

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม เป็นผู้ผลิตและส่งออกสินค้าทางการเกษตรสำคัญแห่งหนึ่งของโลก พืชเศรษฐกิจหลายชนิดสร้างรายได้ให้กับประเทศชาติเป็นมูลค่ามหาศาล แต่การพัฒนาการเกษตรเพื่อเพิ่มผลผลิต มุ่งเน้นการแข่งขันเป็นหลัก จึงมีการใช้สารเคมีเพิ่มธาตุอาหารให้กับดินเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของพืช และสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกันอย่างแพร่หลายเป็นจำนวนมาก โดยมีได้คำนึงถึงผลกระทบที่มีต่อผู้บริโภค สังคม และสิ่งแวดล้อม ในปี 2547 รัฐบาลได้กำหนดให้เป็นปีแห่งความปลอดภัยด้านอาหาร มีการรณรงค์และส่งเสริมให้ผู้ผลิต ผู้ประกอบการสินค้าเกษตรและอาหาร ได้ตระหนักถึงพิษภัยของสารเคมีที่ใช้ทางการเกษตรและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและชีวิตมนุษย์ โดยการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการผลิตระบบการเกษตรเคมีให้เป็นเทคโนโลยีชีวภาพมากขึ้น ปัจจุบันมีการรณรงค์ให้เกษตรกรมุ่งเน้นการใช้เกษตรอินทรีย์เพื่อแก้ปัญหาต่าง ๆ ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประโยชน์ในการทำลายโรคพืชในดิน และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตทำให้สามารถเพิ่มเพิ่มผลผลิตให้กับพืชเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของแผนการจัดการโรคพืชตามระบบเกษตรอินทรีย์ นอกจากนี้ยังนำทรัพยากรที่มีอยู่ในธรรมชาติจากดิน ได้แก่ *Pseudomonas* และ เชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ที่แยกได้จากดินในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ มาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรได้อีกทางหนึ่ง

พื้นที่เขื่อนอุบลรัตน์พัฒนารูปแบบพืชที่เขื่อนจุฬาภรณ์ (เขื่อนน้ำพรม) จังหวัดชัยภูมิ เป็นพื้นที่อนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีฯ ซึ่งรวมถึงจุลินทรีย์ที่มีหลากหลายชนิด ดังนั้นการศึกษาถึงความหลากหลายของจุลินทรีย์ และการนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง งานวิจัยนี้เล็งเห็นความสำคัญของเชื้อ *Pseudomonas* และไรโซแบคทีเรียอื่น ๆ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด มีรายงานการใช้เชื้อ *Pseudomonas* ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น *P. fluorescens* หลายสายพันธุ์มีความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคกาบใบแห้งของข้าว (rice sheath blight) (Mew et al., 1986; Nagarajkumar et al., 2004) *P. aureofaciens* เจริญได้อย่างรวดเร็วรอบรากข้าวสาลีซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (Pierson, 1996) Scher และ Baker, 1982 พบว่า *P. putida* สามารถลดการเกิดโรค Fusarium wilt ของป่าน, ปอ, แตง และหัวผักกาด Larkin และ Fravel, 1998 ได้นำเชื้อ *P. fluorescense*, ราและแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ได้แก่ non-pathogenic *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Gliocladium virens*, *Burkholderia cepacia* มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พบว่าสามารถลดการเกิดโรสดังกล่าวได้ 35-100% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อต่อต้าน เป็นต้น นอกจากนี้นักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาพบว่า เชื้อ *Pseudomonas* สายพันธุ์ที่ไม่ทำให้เกิดโรค และเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อเป็นกลไกการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่นการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) (pyrolnitrin, pyoluteorin และ phenazine - 1 - carboxylate), lytic enzymes (chitinase และ beta - 1, 3 glucanase) และ HCN ซึ่งมีรายงานว่าสารเหล่านี้สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Nagarajkumar et al., 2004, Weller, 1988; Thomashow and Weller, 1988) *Pseudomonas* บางสายพันธุ์สามารถผลิตสาร siderophores ยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช และส่งเสริมการเจริญของพืชโดยให้ธาตุเหล็กแก่พืช

(Kloepper et al., 1986; Leong, 1986; Loper, 1988) จากข้อมูลดังกล่าวจะพบว่า *Pseudomonas* และแบคทีเรียหลายชนิดเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่นอกจากจะใช้ควบคุมโรคพืช ยังสามารถนำมาใช้บำรุงดินส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดี

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ อินโดล-3 อะซิติก แอซิด (indole-3-acetic acid, IAA), diffusible compounds, volatile compounds จากเชื้อ *Pseudomonas* sp. และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ

2.2 เพื่อทดสอบการละลายหินฟอสเฟต (phosphates solubilization) ของเชื้อ *Pseudomonas* sp. และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วจากพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *Enterobacter cancerogenus* / *E. asburiae* สายพันธุ์ 2Z2E-7, *Enterobacter cancerogenus* / *E. asburiae* สายพันธุ์ Z4G-1, *Enterobacter* สายพันธุ์ 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* สายพันธุ์ 4Z2B-4 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ อินโดล-3 อะซิติก แอซิด (indole-3-acetic acid, IAA), diffusible compounds, volatile compounds และการละลายหินฟอสเฟต (phosphates solubilization) เป็นต้น

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas*

เป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในกลุ่มโพรคาริโอต (Prokaryote) มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ดังนี้ (Garrrity and Holt, 2001)

Domain:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Class:	Gammaproteobacteria
Order:	Pseudomonadales

Family: Pseudomonadaceae

Genus: *Pseudomonas*

จากหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 2 ปีพ.ศ. 2001 จัดสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโปรคาริโอต (procaryote) เป็น 2 โดเมน (domains) ได้แก่ Archaea และ Bacteria จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA เชื้อ *Pseudomonas* จัดอยู่ใน โดเมน แบคทีเรีย การจัดกลุ่ม (classification) และการระบุชนิด (identification) ของแบคทีเรียต้องอาศัย คุณสมบัติหลายอย่างเช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่รูปร่าง รูปแบบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การติดสีย้อมแกรม เป็นต้น ลักษณะทางสรีรวิทยา ได้แก่โครงสร้างทางเคมีของเซลล์ ความต้องการอาหาร กระบวนการเมตาโบลิซึมภายในเซลล์ (ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน เป็นต้น) ความต้องการทางกายภาพ (ความต้องการออกซิเจน อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง) และคุณสมบัติของดีเอ็นเอ (ได้แก่ การหาปริมาณของกัวนีน (guanine: G) (cytosine: C) ขนาดของจีโนม (genome) ความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในการจับคู่กันใหม่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและไม่เหมาะสม ตลอดจนความสามารถในการทนต่อความร้อน เป็นต้น นอกจากนี้การใช้คุณสมบัติของดีเอ็นเอสามารถจำแนกแบคทีเรียได้ถึงระดับชนิด (species) (นันทนา, 2537)

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* มีลักษณะเป็น รูปท่อนตรง หรือโค้งเล็กน้อย (ไม่มีลักษณะเป็นเกลียว) มีขนาด $0.5 - 1.0 \times 1.5 - 5.0$ ไมโครเมตร ติดสีกรัมลบ (gram negative bacilli) ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ (polar flagella) ซึ่งมีอย่างน้อยที่สุด 1 เส้น บางสายพันธุ์เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลาด้านข้าง (lateral flagella) ไม่สร้างสปอร์ (non - spore forming) มีค่าโมลเปอร์เซ็นต์ G + C ของ DNA เท่ากับ 58-68 เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นทั้งแหล่งพลังงานและแหล่งของอิเล็กตรอน (chemoorganotrophs) สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่ไวต่อยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน (penicillin sensitivity) ต้องการอากาศ (strictly aerobes) ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) ในกระบวนการเมตาโบลิซึม สร้างพลังงานแบบออกซิเดทีฟ ฟอสโฟไรเลชัน (oxidative phosphorylation) จึงให้ผลบวกกับการทดสอบเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส (cytochrome oxidase test) และในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะไม่หมัก (fermentation) น้ำตาลกลูโคส ดังนั้นเมื่อทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคสแบบออกซิเดทีฟ หรือเฟอร์เมนเททีฟ (oxidative-fermentative test หรือ O-F test) จึงให้ผลเป็นแบบออกซิเดทีฟ (oxidative) แบคทีเรียกลุ่มอื่นที่เป็น แกรมลบ ไม่สามารถหมักย่อน้ำตาลกลูโคสมีหลายสกุลได้แก่ *Alcaligenes* (*Achromobacter*), *Acinetobacter*, *Agrobacterium* และ *Moraxella* เป็นต้น (นันทนา, 2537) ซึ่งแบคทีเรียสกุลเหล่านี้มีลักษณะบางอย่างที่เหมือนกันและบางอย่างก็แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ ในกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลกลูโคส

