สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 5
อภิปรายผล

1. จากการเก็บตัวอย่างต้นกล้าของเมลอน แตงกวา สควอซ พริก มะเขือเทศ และข้าวโพด ที่ได้ระหว่างการตรวจหาเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์จากแหล่งต่างๆ ที่สาขาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเทคนิค botter test หรือ grow out สำรวจเพิ่มเติมจากการเก็บตัวอย่างใบและผลของน้ำเต้าและแตงโมจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกในเขตจังหวัดขอนแก่น, เก็บตัวอย่างโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและตัวอย่างดินรอบรากพืช/ดินผสมวัสดุเพาะจากแปลงปรับปรุงพันธุ์เพื่อเกษตรยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* จำนวน 89 ไอโซเลต หลังจากแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak plate เมื่อนำมาศึกษาโดยอาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา, พบว่า ได้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สร้าง pigments สีน้ำตาล เมื่อเลี้ยงบนอาหาร NA มีจำนวนมากถึง 66 ไอโซเลต ลักษณะโคโลนีคล้าย รูปตา มีกลิ่นเหม็นเฉพาะตัว รองลงมาคือกลุ่มที่ไม่สร้าง pigments จำนวน 19 ไอโซเลต ลักษณะโคโลนีหลากหลายทั้งลักษณะกลมและคล้ายรูปตา และ จำนวน 4 ไอโซเลต สร้าง pigments สีเขียวปนน้ำเงิน ลักษณะโคโลนีกลม มีกลิ่นเหม็นเฉพาะตัว ทุกไอโซเลตสามารถตรวจพบการเรืองแสงเมื่อตรวจดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 395 นาโนเมตร

2. การจำแนกระบุชนิดโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี, รูปแบบโปรตีนจากเซลล์ทั้งหมด, การตรวจสอบความสัมพันธุ์ทางซีรัมวิทยากับแอนติซีรัม *P. aeruginosa* AR-TS003 พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่รวบรวมได้นั้นเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สร้าง pigments และให้ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (LOPAT), รูปแบบโปรตีนจากเซลล์ทั้งหมด, การตรวจสอบความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับแอนติซีรัม *P. aeruginosa* AR-TS003 ที่สอดคล้องกันในระดับที่น่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกัน และมีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาสูง กับแอนติซีรัม *P. aeruginosa* AR-TS003 ซึ่งการทดสอบคุณสมบัติ LOPAT นั้น เป็นอีกหนึ่งการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญในการนำมาใช้ในการจัดกลุ่มหรือจำแนกเพื่อระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* แต่หากเป็นกลุ่มเชื้อที่ใกล้ชิดกันมากๆ รูปแบบ LOPAT ที่ได้อาจเหมือนกัน ไม่สามารถจัดกลุ่มหรือจำแนกระบุชนิดได้ จึงทำให้บางครั้งต้องใช้คุณสมบัติอื่นร่วมด้วย เช่น การตรวจดูรูปแบบโปรตีนจากเซลล์ ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากหลักการที่ว่า เชื้อชนิดเดียวกันควรจะมีรูปแบบโปรตีนที่เหมือนกัน และเชื้อที่ต่างชนิดกันก็ควรจะมีรูปแบบโปรตีนที่แตกต่างกันออกไป สำหรับเทคนิคนี้หากเป็นไปได้ควรจะมีเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย (reference strain) มาศึกษาเปรียบเทียบด้วย

3. การจำแนกด้วยการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด โดยระบบกึ่งอัตโนมัติ Biolog™ มีจุดเด่น คือ ทำการทดสอบได้ง่าย ให้ผลที่รวดเร็ว และสามารถระบุได้ถึงระดับชนิดหรือสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย แต่ยังมีจุดด้อยในเรื่องค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูงสำหรับการทดสอบ อีกทั้งการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชยังไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้สูงสุด เนื่องจากมีฐานข้อมูลที่จำกัด ดังนั้น การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่อาศัยข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด โดยระบบกึ่งอัตโนมัติ Biolog™ เพียงอย่างเดียว อาจจะยังไม่เพียงพอ จำเป็นต้องใช้ข้อมูลคุณสมบัติอื่นๆ มาประกอบการพิจารณาด้วย เช่น การจำแนกโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rRNA gene มาช่วยเสริมในการจัดจำแนก เช่น จากการศึกษาของ Ying Chang et al. (2007) ที่นำเอาข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด โดยระบบกึ่งอัตโนมัติ Biolog™ และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rRNA gene มาใช้ในการประเมินความหลากหลายของประชากรเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากข้าวโพด และการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR (ไพรเมอร์ BOXAIR) มีประสิทธิภาพสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียในระดับชนิดและสายพันธุ์ (Schneider and Bruijn, 1996; Marques et al., 2008) เช่น การศึกษาของ Cottyn et al. (2001) จำแนกความแตกต่างของประชากรเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบในเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยเทคนิค rep-PCR (โดยใช้ไพรเมอร์ BOXAIR)

