บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง
(Conclusion and Discussion)

ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีนระดับชุมชนจำนวน 2 แหล่ง คือ โรงงานทำขนมจีนในพื้นที่ตำบลแก่งละว้า อำเภอชนบท จังหวัดขอนแก่น และโรงงานทำขนมจีนในพื้นที่บ้านหนองกุง ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น โดยคาดว่าจะมีแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.lycopersici (Fol) ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 250 isolates จากการทดสอบด้วยวิธี well diffusion technique พบว่ามีเพียง 11 isolates ที่สามารถแสดงกิจกรรมต้านการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.lycopersici ในจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้ง 11 isolates มีเพียง 3 isolates ที่แสดงออกฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้สูงโดยได้นำค่า Percentage Fungal Inhibition เป็นปัจจัยสำคัญในการเทียบค่าความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชเศรษฐกิจ คือ แบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 isolates โดยพบว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งได้มาจาก culture supernatant และเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีที่สภาวะอุณหภูมิ 35^{o}C มีอายุการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง ซึ่งจะแสดงความสามารถการยับยั้งเชื้อราด้วยค่า Percentage Fungal Inhibition อยู่ที่ค่า 58%, 60% และ 61% สำหรับแบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ตามลำดับ

เนื่องจากกลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อราอาจเป็นกลไกคล้ายการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะ โดยปกติแล้วเชื้อจุลินทรีย์จะสร้างสารปฏิชีวนะก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญโดยจะเริ่มสร้างในช่วง late log phase เรื่อยไปจนถึงช่วง stationary phase แม้ในการทดลองไม่ได้มีวัดการเจริญควบคู่ไปด้วย แต่ผลการทดลองพบว่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition Zone ของเชื้อที่อายุการเลี้ยงเชื้อที่ 72 ชั่วโมง มีแนวโน้มสูงมากที่จะอยู่ในช่วงในช่วง late log phase โดยที่จะเข้าสู่ช่วง stationary phase ซึ่งจะแตกต่างจากที่ 24 ชั่วโมงอย่างเห็นได้ชัด เพราะที่ช่วงเวลา 24 ชั่วโมง จะไม่เห็น clear zone ซึ่งแสดงว่าช่วง 72 ชั่วโมง น่าจะเป็นช่วงใกล้เข้าสู่ stationary phase มากที่สุด ซึ่งน่าจะเป็นสารในกลุ่ม secondary metabolites ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่าสารกลุ่มดังกล่าวเป็นสาร antimicrobial substance จากหลายรายงานก่อนหน้านี้ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาคุณลักษณะของสารต้านเชื้อราที่เชื้อแบคทีเรีย

ผลิตออกมา ส่วนใหญ่มักเป็นสารองค์ประกอบในกลุ่มโปรตีน และการศึกษาครั้งนี้ยังพบอีกว่าประสิทธิภาพการยับยั้งของสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราดังกล่าวจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและยังคงทนได้ถึงระดับสูงสุดที่ 70^{0}C เป็นเวลา 30 นาที และเมื่อทดสอบความคงทนสารต้านเชื้อราที่ระดับ pH ต่างๆ พบว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรายังคงประสิทธิภาพที่ระดับ pH ในช่วง 5-8 (data not shown) จะเห็นได้ว่า เมื่ออุณหภิสูงขึ้นหรือสภาะความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงไปมากกว่านี้ ได้ส่งผลทำให้สารยับยั้งการเจริญของเชื้อราเสียสภาพทางธรรมชาติ (denature) จนไม่สามารถแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งได้อีก ดังนั้นสารต้านเชื้อราที่เชื้อแบคทีเรียแต่ละ isolate ผลิตออกมานี้ จึงสันนิฐานว่าคุณลักษณะเบื้องต้นของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ว่าน่าจะมีองค์ประกอบเป็นโปรตีน เพื่อเป็นการยืนยันว่าองค์ประกอบเป็นโปรตีนในการศึกษาครั้งต่อไป ควรจะสกัดสารยับยั้งชนิดนี้ให้ได้สารละลายโปรตีนให้บริสุทธิ์ เพื่อให้มีการทดสอบการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ proteases ชนิดต่าง เป็นการยืนยันการมีคุณสมบัติขององค์ประกอบที่เป็นโปรตีน และหาก ในขั้นตอนนี้จึงไม่สามารถยืนยันคุณสมบัติของสารต้านเชื้อราแน่นอน ซึ่งยังจะต้องมีขั้นตอนการทำสารต้านเชื้อราให้บริสุทธิ์เพื่อการศึกษาโครงสร้างของสารและคุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพให้แน่ชัดเสียก่อน จึงจะนำไปทดลองใช้ในแปลงเพาะปลูกจริง

นอกจากนี้สารต้านเชื้อราที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย isolate WWPB 76 (*Bacillus subtilis*) ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เชื้อก่อโรคในต้นพริกได้ ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าในธรรมชาตินั้นสิ่งมีชีวิตต่างก็มีกลไกการแข่งขันเพื่อการอยู่รอด มีการสร้างสารออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่นเพื่อการเจริญเติบโตของตน และกลไกนี้เองที่สามารถประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ในการควบคุมการเกิดโรคโดยชีววิธี แต่ประสิทธิภาพของสารที่สิ่งมีชีวิตผลิตออกมานี้จะคงออกฤทธิ์อยู่ในธรรมชาติได้นานหรือไม่นั้น ขึ้นกับปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ pH องค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมีของสาร ดังนั้นจึงควรศึกษาคุณลักษณะทางเคมีและทางกายภาพของสาร ความเป็นพิษต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม ตลอดจนรูปแบบการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อไม่ให้เกิดผลกระทบตามมาภายหลัง อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังศึกษาอยู่ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น การจะนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง ต้องทำการศึกษาในระดับเรือนทดลองและแปลงปลูกจริงเสียก่อน การวิจัยนี้จึงเป็นขั้นตอนเริ่มต้นเพิ่มเป็นแนวทางในการศึกษาและปรับประยุกต์ได้จริงต่อไป