Test	<i>Agrobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Alcaligenes</i>
shape	rod	rod	coccus	rod / coccus	rod / coccus
O-F glucose	oxidizer	oxidizer	oxidizer	nonoxidizer	nonoxidizer

Fluorescence diffusible pigment	-	V	-	-	-
Motility in hanging drop	+	+	-	-	+
Polar flagellar	-	+	-	-	-
Penicillin sensitivity	-	-	-	+	-
Oxidase test	+	+	-	+	+

นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* ยังมีความใกล้ชิดกับแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonad ได้แก่ *Xanthomonas* และ *Zoogloea* เป็นต้น กล่าวคือ เป็นรูปท่อนตรง หรือ โค้ง ติดสีแกรมลบ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ (polar flagella) ซึ่งมีอย่างน้อยที่สุด 1 เส้น ไม่สร้างสปอร์

แบคทีเรียใน Family Pseudomonadaceae บางชนิดสามารถก่อโรคในคนได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียใน Family Enterobacteriaceae แต่มีข้อแตกต่างกันคือ Family Pseudomonadaceae เป็นแบคทีเรียที่ไม่หมักย่อยน้ำตาลกลูโคส ให้ผลบวกกับการทดสอบเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส ซึ่งให้ผลตรงข้ามกับ Family Enterobacteriaceae ที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส และให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* และไรโซแบคทีเรีย (rhizobacteria) หลายชนิด อาศัยในดินบริเวณรากพืช เป็นเชื้อที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในดิน เพราะสามารถอยู่อาศัยร่วมกับพืชได้ยังให้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในดิน มีรายงานการใช้ไรโซแบคทีเรียหลายชนิดควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา เช่น *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* และ *Arthrobacter* ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถที่จะสร้างเอนไซม์ ย่อยสลายโคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราได้ (Basha and Ulaganathan, 2002) กลไกการควบคุมทางชีวภาพของแบคทีเรียเหล่านี้ได้แก่ การผลิตยาปฏิชีวนะ, เอนไซม์ย่อยสลาย (lytic enzyme) ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide), ไซเดอร์โอฟอร์ (siderophore) หรือ การแย่งแย่งแข่งขันสารอาหาร (competition for nutrient) และการเข้าครอบครองพื้นที่ (competition for space) เป็นต้น (Chaiharn et. al., 2008) Pierson, 1996 รายงานว่า *Pseudomonas aureofaciens* เจริญได้อย่างรวดเร็วรอบรากข้าวสาลีซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ นอกจากการควบคุมโรคพืชแล้วยังมีรายงานว่าไรโซแบคทีเรียสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่นสามารถตรึงไนโตรเจน ละลายหินฟอสเฟตให้ธาตุฟอสฟอรัสกับพืช และผลิต ไฟโตฮอร์โมน (phytohormone) เช่น indole - 3 - acetic acid เป็นต้น (Chaiharn et.al., 2008)

มีรายงานการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อ *Pseudomonas* และเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชและยังส่งเสริมการเจริญของพืชดังนี้

Raupach และ Kloepper, 1998 รายงานว่า ไรโซแบคทีเรียสายพันธุ์ INR7 (*Bacillus pumilus*) GB03 (*Bacillus subtilis*) และ ME1 (*Curtobacterium flaccumfaciens*) ถูกนำมาทดสอบ

การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคของแตงกวา 3 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum orbiculare* สาเหตุโรค anthracnose, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* สาเหตุโรค angular leaf spot และ *Erwinia tracheiphila* สาเหตุโรค cucurbit wilt disease ภายใต้สภาพเรือนทดลอง พบว่าเมื่อนำเมล็ดแตงกวามาแช่ส่วนผสมของเชื้อไรโซแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และลดการเกิดโรคอย่างมีนัยสำคัญ

Torres-Rubio และคณะ, 2000 แยกแบคทีเรีย *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Serratia* sp., *Klebsiella pneumoniae* จากรอบรากข้าวใน Tolima region แบคทีเรียเหล่านี้ผลิต extra cellular indole-3-acetic acid (IAA) ที่ความเข้มข้น 3.5 mg/ mL - 32.2 mg/L. และพบว่า *Pseudomonas* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora infestans* สาเหตุโรคพืชเนื่องจากผลิต siderophores ในสภาวะที่มีเหล็กต่ำ

Ramesh Kumar และคณะ, 2002 รายงานว่า growth-promoting rhizobacteria (PGPR), *Pseudomonas fluorescens* สามารถสร้างสาร 2,4-diacetyl phloroglucinol ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยสารเหล่านี้จะไปสลาย fusaric acid ที่ผลิตโดยเชื้อ *Fusarium* sp. สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชหลายชนิด ทำให้ป้องกันกระบวนการ pathogenesis ได้ และบางชนิดของ PGPR เช่น *Pseudomonas stutzeri* สามารถสร้าง extracellular chitinase และ laminarinase ทำลายเส้นใยของ *Fusarium solani* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืช

Nagarajkumar และ คณะ, 2004 แยกเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* จากดินที่บริเวณรอบรากข้าว แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชพบว่า ไอโซเลต PfMDU2 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Rhizoctonia solani* และสามารถสร้างสาร เบตา-1, 3 - กลูคาเนส, ไซเดอร์โรฟอร์, กรดซาลิไซลิก และไฮโดรเจน ซายาไนต์ เป็นต้น

Sunish Kumr และ คณะ, 2005 แยกเชื้อแบคทีเรียจากดินรอบรากข้าว เมื่อนำมาบ่ง เอกลักษณ์โดยวิธีทางชีวเคมี และ 16s rDNA sequences พบว่าสายพันธุ์ PUPa3 บ่งเอกลักษณ์เป็น *Pseudomonas aeruginosa* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้แก่ phenazine-1-carboxamide (PCN) วิเคราะห์โดย nuclear magnetic resonance (NMR) และ mass spectroscopy (MS) และยังสามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ indole-3-acetic acid (IAA), siderophores, phosphatase และ protease

Chaiharn และคณะ, 2008 แยกเชื้อไรโซแบคทีเรียที่สามารถละลายหินฟอสเฟตจากดินในเขตภาคเหนือของประเทศไทยได้จำนวน 220 ไอโซเลต แบคทีเรียเหล่านี้สามารถสร้างสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืชได้แก่ แอมโมเนีย, ไซเดอร์โรฟอร์ และยังสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรค ได้แก่ เอนไซม์เซลลูโลส, ไคติเนส และ โปรตีเอส

Ashrafuzzaman และคณะ, 2009 รายงานว่า Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) เป็นแบคทีเรียที่เจริญอยู่รอบรากพืชที่มีประโยชน์ทางการเกษตร โดยใช้ PGPR ทดแทนปุ๋ยเคมี, สารฆ่าแมลง ผู้วิจัยได้ทำการแยก PGPR ไอโซเลต PGB1, PGB2, PGB3, PGB4, PGB5, PGT1, PGT2, PGT3, PGG1 และ PGG2 จากดินบริเวณรอบรากข้าวจากพื้นที่ปลูกข้าวหลายแหล่ง เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นข้าว พบว่าไอโซเลต PGB4, PGT1, PGT2, PGT3, PGG1 และ PGG2 กระตุ้นการผลิต indole acetic acid (IAA), ขณะที่ไอโซเลต PGT3 มีความสามารถละลายธาตุฟอสฟอรัสได้ แบคทีเรียเหล่านี้สามารถเพิ่มความสูงของต้นข้าว, ความยาวของราก และน้ำหนักแห้งของรวงข้าว อย่างมีนัยสำคัญ