4. คุณภาพของโพลีโคลนอลแอนติซีรัมที่ผลิตได้ มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอื่นๆ หรือเกิดได้เล็กน้อยกับเชื้อบางชนิด แต่ไม่มีผลกระทบต่อการอ่านผลการทดสอบ ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาข้ามอย่างนี้เป็นเหตุการณ์ปกติสำหรับโพลีโคลนอลแอนติซีรัม เนื่องจากเชื้อที่นำมาผลิตโพลีโคลนอลแอนติซีรัม อาจมีส่วนของโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน จึงทำให้แอนติซีรัมที่ได้นั้นสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามได้ (Aysan et al., 2004) และมีความไวในการตรวจหาเชื้อเป้าหมายดีเพียงพอสำหรับใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาเชื้อเป้าหมายในกลุ่ม *P. aeruginosa* สามารถทดแทนแอนติซีรัมที่นำเข้าจากต่างประเทศได้

การจัดจำแนกเชื้อโดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคต่างๆ ทั้งหมดในการทำวิจัยครั้งนี้ พบว่า การใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยังไม่น่าจะเพียงพอและน่าเชื่อถือสำหรับการจัดจำแนกเพื่อระบุชนิดแบคทีเรีย จะเห็นได้จากไอโซเลต PeFS009 ที่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้ชิดกับ *B. cepacia* 95% แต่เชื้อในไอโซเลตนี้สร้าง fluorescent pigment ในขณะที่ *B. cepacia* ไม่สร้าง ดังนั้น จึงจำเป็นต้องใช้คุณสมบัติพื้นฐานทางชีววิทยาเข้ามาพิจารณาด้วย ส่วนการตรวจดูลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep-PCR อาจจะไม่จำเป็นสำหรับการจำแนกระบุชนิด แต่เหมาะสมสำหรับการใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ในกรณีที่เป็นเชื้อชนิดใหม่ การจำแนกระบุชนิดโดยอาศัยคุณสมบัติด้านอื่นๆ ยังมีความจำเป็น ดังนั้น การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียแบบผสมผสานก็เป็น

แนวทางที่เหมาะสมและจำเป็นในการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* เพราะเป็นการนำข้อมูลในหลายๆ ส่วนเข้ามาร่วมในการพิจารณา ทำให้ลดความผิดพลาดจากการจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่า ส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม fluorescent *Pseudomonas* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริก มะเขือเทศ แตง จากแหล่งต่างๆ จำแนกเป็น *P. aeruginosa* ไม่ใช่ *P. syringae* pv. *lachrymans* (Woltman et al., 2007) หรือ *P. syringae* pv. *tomato* (Fanelli et al. 2007) นอกเหนือจากที่มีรายงานครั้งแรกในประเทศจีน (Hao and Xie, 2006) พบโรค internal brown rot ในหอมหัวใหญ่ ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* เช่นเดียวกันรายงานครั้งแรกที่พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* เป็นสาเหตุที่ทำให้ต้นกล้ายาสูบแสดงอาการโรคใบจุดในประเทศจีน (Yu et al., 2008) จากการวิจัยครั้งนี้ อาจบ่งชี้ได้ว่า เชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* นั้นมีพืชอาศัยที่กว้างมาก

