ที่บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* คือการรายงานของ Chan และคณะ (2003) ที่ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Fusarium graminearum* ซึ่งเป็นสาเหตุก่อโรค carrot head และ blight ในต้นข้าวโพด พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต D ½ ที่แยกได้จากดินแปลงเพาะปลูก สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* ชนิดต่าง ๆ ได้ถึง 8 ชนิด ทั้งที่อยู่ใน Family Ascomycetes และ Family Basidiomycetes เชื้อแบคทีเรียนี้จะผลิตสารต้านเชื้อราออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตรส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบเพื่อยับยั้งการเจริญของ macrocomidium และเส้นใยของเชื้อรา *F. graminearum* นี้ จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นเริ่มต้นของ macrocomidium โดยสารต้านที่อยู่ในส่วนใสจะเหนียวนำให้เส้นใยของราพองตัวและแตกหัก ผลการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรีย D ½ โดยการทดสอบทาง phynotypic และ 16s RNA บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* เช่นเดียวกับงานวิจัยครั้งนี้ทุกประการ ที่งานการศึกษาครั้งนี้ขาดไปก็คือการบ่งชี้ทางอณูพันธุศาสตร์ คือการหาลำดับเบสของ 16SrDNA การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี และการนำไปใช้จริงในแปลงทดลอง