Karnwal, 2009 แยก 30 fluorescent *Pseudomonas* isolates (15 ไอโซเลตคือ *P. fluorescens* และ 15 ไอโซเลตคือ *P. aeruginosa*) จากดินรอบรากพืชหลายแหล่ง เมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลตเหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่มีและไม่มี L-tryptophan พบว่า *Pseudomonas fluorescens* AK1 มีประสิทธิภาพในการสร้าง IAA ได้ดีกว่า *Pseudomonas aeruginosa* AK2 และเมื่อทำการ inoculation เมล็ดข้าวด้วย *P. fluorescens* AK1 และ *P. aeruginosa* AK2 พบว่า ระดับ IAA เท่ากับ 2.30 pmol/ml and 2.1 pmol/ml ตามลำดับสูงกว่าเมล็ดข้าวที่เป็น uninoculated ซึ่งระดับ IAA เท่ากับ 1.6 pmol/ml

Rakh และคณะ (2011) รายงานว่า เชื้อ *Pseudomonas cf. monteilii* 9 มีประสิทธิภาพสูงในการต้านทานเชื้อ *Sclerotium rolfsii* เมื่อทดสอบโดยวิธี dual cultures และเชื้อ *P. cf. monteilii* 9 ในสภาพแห้ง (dry weight) สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* ได้เพิ่มขึ้นถึง 94 % นอกจากนี้เชื้อชนิดนี้ยังสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ diffusible antibiotic, volatile metabolites, hydrogen cyanide, siderophore ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ใน *in vitro* และยังผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งให้วงใสบนจานอาหาร skim milk agar plates มายับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* เช่นกันเมื่อนำเชื้อ *P. cf. monteilii* 9 มาทดสอบการควบคุมโรค stem rot ของ groundnut แบบ treated seeds ในสภาพเรือนทดลองพบว่าเชื้อสามารถลดการเกิดโรคระหว่าง 45.45 - 66.67 % เมื่อเปรียบเทียบกับ untreated seeds

Kumar และคณะ (2012) แยกเชื้อแบคทีเรียรอบรากต้นถั่วแขก ที่ Uttarakhand Himalaya ประเทศอินเดีย จำแนกชนิดโดยวิธี 16S rRNA gene sequence เป็นกลุ่มของ *Bacillus* sp. และพบว่าสายพันธุ์ BPR7 มีคุณสมบัติเป็นทั้งเชื้อปฏิปักษ์แสดง antagonistic activity ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิดได้แก่ *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Sclerotium sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* และ *Colletotricum* sp. และเป็นเชื้อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช สามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting) ได้แก่ Indole-3-acetic acid (IAA), siderophore, phytase, organic acid, ACC deaminase, cyanogen, lytic enzymes, oxalate oxidase และสามารถสร้างสารที่ละลายได้ทั้ง organic, inorganic phosphate, potassium, zinc เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เชื้อแบคทีเรียแยกได้จากดินในพื้นที่อนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชฯ เชื้อนจุฬามารณ์ จังหวัดชัยภูมิ จำนวน 4 ไอโซเลต (2Z2E-7, Z4G-1, 2Z4E-2 และ 4Z2B-4) ได้ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในระดับห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง จำแนกชนิดโดยวิธี Partial 16S rDNA sequencing เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GenBank จากเว็บต่าง ๆ และสร้างต้นไม้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต 2Z2E-7, Z4G-1 คือ *Enterobacter cancerogenus* (ลำดับความเหมือนของนิวคลีโอไทด์เป็น 100 %), ไอโซเลต 2Z4E-2 จัดอยู่ในกลุ่ม *Enterobacter* (ลำดับความเหมือนของนิวคลีโอไทด์เป็น 99.12 %) และไอโซเลต 4Z2B-4 จัดอยู่ในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. (ลำดับความเหมือนของนิวคลีโอไทด์ 98.39 % เมื่อเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน *Pseudomonas koreensis* PS9-14) (วรรณดีและคณะ, 2552) แบคทีเรียทั้งหมดเพาะเลี้ยงไว้บน Nutrient agar slant (ภาคผนวก) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$)

3.2 การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound)

3.2.1 การสร้าง diffusible compounds (Montealegre และคณะ, 2003)

นำชิ้นวุ้นขนาด 0.6 ซม. ที่มีปลายเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii* เจริญอยู่ วางลงตรงกลางจานอาหาร Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก) ใช้ cork borer ขนาด 0.6 ซม. เจาะลงบนจานอาหาร PDA ให้เป็นหลุม ห่างจากขอบจาน 2.5 ซม. จำนวน 4 หลุม หยอดเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *Enterobacter cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) ที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหาร King's B broth (ภาคผนวก) (ปริมาณเชื้อ 1×10^8 cfu/ml) หลุมละ 100 ไมโครลิตร (4 หลุม/สายพันธุ์) บ่มที่ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราเปรียบเทียบกับจานควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแทนแบคทีเรียปฏิชีวนะ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

3.2.2 การสร้าง volatile compounds (Montealegre et. al., 2003)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) ในอาหาร King's B broth บ่มเขย่าที่ 140-150 rpm เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (1×10^8 cfu/ml) นำมา swab ลงบนจานอาหาร King's B agar (ภาคผนวก) บ่มที่ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาประกบกับจานอาหารที่วางชิ้นวุ้นที่มีปลายเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii* ขนาด 0.6 ซม. เจริญอยู่ตรงกลางจานอาหาร PDA ยึดจานอาหารทั้งสองจานด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) นำจานอาหารบ่มที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราเปรียบเทียบกับจานควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

3.2.3 การสร้างกรดซาลิไซลิก (salicylic acid, SA)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) ใน 50 มล. ของ succinate medium ที่บรรจุฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบน rotary shaker ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000g เป็นเวลา 5 นาที ปรับ pH ของส่วน culture filtrate เท่ากับ 2.0 ด้วย 1N HCl นำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform: CHCl₃) ในปริมาณที่เท่ากัน จากนั้นนำส่วนล่างที่เป็นส่วนคลอโรฟอร์ม มาเติมน้ำกลั่น 4 มล. และ 5มล. ของ 2M FeCl₃ ผลบวกคือเกิดสารสีม่วงของ iron-SA complex นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 527 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ SA ปริมาณของ SA ใน culture filtrate แสดงเป็นไมโครกรัมต่อมล. (Meyer et al., 1992)

3.2.4 การสร้างอินโดล-3 อะซิติก แอซิด (indole-3-acetic acid, IAA)

(ตามวิธีการของ Kumar et. al., 2005)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) ในอาหาร Luria Bertani (LB) agar (ภาคผนวก) ที่เติมด้วย 5 mM L-tryptone, 0.06% sodium dodecyl sulphate และ 1% glycerol นำกระดาษกรอง (Whatman No.1) เส้นผ่านศูนย์กลาง 82 มิลลิเมตร วางทับบนจานอาหารที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไว้แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำกระดาษกรองออกมาวางในจานอาหารเปล่า เติม Salkowski's reagent ลงไปบนกระดาษกรอง สังเกตลักษณะวงสีชมพูที่เกิดขึ้นทันทีบนกระดาษกรอง แสดงเป็นผลบวก เปรียบเทียบกับจานควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

3.2.5 การละลายหินฟอสเฟต (Phosphates solubilization)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) ในอาหาร King's B broth บ่มเขย่าที่ 140-150 rpm เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (1×10⁸ cfu/ml) ใช้ cork borer ขนาด 0.6 เซนติเมตร (ซม.) เจาะชั้นวันตรงกลางจานอาหาร double layer medium (ภาคผนวก) หยดเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ลงในจานอาหาร นำไปบ่มที่ 30±2 °C เป็นเวลา 72-96 ชั่วโมง สังเกตลักษณะที่เป็นบริเวณใส (clear zone) รอบหลุมที่หยดเชื้อแบคทีเรียให้เป็นผลเป็นบวก เปรียบเทียบกับจานควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นแทนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการทดสอบการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound)

นำแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4 มาทดสอบการสร้าง diffusible compounds, volatile compounds, อินโดล-3 อะซิติก แอซิด (IAA), และการละลายหินฟอสเฟต ให้ผลการทดลองดังนี้

1 ผลการทดสอบการสร้าง diffusible compounds

แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) สามารถสร้าง diffusible compounds ยับยั้งการเจริญของเส้นใย *S. rolfii* ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 71.12, 63.26, 71.12 และ 82.81 ตามลำดับ โดยที่แบคทีเรีย *Pseudomonas* 4Z2B-4 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด (ตารางที่ 4.1, รูปที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfii* ด้วยสาร diffusible compounds ที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้น