ในทางการแพทย์ *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในดินและน้ำ และที่พบเป็นประจำถิ่นของทางเดินอาหารของคนปกติประมาณ 10% และพบตามบริเวณผิวหนังที่ชุ่มชื้นของคน เช่น รักแร้ ขาหนีบ และในน้ำลาย เนื่องจากเชื้อมีความต้องการสารอาหารแบบง่ายๆ รวมทั้งสามารถใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งของไนโตรเจน และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในรูปต่างๆ กัน ทำให้เชื้อสามารถเจริญและแบ่งตัวได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่ชุ่มชื้น แม้แต่ในที่ซึ่งมีสารอินทรีย์ปริมาณน้อยๆ เช่น ยาหยอดตา, น้ำยาฆ่าเชื้อบางชนิด, สบู่, เครื่องช่วยหายใจ, อ่างล้างมือ และแม้แต่ในถังที่เก็บน้ำกลั่น ในห้องปฏิบัติการเชื้อ *P. aeruginosa* สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วๆ ไป สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30-42 ^{0}ซ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 35 ^{0}ซ สามารถทนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นด่างสูง สายพันธุ์ที่มาจากสิ่งส่งตรวจมักจะสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) บน blood agar ส่วนมากเชื้อจะให้รงควัตถุ (pigment) สีเขียวแกมน้ำเงิน เรียกว่า pyocyanin เป็นพวก phenazine pigment และบางชนิดให้รงควัตถุสีเหลืองแกมเขียวและเรืองแสง (fluorescence) ที่เรียกว่า pyoverdin รงควัตถุดังกล่าวจะกระจายในอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆ โคโลนี รงควัตถุดังกล่าวละลายน้ำและคลอโรฟอร์มได้ (Meyer et al., 1997; Meyer, 2000) อย่างไรก็ตาม ยังมีประมาณ 10% ของ *P. aeruginosa* ที่ไม่สร้างรงควัตถุ สายพันธุ์ที่มีแคปซูล (encapsulated) และเป็นเมือก (mucoid) มีคุณสมบัติคล้ายกับเชื้อ *Klebsiella* คือพบได้ในเสมหะของผู้ป่วยที่เป็นโรคหลอดลมอักเสบเรื้อรัง และโรค cystic fibrosis ตัวอย่างเช่นรายงานของ Syrmis et al. (2004) ที่ใช้เทคนิค rep-PCR มาใช้ในการศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่แยกเชื้อได้จากคนไข้ที่เป็นโรค cystic fibrosis นอกจากเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่เป็นสาเหตุโรคพืช (plant pathogenic) และโรคในคนและสัตว์ (human and animal pathogenic) ยังมี *Pseudomonas* spp. ที่นำมาใช้เป็น biocontrol

agent ดังตัวอย่างรายงานของ Paez et al. (2005) ที่นำเอาเชื้อ *P. aeruginosa*, *P. putida* biovar B, *P. marginalis* และ *Burkholderia cepacia* มาใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Botrytis cinerea*

จากข้อมูลที่มีรายงานยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่า เชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่เป็นสาเหตุโรคพืช และสาเหตุโรคในคนและสัตว์ นั้น เป็น type เดียวกันหรือไม่ จำเป็นต้องศึกษาและส่งไปตรวจสอบเปรียบเทียบต่อไป อย่างไรก็ตาม ข้อมูลจากการวิจัยครั้งนี้สามารถที่นำไปใช้ประโยชน์ในให้คำแนะนำแก่เกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตง รวมไปถึงพริกและมะเขือเทศ ที่จะต้องเฝ้าระวังและป้องกันเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ ในการปลูกจึงควรต้องคำนึงคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่จะซื้อมาปลูกด้วย ควรศึกษาแหล่งที่มาของเมล็ดพันธุ์ด้วยว่าน่าเชื่อถือหรือไม่ ก่อนที่จะนำมาปลูกควรมีการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดก่อนปลูกหรืออาจคลุกเมล็ดพันธุ์ด้วยสารเคมีประเภทดูดซึมที่แนะนำสำหรับควบคุมแบคทีเรียเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดอยู่ภายในเมล็ด และหากเพาะเมล็ดแล้วพบว่าต้นกล้าแสดงอาการเป็นโรคใบจุดต้องรีบถอนทำลายเพื่อไม่ให้เป็นแหล่งของเชื้อต่อไป และพ่นสารเคมีควบคุมโรคจากแบคทีเรียบนต้นกล้าที่เหลือ และดูแลเป็นโปรแกรมการพ่นสารเคมีควบคุมโรคในแปลงปลูกตลอดการเพาะปลูกพืชดังกล่าว