ในด้านของการนำเชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 76 ไปประยุกต์ใช้ในด้านการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานขนมจีนระดับชุมชน ผลการตรวจวิเคราะห์ค่า Chemical Oxygen Demand (COD) ของน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีนระดับชุมชน หลังการเพาะเลี้ยงเชื้อพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (≈27-29^{0}C) เป็นเวลา 7 วัน ผลการบำบัดยังไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ เพราะปรากฏว่ามี

ความสามารถลดค่า COD ได้เพียง 68 เปอร์เซ็น นั่นหมายความว่ายังมีค่า COD ปรากฏอีกถึง 10,176 mg/L เมื่อเทียบกับค่า COD ของน้ำเสียมาตรฐานระดับอุตสาหกรรม ซึ่งระบุว่ามีค่า COD สูงสุดต้องไม่เกิน 400 mg/L นั่นหมายความว่าเมื่อใช้แบคทีเรีย isolate WWPB 76 (*Bacillus subtilis*) เพื่อการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตขนมจีน ยังไม่สามารถลดค่า COD ให้อยู่ต่ำกว่าหรือเท่ากับ ค่าของ COD มาตรฐานที่ทางกองควบคุมมลพิษทางน้ำกำหนดไว้ อาจอธิบายได้ว่าระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพื่อการบำบัดเป็นระยะเวลาสั้นไป หรืออีกเหตุหนึ่งก็คือ ในน้ำเสียมี carbon load ในรูปของเนื้อแป้งสูงมาก จนระบบบำบัดแบบชีวภาพ ไม่สามารถย่อยสลายในเวลาที่ทำการทดลอง ในกรณีนี้ จึงต้องการศึกษาต่อไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสีย อาจต้องใช้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มอื่นเข้าร่วม

การศึกษาทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี และการหาค่า % similarity พบว่าเชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 76 เป็นแบคทีเรีย Gram positive มีการสร้าง endospore ภายในเซลล์ การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีและการคำนวณทาง % similarity เมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีค่า % similarity เท่ากับ 91% ผลการทดลองนี้สามารถคาดได้ว่า เชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 76 น่าจะถูกจัดให้อยู่ในสกุล (Genus) *Bacillus* และ specific epithet เป็น *subtilis* เพื่อความแน่นอนในจัดวางเชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 76 ในสกุล *Bacillus* มีความจำเป็นต้องศึกษาต่อทางด้านอณูพันธุศาสตร์ด้วยการหาลำดับเบสของ 16S rDNA ในลำดับต่อไป

การศึกษาวิจัยเพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในต้นกล้ามะเขือเทศครั้งนี้ 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 ถือได้ว่าเป็นครั้งแรกที่ได้คัดแยกเชื้อจากน้ำเสียโรงงานผลิตขนมจีนระดับชุมชน ในขณะเดียวกัน ผู้วิจัยกลุ่มอื่นจะคัดแยกเชื้อแบคทีเรียออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคจากดินในไร่เพาะปลูกมะเขือเทศ

ปัจจุบัน เชื้อราก่อโรคพืชที่มีต้นเหตุมาจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ก่อให้เกิดความเสียหายสำหรับพืชไร่มากมาย ถ้ามองดูทั้งประเทศมีพื้นที่การระบาดถึงประมาณ 1.07 ล้านไร่ คิดเป็นมูลค่าของผลผลิตที่เสียหายไม่ต่ำกว่า 300 – 500 ล้านบาทต่อปี (ชนวน, 2542) ซึ่งมาในรูปของโรคเหี่ยวที่เรียกว่าฟิวซาเรียมวิลท์ (Fusarium wilt) โรคเน่าคอดินของกล้าพืช (Damping off of seedlings) (สุนทรี, 2525) ผลลัพธ์ของการมุ่งใช้สารเคมีกำจัดสัตรูพืชและปุ๋ยเคมีจำนวนมากก่อให้เกิดสารพิษตกค้างจำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็นสารกำจัดศัตรูพืชพวก

สารประกอบออแกนโนฟอสฟอรัส (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 การควบคุมศัตรูพืชด้วยชีววิธี ไม่ว่าจะเป็นการควบคุมแมลงศัตรูพืช หรือเชื้อราก่อโรคพืช จึงเป็นทางเลือกกลยุทธการใช้ที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมที่ยั่งยืน (Cook, 1993; Jacobsen and Backman, 1993)

นอกจากการศึกษานี้ที่คัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มาเพื่อใช้ในการต้านการระบาดของเชื้อราก่อโรคแล้ว ยังพบว่ามีรายงานการนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มาใช้ในการควบคุมโรคพืชที่มีต้นเหตุจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ได้แก่การนำเชื้อ *B .subtilis* สายพันธุ์ CH4 ใช้ควบคุมโรคเน่าของมันฝรั่ง ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* sub sp. Carotovora. (ปริญญา และคณะ, 2533) การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น *B. subtilis* มาใช้ควบคุมโรครากเน่าโคนเน่า 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 ของถั่วลิสงได้

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 ปริมาตรส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่นำมา

ทดสอบเพื่อยับยั้งการเจริญของ 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