สายพันธุ์ ¹ แบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา (เซนติเมตร)			เฉลี่ย (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์ ² การยับยั้ง
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
Control	8.9	8.9	8.9	8.90	0
2Z2E-7	2.3	2.5	2.9	2.57	71.12
Z4G-1	3.2	3.3	3.3	3.27	63.26
2Z4E-2	2.5	2.5	2.7	2.57	71.12
4Z2B-4	1.4	1.5	1.7	1.53	82.81

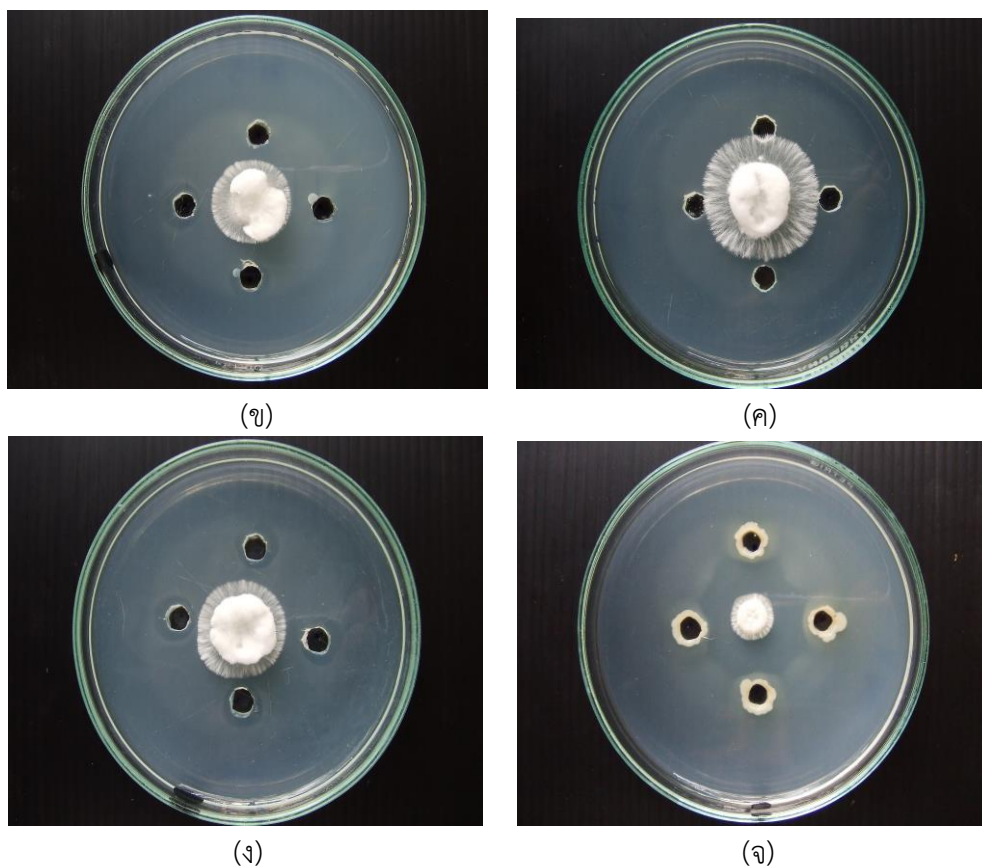
¹ 2Z2E-7 คือ *Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, Z4G-1 คือ *E. cancerogenus* Z4G-1, 2Z4E-2 คือ *Enterobacter* 2Z4E-2, 4Z2B-4 คือ *Pseudomonas* 4Z2B-4

จานควบคุม ใช้น้ำกลั่นแทนเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติ

² เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = [(เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนจานควบคุม) - (เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนจานทดสอบ) / เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนจานควบคุม] x 100



(ก)



รูปที่ 4.1 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfii* ด้วยสาร diffusible compounds ที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้นเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

- (ก) จานควบคุม (control) ใช้ น้ำกลั่นแทนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์
 (ข) *Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7
 (ค) *Enterobacter cancerogenus* Z4G-1
 (ง) *Enterobacter* 2Z4E-2 (จ) *Pseudomonas* 4Z2B-4

2. ผลการทดสอบการสร้าง volatile compounds

แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) สามารถสร้าง volatile compounds ยับยั้งการเจริญของเส้นใย *S. rolfii* ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 78.31, 36.74, 77.19 และ 92.47 ตามลำดับ โดยที่แบคทีเรีย *Pseudomonas* 4Z2B-4 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด (ตารางที่ 4.2, รูปที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfii* ด้วยสาร volatile compounds ที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้น

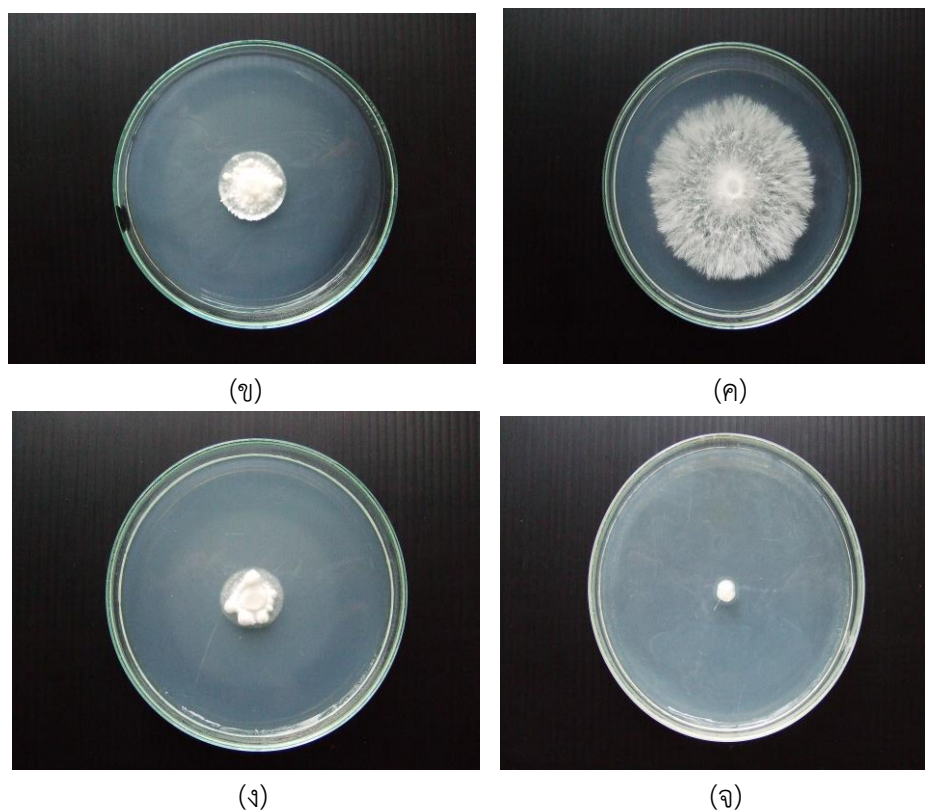
สายพันธุ์ ¹ แบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา (เซนติเมตร)			เฉลี่ย (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์ ² การยับยั้ง
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
Control	8.9	8.9	8.9	8.90	0
2Z2E-7	1.3	2.2	2.3	1.93	78.31
Z4G-1	3.0	5.6	5.9	5.63	36.74
2Z4E-2	1.9	2.1	2.1	2.03	77.19
4Z2B-4	0.6	0.7	0.7	0.67	92.47

¹2Z2E-7 คือ *Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, Z4G-1 คือ *E. cancerogenus* Z4G-1, 2Z4E-2 คือ *Enterobacter* 2Z4E-2, 4Z2B-4 คือ *Pseudomonas* 4Z2B-4 ส่วนงานควบคุม คือ งานที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อน

²เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = [(เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนงานควบคุม) – (เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนงานทดสอบ) / เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนงานควบคุม] × 100



(ก)



รูปที่ 4.2 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยสาร volatile compounds ที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้นเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

(ก) จานควบคุม (control) คือจานที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียปลูก

(ข) *Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7

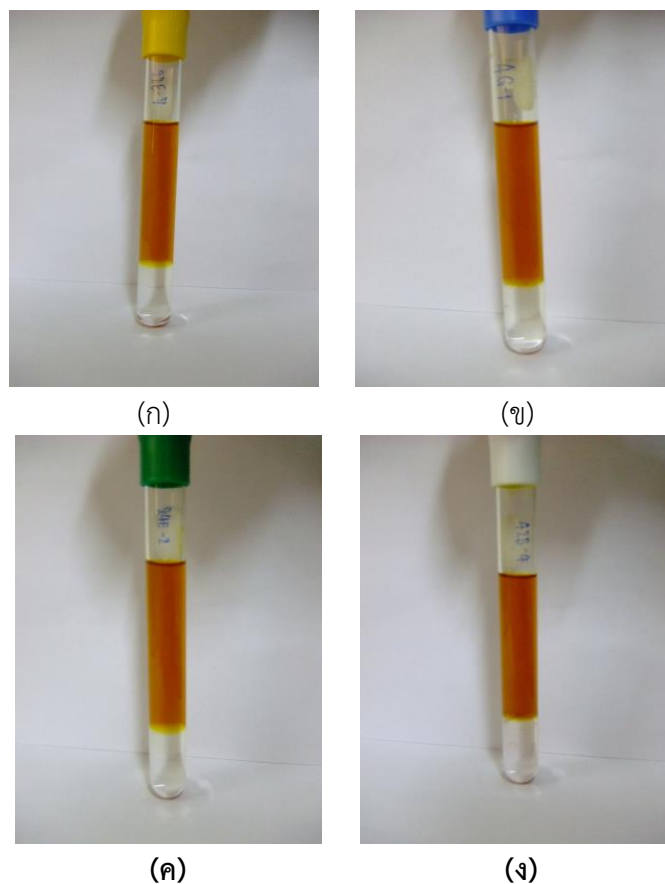
(ค) *E. cancerogenus* Z4G-1

(ง) *Enterobacter* 2Z4E-2

(จ) *Pseudomonas* 4Z2B-4

3. ผลการสร้างกรดซาลิไซลิก (salicylic acid, SA)

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปลูกแต่ละสายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) ใน succinate medium บ่มบน rotary shaker ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000g เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกไป นำส่วน culture filtrate ปรับ pH เท่ากับ 2.0 ด้วย 1N HCl สกัดด้วย คลอโรฟอร์ม จากนั้นนำส่วนล่างที่เป็นส่วนคลอโรฟอร์ม มาเติมน้ำกลั่น และ 2M เฟอริก คลอไรด์ (ferric chloride: FeCl_3) พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ให้ผลลบ คือไม่สร้างสารสีม่วงของ iron-SA complex (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ลักษณะสีที่เกิดขึ้นจากการทดสอบการสร้างกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) เมื่อเติมน้ำกลั่น และ 2M FeCl_3 ลงใน culture filtrate ที่ผ่านการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ ให้ผลเป็นลบ (ไม่สร้างสารสีม่วงของ iron-SA complex)

(ก) *Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7

(ข) *E. cancerogenus* Z4G-1

(ค) *Enterobacter* 2Z4E-2

(ง) *Pseudomonas* 4Z2B-4

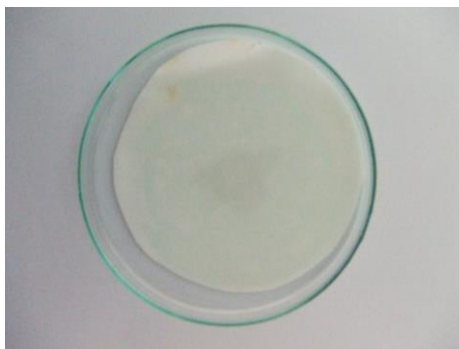
4. ผลการทดสอบการสร้างอินโดล-3 อะซิติก แอสิด

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) ในอาหาร Luria Bertani (LB) agar ที่เติมด้วย 5 mM L-tryptone, 0.06% sodium dodecyl sulphate และ 1% glycerol นำกระดาษกรอง (Whatman No.1) เส้นผ่านศูนย์กลาง 82 มิลลิเมตร วางทับบนจานอาหารที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไว้แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำกระดาษกรองออกมาวางในจานอาหารเปล่า เติม Salkowski's reagent ลงไปในกระดาษกรอง พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ ให้ผลบวก คือเกิดสีชมพูบนกระดาษกรอง เปรียบเทียบกับจานควบคุมที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียให้ผลลบ คือ ไม่เกิดสีบนกระดาษกรอง (รูปที่ 4.4)

5. การละลายหินฟอสเฟต

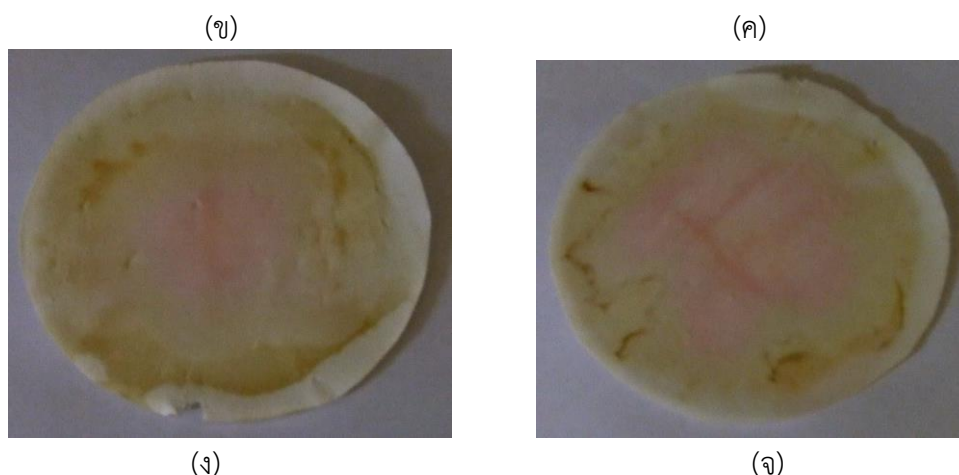
เมื่อนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร King's B

broth มาหยอดลงในหลุมที่เจาะไว้ตรงกลางอาหาร double layer medium (อาหารจะมีลักษณะขุ่น) นำไปบ่มที่ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ให้ผลบวก คือ ลักษณะที่เป็นบริเวณใส (clear zone) รอบหลุมที่หยอดเชื้อแบคทีเรีย เปรียบเทียบกับงานควบคุมที่หยอดน้ำกลั่นแทนเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ (รูปที่ 4.5)



(ก)





(ง)

(จ)

รูปที่ 4.4 ลักษณะวงสีชมพูที่เกิดขึ้นบนกระดาดากรองของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ เมื่อเติม Salkowski's reagent ลงไปบนกระดาดากรอง ที่ผ่านการวางบนจานอาหาร Luria Bertani (LB) agar ซึ่งเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เติมด้วย 5 mM L-tryptone, 0.06% sodium dodecyl sulphate และ 1% glycerol บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

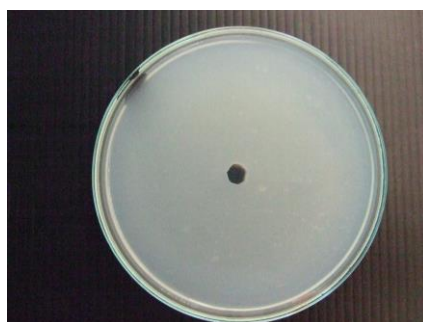
(ก) จานควบคุม (control) (ไม่มีเชื้อแบคทีเรียปลูก)

(ข) *Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7

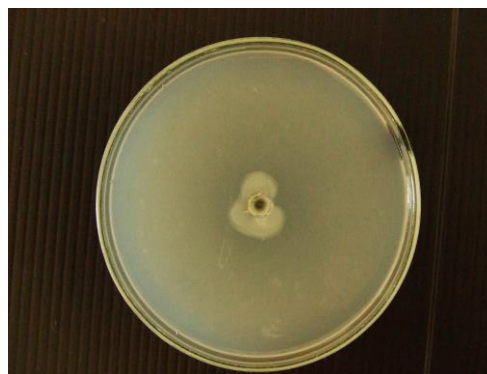
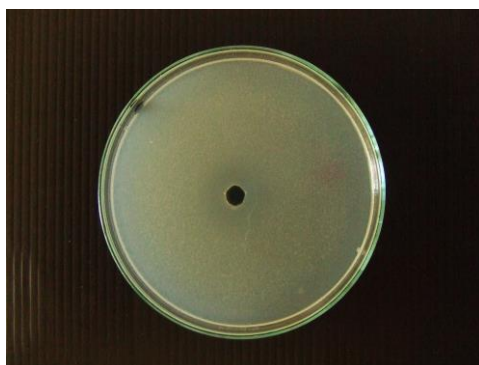
(ค) *Enterobacter cancerogenus* Z4G-1

