สรุปผลและวิจารณ์

เชื้อราที่ปนเปื้อนในแผ่นยางพาราเป็นปัญหาใหญ่สำหรับเกษตรกรชาวสวนยาง เนื่องจากทำให้คุณภาพแผ่นยางต่ำ ส่งผลให้ราคาแผ่นยางลดลง นอกจากนี้ยังอาจเป็นผลเสียต่อสุขภาพของเกษตรกรด้วย ในอดีตที่ผ่านมามีการใช้สารพาราไนโตรฟีนอลในขั้นตอนการผลิตยางแผ่นเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อรา แต่สารนี้มีความเป็นพิษสูง และเป็นสารก่อมะเร็ง จึงถูกห้ามใช้ ทำให้ปัญหาการปนเปื้อนเชื้อราบนแผ่นยางมีมากขึ้น สุพรรษา (2551) ทำการศึกษาโดยใช้กรดอ่อนที่ใช้เป็นสารกันบูดในอาหาร เช่น sodium metabisulphite, potassium sorbate, potassium benzoate, กรดน้ำส้ม ตลอดจนน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระดับปานกลาง ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 206 ไอโซเลท และ actinomycetes 151 ไอโซเลท มาทดสอบกับเชื้อราที่ปนเปื้อนแผ่นยางพาราจำนวน 6 ไอโซเลท พบเชื้อ actinomycetes จำนวน 129 ไอโซเลท (85%) ที่แสดงฤทธิ์ต้านรา ในจำนวนนี้มีเชื้อจำนวนมากถึง 64 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ต้านราทั้ง 6 ชนิดในระดับสูง จะเห็นได้ว่าจำนวนเชื้อ actinomycetes ที่มีฤทธิ์ต้านราที่คัดเลือกได้ในครั้งนี้มีจำนวนสูงมาก เปรียบเทียบกับการศึกษาในรอบ 10 ปีที่ผ่านมาที่พบเชื้อ actinomycetes ตั้งแต่ 8-86% ที่มีฤทธิ์ต้านรา (Ouhdouch *et al.*, 2001; Basilio *et al.*, 2003; Iznaga *et al.*, 2004; Bonjar *et al.*, 2005; Kitouni *et al.*, 2005; Prapagdee *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่มุ่งเน้นทดสอบกับเชื้อราก่อโรคพืชและโรคคน การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาเชื้อ actinomycetes เป็นครั้งแรกกับเชื้อราจากแผ่นยางพารา สำหรับเชื้อ *Bacillus* spp. นั้นพบมีเพียง 33 ไอโซเลท (16%) เท่านั้นที่ยับยั้งเชื้อราได้ในระดับต่ำถึงปานกลาง เชื้อ *Bacillus* หลายสายพันธุ์มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช จนมีการผลิตจำหน่ายในทางการค้า แต่สำหรับเชื้อราที่ปนเปื้อนในแผ่นยางพารายังมีการศึกษาน้อยมาก มีเพียงรายงานจากประเทศอินเดียที่รายงานว่าแบคทีเรียที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 2 สายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อ *Penicillium* spp. และ *Aspergillus* spp. ที่แยกได้จากแผ่นยางพาราได้ และยังระบุไว้ด้วยว่าเชื้อราที่แยกจากแผ่นยางพาราทำลายได้ยากกว่าเชื้อราก่อโรคพืช (Joseph *et al.*, 2005)

เมื่อคัดเลือกเชื้อ actinomyetes ที่มีฤทธิ์ดีที่สุด 30 อันดับแรกศึกษาต่อโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและสกัดสาร พบว่าทั้งน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดของ actinomycetes 2 ไอโซเลท คือ AC41 และ AC51 สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราได้มากกว่า 80% และให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 16-64 μg/ml และมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารต้านราพาราไนโตรฟีนอล แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทนี้สร้างสารต้านราออกมาภายนอกเซลล์ และพบสาร tetrangulol methyl ester เป็นสารหลัก และสาร 8-*O*-methyltetrangomycin และ tetrangulol เป็นสารรอง มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร tetrangulol methyl ester โดยมีฤทธิ์ cytotoxic ต่อทั้งเซลล์มะเร็ง และเซลล์ธรรมดา มีค่า IC_{50} 0.144-50 μg/ml (Maruna *et al.*, 2010) และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งชนิดกรัมบวกและกรัมลบ มีค่า MIC

0.51-1.03 μg/ml (Abdelfattah *et al.*, 2003; Maruna *et al.*, 2010) ส่วนสาร 8-*O*-methyltetrangomycin มีฤทธิ์ในทำนองเดียวกัน โดยมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่ำกว่า tetrangulol methyl ester (MIC 13.3-100 μg/ml) (Shigihara *et al.*, 1988; Gilpin *et al.*, 1989; Maruna *et al.*, 2010) สาร tetrangulol มีฤทธิ์ cytotoxic ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 (IC_{50}35 μM; Yamashita *et al.*, 1998) และต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-231 (IC_{50} 1.5 μg/ml; Shaaban *et al.*, 2011) การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านราด้วย เชื้อ actinomycetes ทั้ง 2 สายพันธุ์ จำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิธีทางชีวโมเลกุล จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* เชื้อในสกุลนี้นิยมนำมาใช้ควบคุมโรคเชื้อราก่อโรคพืชโดยชีววิธี เนื่องจากสามารถสร้างสารต้านราหลายชนิด รวมทั้งเอนไซม์ glucanase และ chitinase ซึ่งสามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราได้ (Omura, 1992; Lange and Sanchez Lopez, 1996) ซึ่งเชื้อ *Streptomyces* ทั้ง 2 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้นั้น เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินในแปลงปลูกพืชของเกษตรกร ซึ่งเป็นแหล่งธรรมชาติ และผ่านการคัดกรองแล้วว่าสามารถสร้างสารต้านราก่อโรคพืชได้ (อำไพทิพย์ และ เสมอใจ, 2551)

ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อในกลุ่ม streptomycetes ขึ้นกับสภาวะการเพาะเลี้ยง (Waksman, 1961) เช่น การเขย่า ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิ สารปฏิชีวนะจัดเป็นสารแมทาบอไลท์ทุติยภูมิ เชื้อ *Streptomyces* ส่วนใหญ่มีรายงานว่าสร้างสารปฏิชีวนะได้ดีในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า (Singh *et al.*, 2009; Thakur *et al.*, 2009; Kavitha *et al.*, 2010) ในทางกลับกันมีรายงานการวิจัยหลายรายงานที่พบการสร้างสารปฏิชีวนะในสภาวะไม่เขย่าได้ดีกว่าสภาวะเขย่า (El-sersy and Abou-Elela, 2006; Al-Zahrani, 2007) ซึ่งสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดอาจถูกสร้างในสภาวะที่แตกต่างกันได้ ส่วนพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะเนื่องจากมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อ และการสร้างสารปฏิชีวนะโดยตรง เชื้อกลุ่ม streptomycetes ชอบสภาวะที่เป็นกลางถึงเป็นด่าง ระหว่าง 6.5-8.8 (Locci, 1989) พีเอชที่เหมาะสมประมาณ 7.0 (Jensen, 1930) อย่างไรก็ตามมีรายงานพบเชื้อ streptomycete ทั้งพวกที่ชอบกรด และพวกที่ชอบด่าง (Bok et al., 1984; Vyas et al., 1990) สำหรับอุณหภูมิมีผลต่อการควบคุมการสังเคราะห์เมแทบอไลท์ทุติยภูมิเช่นกัน การศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. AC41 และ AC51 สร้างสารต้านราได้ดีที่สุดในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบไม่เขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 30° C

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC41 และ AC51 ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นโดยการชุบสารและหยดเชื้อ *Aspergillus* sp. SR9 และ *Penicillium* sp. PR02 ลงไปบนแผ่นยาง พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* AC41 และ AC51 ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ แต่สารสกัดความเข้มข้น 1 mg/ml สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ประมาณ 9 วัน ใกล้เคียงกับสารต้านราพาราไนโตรฟีนอล เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมสารสังเกตพบการเจริญของเชื้อราในวันที่ 5 เมื่อนำแผ่นยาง

ชุบสารสกัด AC51 ความเข้มข้น 16 MIC (512 μg/ml) ในสภาพธรรมชาติ สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ 32 วัน เมื่อเปรียบเทียบกันแผ่นยางที่ไม่ได้เติมสารสกัดในสภาวะเดียวกันพบเชื้อราในวันที่ 23 ส่วนการเติมสารสกัด AC51 ในขั้นตอนการตกตะกอนของการเตรียมยางแผ่นและหยดเชื้อบนยางแผ่นที่เตรียมได้พบว่าที่ความเข้มข้น 32 MIC ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. SR9 ได้ แต่สามารถควบคุม *Penicillium* sp. PR02 ได้ใกล้เคียงกับสารต้านราพาราไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 8 MIC สำหรับในสภาพธรรมชาติพบว่าสารสกัด ความเข้มข้น 32 MIC สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ใกล้เคียงกับสารต้านราพาราไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 32 MIC แสดงให้เห็นว่าทั้งสารสกัดและสารต้านราพาราไนโตรฟีนอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราหรือทำลายเชื้อราเพียงบางส่วนเท่านั้น ทำให้เมื่อเวลาผ่านไปเชื้อรายังคงสามารถเจริญบนยางแผ่นได้ และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด พบว่าสารสกัด AC51 ทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราทำให้มีการรั่วไหลของสารออกมานอกเซลล์ การค้นคว้าหาสารที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางพารายังมีผู้ศึกษากันน้อยมาก เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องความปลอดภัยของสารที่นำมาใช้ ส่วนใหญ่สารที่ปลอดภัยก็จะมีฤทธิ์ต้านราต่ำ สุพรรษา (2551) นำยางแผ่นจุ่มใน sodium metabisulphite (10%w/v) พบว่าสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อได้นาน 30 วันเช่นกัน Baimark *et al.* (2009) รายงานว่าน้ำส้มควันไม้จากไม้ชนิดต่าง ๆสามารถนำมาใช้เป็นสารตกตะกอนน้ำยางแทน formic acid และ acetic acid ได้ และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่ากรดทั้ง 2 ชนิดนั้น การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารกัดจาก *Streptomyces* sp. AC41 และ AC51 เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่อาจนำมาใช้ควบคุมเชื้อราบนแผ่นยางได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเริ่มต้นเท่านั้น หากต้องการนำไปใช้ประโยชน์จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาณมากเพื่อการสกัดสารและนำสารสกัดไปใช้ ตลอดจนพัฒนาวิธีการใช้สารสกัดในการควบคุมเชื้อราที่มีประสิทธิภาพ และสะดวกต่อเกษตรกร