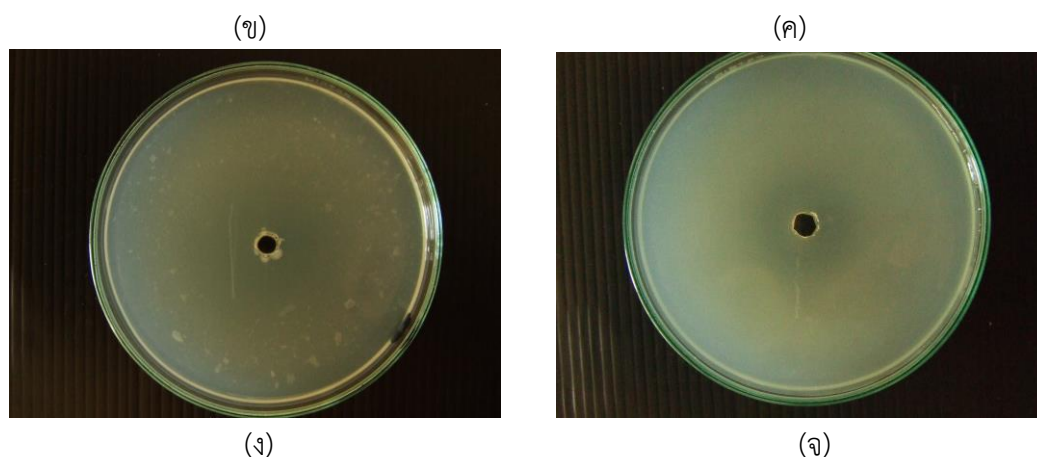
(ง) *Enterobacter* 2Z4E-2

(จ) *Pseudomonas* 4Z2B-4



(ก)





รูปที่ 4.5 ลักษณะวงใสที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ บนจานอาหาร double layer medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72-96 ชั่วโมง

(ก) จานควบคุม (control) (ใช้น้ำกลั่นแทนเชื้อแบคทีเรีย)

(ข) *Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7

(ค) *Enterobacter cancerogenus* Z4G-1

(ง) *Enterobacter* 2Z4E-2

(จ) *Pseudomonas* 4Z2B-4

บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากรายงานฉบับสมบูรณ์ในปี 2551 งานวิจัยเริ่มต้นเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ เพื่อนำมาแยกเชื้อในกลุ่มของ *Pseudomonas* สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 363 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมบวก 96 ไอโซเลต และแกรมลบ 261 ไอโซเลต แบคทีเรียรูปกลม แกรมลบ 3 ไอโซเลต และแบคทีเรียรูปกลม แกรมบวกอีก 3 ไอโซเลต จากนั้นนำแบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบมาศึกษาลักษณะทางชีวเคมีพบว่ามีความแตกต่างกันถึง 18 กลุ่ม ดังนั้นงานวิจัยต่อมาได้สุ่มเชื้อแบคทีเรียจากทุกกลุ่มจำนวน 78 ไอโซเลตมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* พบว่ามีจำนวน 11 ไอโซเลตได้แก่ 4Z2B-4, 2Z2D-5, 4Z1D-2, 4Z2E-1, 4Z4C-2, Z1B-1, Z3B-2, Z4G-1, 2Z1A-5, 2Z2E-7 และ 2Z4E-2 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 50, 56, 50, 40, 60, 40, 48, 56, 40, 56 และ 60 ตามลำดับ

งานวิจัยปี 2552 คัดเลือกเชื้อจำนวน 4 ไอโซเลต (2Z2E-7, Z4G-1, 2Z4E-2 และ 4Z2B-4) ที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง มากกว่าหรือเท่ากับ 50 มาจำแนกชนิดด้วยวิธี Partial 16S rDNA sequencing และนำข้อมูลสร้างต้นไม้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต 2Z2E-7, Z4G-1 คือ *Enterobacter cancerogenus* / *E. asburiae*, ไอโซเลต 2Z4E-2 จัดอยู่ในกลุ่ม *Enterobacter* และไอโซเลต 4Z2B-4 จัดอยู่ในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

งานวิจัยปี 2553 จากการนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) มาทดสอบการควบคุมโรคโคนและลำต้นเน่า (collar rot and stem rot) ของมะเขือเทศ ที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii* ในสภาพเรือนทดลอง จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียทุก ไอโซเลตมีความสามารถลดการเกิดโรคอยู่ระหว่าง 30-90 % ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกรรมวิธีที่ใช้ทดสอบ

ไรโซแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเหล่านี้คือ root-colonizing ที่ถูกคัดเลือกจากบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) จึงมีความสามารถที่จะ colonized ได้อย่างรวดเร็วบริเวณรอบรากพืช และสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เช่นสร้างสาร diffusible antibiotic, volatile metabolites, hydrogen cyanide, siderophore และ Protease ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ใน *in vitro* (Rakh et al., 2011) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารเมตาโบไลต์ (metabolite) ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ เช่น IAA, ผลิตสารที่สามารถละลายธาตุฟอสฟอรัส เป็นต้น (Ashrafuzzaman et. al., 2009; Karnwal, 2009)

ดังนั้นงานวิจัยในปี 2554 ได้นำเชื้อ *Pseudomonas* sp. และไรโซแบคทีเรียบางชนิดที่แยกได้จากดินในพื้นที่เขตอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชที่เขื่อนจุฬาภรณ์ (เขื่อนน้ำพรม) จังหวัดชัยภูมิ 4 สายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) มาทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ diffusible compound, volatile compound และทดสอบการสร้างสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ อินโดล-3 อะซิติกแอซิด (indole-3 acetic acid: IAA), การละลายหินฟอสเฟต เป็นต้น

Diffusible compound และ volatile compound เช่น Hydrogen cyanide (HCN) เป็นสารเมตาโบไลต์ที่จุลินทรีย์หลายชนิดสร้างได้และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ มีรายงานว่า เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* Sha8 สามารถสร้างสาร volatile compound ลดการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporium* และ *Helminthosporium* sp. (Hassanein et. al., 2009)

อินโดล-3 อะซิติก แอซิด (IAA) คือ ฮอว์โมนพืช (phytohormone) ชนิดหนึ่งที่จุลินทรีย์ในดินสามารถสร้างได้ IAA กระตุ้นการงอกของเมล็ด (Slavov et al., 2003) กระตุ้นการแบ่งเซลล์ การยืดขยายขนาดและการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์และเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ IAA ยังมีบทบาทในการสร้างไซเลม (xylem) และรากของพืช (Bhalerao et al., 2002)

การละลายหินฟอสเฟต (phosphate solubilization)

หินฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัสราคาถูก แต่พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้เพราะหินฟอสเฟตเหล่านี้ละลายน้ำได้น้อยหรือไม่ละลายน้ำ มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ละลายหินฟอสเฟตได้สามารถนำฟอสฟอรัสมาใช้ประโยชน์ให้กับพืชได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านเกษตรอินทรีย์ได้อย่างยั่งยืน

ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถสร้าง diffusible compounds ยับยั้งการเจริญของเส้นใย *S. rolfsii* ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 63.26 - 82.81 โดยที่แบคทีเรีย *Pseudomonas* 4Z2B-4 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด และยังสามารถสร้าง volatile compounds ยับยั้งการเจริญของเส้นใย *S. rolfsii* ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 36.74 - 92.47 โดยที่แบคทีเรีย *Pseudomonas* 4Z2B-4 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด นอกจากนี้แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ยังสร้าง IAA และ สามารถละลายหินฟอสเฟตได้อีกด้วย ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่สามารถสร้างกรดซาลิ

ไซลิค งานทดลองสอดคล้องกับผลการวิจัยทั้งในห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองที่พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรครีซ *S. rolfsii* อยู่ระหว่าง 50-60 % และ 30-90 % ตามลำดับ (วรรณดีและคณะ, 2551, 2552) และงานทดลองนี้สอดคล้องกับงานทดลองของนักวิจัยหลายท่านที่รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* หลายชนิด และไรโซแบคทีเรีย สามารถสร้างสาร siderophore, diffusible compounds, volatile compound ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครีซ และสร้างฮอร์โมน IAA ส่งเสริมการเจริญของพืช (Freeman et al., 1975, Oberhänsli, et. al., 1991, Yasmin et, al., 2007)

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ (*Enterobacter cancerogenus* 2Z2E-7, *E. cancerogenus* Z4G-1, *Enterobacter* 2Z4E-2 และ *Pseudomonas* 4Z2B-4) มาทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลการทดลองสรุปว่า ทุกสายพันธุ์ของแบคทีเรียสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ diffusible compound, volatile compound, อินโดล-3 อะซิติก แอสิด และสามารถละลายหินฟอสเฟตได้ โดยพบว่า *Pseudomonas* 4Z2B-4 มีความสามารถในการสร้างสารดังกล่าวได้ดีที่สุด จากการทดลองมีข้อเสนอแนะดังต่อไปนี้

1. แบคทีเรีย *Pseudomonas* 4Z2B-4 มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุกชนิด (diffusible compound, volatile compound, อินโดล-3 อะซิติก แอสิด) และ ความสามารถละลายหินฟอสเฟต ได้สูงสุด ควรนำเชื้อสายพันธุ์นี้ไปทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ และควรศึกษาการสร้างทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ
2. เชื้อสายพันธุ์นี้ถูกนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครีซและลำต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* กับพืช (โดยเฉพาะกับมะเขือเทศเนื่องจากเป็นเชื้อที่แยกได้จากโรครากมะเขือเทศ) ในสภาพเรือนทดลองได้ผลสรุปว่าสามารถลดการเกิดโรคอยู่ระหว่าง 70 - 80% ทั้งนี้ขึ้นกับกรรมวิธีที่ใช้ทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ((diffusible compound, volatile compound) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *S. rolfsii* แต่จากการศึกษาพบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สร้างสารออกฤทธิ์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (IAA) และสามารถละลายหินฟอสเฟต) ได้เช่นกัน ซึ่งควรทดสอบการส่งเสริมการเจริญในสภาพเรือนทดลองและแปลงปลูกต่อไป
3. เมื่อศึกษาความสามารถของเชื้อ *Pseudomonas* 4Z2B-4 ทั้งการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครีซ และการส่งเสริมการเจริญของพืช ขั้นตอนต่อไปคือนำมาศึกษาการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อไปใช้ได้จริงในแปลงปลูก และสกัดทำบริสุทธิ์สารออกฤทธิ์ วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรบัส. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์โอ. เอส. พรินติง เฮาส์. กรุงเทพมหานคร.
- วรรณดี บัญญัติรัชต และ วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2551. การคัดเลือกเชื้อ *Pseudomonas* spp. จากดินที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชและการบ่งเ็กลักษณะ. รายงานฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วรรณดี บัญญัติรัชต และ วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2552. การคัดเลือกเชื้อ *Pseudomonas* spp. จากดินที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชและการบ่งเ็กลักษณะ. รายงานฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Ashrafuzzaman¹, M., F. Akhtar Hossen, M. Razi Ismail , Md. Anamul Hoque, M. Zahurul Islam, S.M. Shahidullah, and Sariah Meon. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth . African Journal of Biotechnology Vol. 8 (7): 1247-1252.
- Basha, S. and K. Ulagana than. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Cuvularia lunata*. Electronic J. Curr. Sci82: 1457-1462.
- Bhalerao, R., J. Eklof, K. Ljung, A. Marchant, M. J. Bennett, and G. Sandberg. 2002. Shoot derived auxin promotes early lateral root emergence in Arabidopsis seedlings. The Plant Journal, 29:325-332.
- Chaiharn, M., S. Chunhaleuchanon, A. Kozo, and S. Lumyong. 2008. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. KMITL Sci. Tech. J. : 8 (1)
- Freeman, L. R., P. Angelini, G. J. Silverman, ND C. Merritt, JR. 1975. Production of hydrogen cyanide by *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Microbiol 29 (4): 560-561.
- Garrrity, G. M. and J. G. Holt. 2001. The road map to the manual, pp 119-166. In D. R. Boone, R. W. Castenholz (eds), Bergey's manual of systematic bacteriology Volume 1, 2nd ed. Springer-Verlag.
- Hassanein W.A, N.M. Awany, A.A. El-Moughith, and S.H. Salah El-Dien. 2009. The antagonistic activities of some metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* Sha8. Journal of Applied Sciences Research 5 (Suppl 4): 404-414.
- Karnwal, A. 2009. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. J. of Plant Pathology , 91 (1): 61-63

- Kloepper J. M., R. Laverly and J. C. Lozano. 1986. Observation on the effect of inoculating cassava plants with *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 117: 17 – 25.
- Kumar, R.S., N. Ayyadurai, P. Pandiaraja, A.V. Reddy, Y. Venkateswarlu, O. Prakash, and N. Sakthivel. 2005. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *Journal of Applied Microbiology* 98: 145-154.
- Kumar, P. R. C. Dubey, D.K. Maheshwari. 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plants growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiol Res.*
- Larkin, R. P. and D. R. Fravel. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium Wilt of tomato. *Plant Disease* 82(9) : 1022-1028.
- Leong, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol plantpathogen. *Annual Review Phytopathology*. 24: 187-209.
- Loper, J. E. 1988. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* 78 : 166 – 172.
- Meyer, J. M., P. Azelvandre, and C. Georges. 1992. Iron metabolism in *Pseudomonas*: salicylic acid, a siderophore of *P. fluorescens* CHAO. *Electronic J. BioFactors*4: 23-27.
- Mew, T. W. and A. M. Rosales. 1986. Bacterization of rice plants for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 76 : 1260 – 1264.
- Montealegre, J. R., R. Reyes, L. M. Perez, R. Herrera, P. Silva, and X. Besoain, 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic J. Biotech.* 6: 115-127.
- Nagarajkumar, M., R. Bhaskaran and R. Velazhahan. 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiological Research* 159 : 73 – 81.
- Oberhänsli, T., G. Défago, and D. Haas. 1991. Indole – 3 – acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *J. of General Microbiology* 137, 2273-2279
- Pierson, L. S. III. And E. A. Pierson. 1996. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *Microbiology Letters* 136 : 101 – 108.

- Rakh, R. R., L. S. Raut, S. M. Dalvi, and A. V. Manwar. 2011. Biological control of *Sclerotium rolfsii*, causing stem rot of groundnut by *Pseudomonas cf. monteilii* 9. Recent Research in Science and Technology 3(3): 26-34.
- Ramesh Kumar, N., V. Thirumalai Arasu, and P. Gunasekaran. 2002. Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. Current Science 82 (12): 1463-1466.
- Raupach, G. S. and J. W. Kloepper, 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathology: 88 (11): 1158 – 1164.
- Scher, F.M. and R. Baker. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. Phytopathology 72 : 1567 – 1573.
- Sunish Kumr, R., N. Ayyadurai, P. Pandiaraja, A. V. Reddy, Y. Venkateswarlu, O. Prakash, and N. Sakthivel. 2005. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. J. of Applied Microbiology 98: 145-154.
- Thomashow, L. S., and D. M. Weller. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. J. Bacteriol. 170 : 3499 – 3508.
- Torres-Rubio, M. G., S. A. Valencia-Plata, J. Bernal-Castillo, and P. Martinez-Nieto. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 42:171-176.
- Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with Retrieved :July, 2009 from <http://www.sciencedirect.com/science>
- Yasmin, F., R. Othman, M. S. Saad, K. Sijam. 2007. Screening for beneficial properties of rhizobacteria isolated from sweetpotato rhizosphere. Biotechnology 6(1): 49-52

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15-20	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

มันฝรั่ง 200 กรัม หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มจนมันฝรั่งสุก (อย่าให้ละลาย) นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง ละลายผงวุ้นในน้ำ

กลั่นปริมาณ 500 มิลลิลิตร นำไปต้มจนผงวุ้นละลาย แล้วนำมาผสมกับน้ำต้มมันฝรั่ง เติมน้ำตาลกลูโคส ปรับปริมาณเป็น 1 ลิตร บรรจุใส่ภาชนะที่ต้องการ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15-20 นาที

Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมต่างๆลงในน้ำกลั่นปริมาณ 1000 มิลลิลิตร คนจนละลาย จากนั้นนำไปต้มจนแน่ใจว่าวุ้นละลายหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C นาน 15-20 นาที แล้วจึงเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

Double layered agar

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
CaCl ₂	0.1	กรัม
MgSO ₄	0.25	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
10% CaCl ₂	3	มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร
10% K ₂ HPO ₄	2	มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7 ด้วย 0.1N NaOH

1. ผสมส่วนผสมทั้งหมดในปิกรอร์ขนาด 1 ลิตร (ยังไม่ต้องเติมวุ้น (agar), 10 % CaCl₂ และ 10 % K₂HPO₄)
2. แบ่งอาหารออกเป็น 2 ส่วน (600 ,มิลลิลิตร และ 400 ,มิลลิลิตร) เติมวุ้น ในส่วนที่ 1 (600 ml) จำนวน 10 กรัม ส่วนที่ 2 (400 มิลลิลิตร) เติมวุ้นจำนวน 7 กรัมแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C นาน 15-20 นาที
3. เตรียม 10% CaCl₂ จำนวน 20 มิลลิลิตร และ 10% K₂HPO₄ จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที
4. นำส่วนที่ 1 ที่ฆ่าเชื้อแล้วเทในจานอาหาร ปล่อยให้แข็ง
5. นำส่วนที่ 2 ที่ฆ่าเชื้อแล้วเติม 10% CaCl₂ จำนวน 12 มิลลิลิตร และ 10 % K₂HPO₄ จำนวน 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเททับลงบนอาหารส่วนที่ 1 ที่แข็งแล้ว (จะได้อาหารที่มีลักษณะขุ่น)
6. ใช้ loop และเชื้อที่ต้องการทดสอบวางลงบนอาหาร Double layer agar
7. ตรวจสอบผลโดยการสังเกต clear zone ที่เกิดขึ้นและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone

Luria Bertani (LB) agar

Tryptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำ (agar) ต้มให้วุ้นละลาย นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15-20 นาที เทใส่จานอาหารที่ฆ่าเชื้อ

King's B broth / King's B agar

Proteose peptone	20	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.5	กรัม
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.5	กรัม
Glycerol	10	มิลลิลิตร
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลาย proteose peptone กับน้ำกลั่น ใส่สารเคมีคนให้ละลาย นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15-20 นาที (ถ้าเป็น King's B agar เติมน้ำ 15 กรัมต้มให้ละลายก่อนนำไปฆ่าเชื้อ และ เทใส่จานอาหารที่ฆ่าเชื้อ

ประวัติและผลงานนักวิจัย

2.1. ข้อมูลส่วนตัว

ชื่อ-นามสกุล:(ภาษาไทย)

นางวรรณดี บุญญศิริชต

(ภาษาอังกฤษ)

Mrs. Wandee Bunyatrachata

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน: 3-1016-00078-24-2

ตำแหน่งปัจจุบัน:

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

ที่ทำงาน: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

โทรศัพท์: 043 – 202377 โทรศัพท์ 043 – 202377 E – mail address:

wanbun@kku.ac.th

2.2 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2524	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2533	ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.)	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2549	ปริญญาเอก	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต	โรคพืชวิทยา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

2.3 สาขาวิชาการที่ชำนาญ

จุลชีววิทยาทั่วไป, จุลชีววิทยาทางการแพทย์, การควบคุมทางชีวภาพ

2.4 ผลงานวิจัยที่พิมพ์ออกเผยแพร่ (บางส่วน)

Research Journal Publications

- Sudmoon, R., S., N. Sattayasai, **W. Bunyatratchata**, A. Chaveerach, and S. Nuchadomrong. 2008. Thermostable mannose-binding lectin from *Dendrobium findleyanum* with activities dependent on sulfhydryl content. *Acta Biochim Biophys Sin* 40: 811-818.
- Preecharam, S., S. Daduang, **W. Bunyatratchata**, T. Araki and S. Thammasirirak. 2008. Antibacterial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. *African Journal of Biotechnology* (in press)
- Thongtumma, S., S. Chanthai, **W. Bunyatratchata**, and C. Ruangviriyachai. 2007. A study on an influence of some factors affecting on pyocyanin. *Journal of Science Khon Kaen University* 35 (2): 123-133
- Hongthani, W., S. Chanthai, **W. Bunyatratchata** and C. Ruangviriyachai. 2007. Production and analysis of antibiotic phenazine from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Science Khon Kaen University* 35 (1):49-59
- Thongtumma, S., P. Tansupo, **W. Bunyatratchata**, S. Chanthai and C. Ruangviriyachai. 2007. Capability in inhibition some bacterial growth using phenazine-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Naresuan Agriculture Journal* 10(1): 41-50.
- Saosoong, K., S. Tongtumma, S. Chanthai, W. Wongphathanakul, **W. Bunyatratchata** and C. Ruangviriyachai. 2007. Isolation and study of chemical properties of pyocyanin produced from *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027). *KKU Res. J.* 12(1): 24-32.
- Uawonggul, N., S. Thammasirirak, A. Chaveerach, T. Arkaravichien, **W. Bunyatratchata**, W. Ruangjirachuporn, P. Jearanaiprepame, T. Nakamura, M. Matsuda, M. Kobayashi, S. Hattori and S. Daduang. 2007. Purification and characterization of Heteroscorpine – 1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon*. 49(1): 19-29.
- Bunyatratchata, W.**, W. Saksirirat. P. Sirithorn and P. Teerakulpisut. 2006. Genetic characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* as determined by ARDRA and RAPD analysis. *Khon Kaen Agriculture Journal*. 34 (3): 173-184.
- Bunyatratchata, W.**, W. Saksirirat. P. Sirithorn and P. Teerakulpisut. 2005. Race Identification of *Fusarium* wilt Pathogen of Tomato, *Fusarium oxysporum* f. sp.

lycopersici by pathogenic reaction on standard differential host and development of Thai differential host. *Khon Kaen Agriculture Journal* 33(2): 95 – 107.

Bunyatratchata, W., S. Thaboran, T. Somdee and K. Kong-ngohn. 2002. Detection of some bacteria in cooked foods in Khon Kaen University Campus. *KKU Res. J.* 7(1) : 38-50

Abstracts and Presentations

Tongcharoen, C., W. Saksirirat, A. Wongcharoen, and **W. Bunyatratchata**. 2008. Biological control of rhizosphere bacteria against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in *Vitro*. 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. Mahasarakham University. (in Thailand).

Charirak, P., W. Saksirirat and **W. Bunyatratchata**. 2008. Degrading enzyme activities of chitinase and B-1,3-glucanase in tomato leaf induced by *Trichoderma* spp. 10th Graduate Research Conference. Khon Kaen University (in Thailand)

Ruangviriyachai, C., S. Chanthai and **W. Bunyatratchata**. 2005. Phenazines Bioactive Compound from *Pseudomonas* spp. in Thailand. Proceedings the International conference on TSB annuals meeting: Innovative Biotechnology ; The Era of Bionanotechnology. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

Uawonggul, N., A. Chaveerach, S. Thammasirirak, T. Arkaravichien, **W. Bunyatratchata**, W. Ruangjirachuporn, P. Jearanaiprepame and S. Daduang. 2005. Investigation of Anti – microorganism Activity of Heteroscorpine – 1 (HS – 1), Neurotoxin from *Heterometrus laoticus* Thai Scorpion Venom. 2nd Yamada Symposium on Key Natural Organic Molecules in Biological Systems. Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan.

Saosoong, K., S. Tongtumma, S. Chanthai, W. Wongphathanakul, **W. Bunyatratchata** and C. Ruangviriyachai. 2005. Production and Analysis of Pyocyanin from *Pseudomonas* sp. 31st Congress on Science and Technology of Thailand.

Hongthani, W., C. Ruangviriyachai, S. Chanthai and **W. Bunyatratchata**. 2005. Production and Analysis of Bacterial phenazines. 4th Perch congress (in Thailand.)

Bunyatratchata, W., W. Saksirirat. P. Sirithorn and P. Teerakulpisut. 2003. Race identification of *Fusarium* wilt pathogen of tomato, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* by pathogenic reaction on standard differential host and development of Thai differential host. 6th National Plant Protection Conference (in Thailand).

Bunyatratchata, W., W. Saksirirat. P. Sirithorn and P. Teerakulpisut. 2003. Survey and race identification of Fusarium wilt pathogen of tomato, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* . KKU Annual Agricultural Seminar (in Thailand).