

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การรวบรวมจุลินทรีย์ที่ผลิตโคตินีนและทนอุณหภูมิสูง

จากการรวบรวมจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารโคตินีน แบ่งเป็นการแยกโดยตรงซึ่งแยกจากตัวอย่างดินและจากตัวอย่างอาหาร การแยกโดยใช้หย่อซึ่งใช้เปลือกกุ้ง กระดองปู นำไปฝังดิน และการแยกโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์จาก MSCMU พบว่ามีเชื้อราที่สามารถเจริญได้บนอาหารโคตินีนจำนวน 224 ไอโซเลท และแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บนอาหารโคตินีนจำนวน 18 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 20°C, 30°C, 37°C, 45°C และ 55°C พบว่ามีเชื้อราจำนวน 29 ไอโซเลท และแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 20°C และ 55°C โดยจุลินทรีย์ที่เจริญได้บนอาหารโคตินีนและเป็นจุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูงแยกได้เป็นเชื้อราจากหน่วยเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ (MSCMU) ไอโซเลท BB4, CH18, CH21, CT9, CT12, CT22, IFO31897, IFO8436, P28, MST91, T1, T2, T3, T4, T5, T58, T62, 13, 22 ทรงยศ, 30, 82, 83, 93 และ ปอย ส่วนเชื้อราที่ปนเปื้อนบนอาหารโคตินีนและทนอุณหภูมิสูงมีไอโซเลท E₂F, Ex1, Ex5 และ F1 ส่วนแบคทีเรียมาจาก MSCMU ไอโซเลท B1, B6, CON6, CON7, CON10, D1, H2, H11, M1 และ M2

2. ผลการทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์บางชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในลำไย

2.1 การทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์

จากผลการทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ระหว่างเชื้อราที่เจริญได้บนอาหารโคตินีนและทนอุณหภูมิสูงจำนวน 29 ไอโซเลทกับราก่อโรคในลำไย 3 ชนิด ได้แก่ *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. โดยการวางชิ้นไม้ที่มีเส้นใยอายุ 5 วัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm ลงบนอาหาร PDA ที่มีการ swab เชื้อราก่อโรค พบว่ามีเชื้อรา 11 ไอโซเลทที่แสดงการเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับ *Cladosporium* sp. 4 ไอโซเลทเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับ *Fusarium* sp. และ 12 ไอโซเลทเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับ *Lasiodiplodia* sp. โดยไอโซเลทที่ยับยั้งราก่อโรคได้ทั้ง 3 ชนิด มี 3 ไอโซเลท คือ CT12, MST91 และ T58 โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของไอโซเลท CT12 ที่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อ *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ได้เป็น 14.7, 11.8 และ 11.8 mm ตามลำดับ

ส่วน MST91 วัดได้ 18.8, 8.17 และ 20.7 mm ตามลำดับ และ T58 วัดได้ 11.7, 13.7 และ 19.4 mm ตามลำดับ แต่ไอโซเลทที่ยับยั้ง *Cladosporium* sp. ได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลท 83 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อได้ 21.0 mm ไอโซเลทที่ให้ผลยับยั้ง *Fusarium* sp. ดีที่สุด คือ ไอโซเลท T58 โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 13.7 mm และ ไอโซเลท CT9 ยับยั้ง *Lasiodiplodia* sp. ได้ดีที่สุด วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 23.9 mm (ตาราง 5 และรูป 3)

ตาราง 5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราที่เจริญได้เมื่อทดสอบกับเชื้อทดสอบ 3 ชนิด โดย dual culture method

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อที่เจริญได้ (mm)		
	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
T1	8.1	-	18.8
T2	20.5	-	23.7
T3	17.6	-	20.2
CT9	15.3	-	23.92
CH21	16.6	-	20.75
83	21.0	-	22.4
CT12	14.7	11.8	14.8
F1	-	10.2	16.5
ปอย	12.7	-	12.7
MST91	18.8	8.17	20.7
T58	11.7	13.7	19.4
BB4	16.4	-	18.8

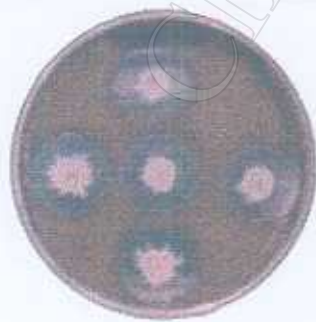


รูป 3 ผลการทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ระหว่างไอโซเลท CT9 กับเชื้อทดสอบ *Lasiodiplodia* sp.

จากผลการทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ระหว่างแบคทีเรียที่เจริญได้บนอาหารโคคินและ
 ทนอุณหภูมิสูงจำนวน 11 ไอโซเลทกับราก่อโรคในลำไย 3 ชนิด ได้แก่ *Cladosporium* sp.,
Fusarium sp. และ *Lasiodiplodia* sp. โดยการสกัดโคโคนี้ด้วยของแบคทีเรียด้วยไม้จิ้มฟัน
 ฆ่าเชื้อ ลงบนอาหาร PDA ที่มีการ swab เชื้อราก่อโรค พบว่ามีแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทที่เป็นเชื้อ
 ปฏิปักษ์กับ *Cladosporium* sp. 2 ไอโซเลทเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับ *Fusarium* sp. และ 7 ไอโซเลทที่เป็น
 เชื้อปฏิปักษ์กับ *Lasiodiplodia* sp. โดยไอโซเลทที่ให้ผลยับยั้งราก่อโรคทั้ง 3 ชนิด คือ ไอโซเลท
 B6 และ H11 ซึ่งไอโซเลท B6 ให้ผลยับยั้งต่อ *Cladosporium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ได้ดีที่สุด
 วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เชื้อสร้างขึ้นได้ 21.8 และ 21.5 mm ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท H11
 ยับยั้ง *Fusarium* sp. ได้ดีที่สุด โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เชื้อสร้างขึ้นได้ 22.3 mm (ตาราง
 6 และรูป 4)

ตาราง 6 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสของแบคทีเรียที่เจริญได้เมื่อทดสอบกับเชื้อทดสอบ 3 ชนิด
 โดย dual culture method

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสของแบคทีเรียที่เจริญได้ (mm)		
	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
B5	10.5	-	15.0
B6	21.8	11.4	21.5
D1	11.5	-	14.5
H11	17.3	22.3	21.0
M1	7.3	-	10.5
CON6	-	-	11.3
CON10	-	-	15.0



a



b

รูป 4 ผลทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (a) ไอโซเลท B6 กับ *Cladosporium* sp. (b) ไอโซเลท H11 กับ
Fusarium sp.

2.2 การทดสอบความสามารถของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในลำไย โดยวิธี cylinder plate method

จากการทดสอบความสามารถของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในลำไยโดยวิธี cylinder plate method พบว่ามีน้ำกรองของเชื้อราไอโซเลท CT12 เพียงไอโซเลทเดียวเท่านั้นที่ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งราก่อโรคในลำไยโดยสามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. มีเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสขนาด 12 mm (ตาราง 7 และรูป 5)

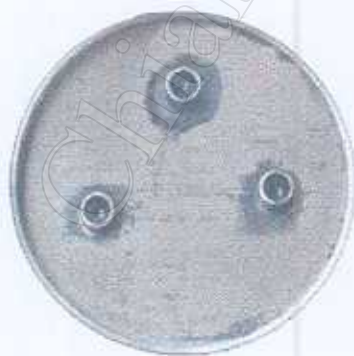
ตาราง 7 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราเมื่อทดสอบกับเชื้อทดสอบ 3 ชนิด โดย cylinder plate method

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราที่เจริญได้ (mm)		
	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
T1	-	-	-
T2	-	-	-
T3	-	-	-
CT9	-	-	-
CH21	-	-	-
83	-	-	-
CT12	-	12.0	-
F1	-	-	-
ปอຍ	-	-	-
MST91	-	-	-
T58	-	-	-
BB4	-	-	-

จากการทดสอบความสามารถของน้ำกรองเลี้ยงแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา
ก่อโรคในลำไยโดยวิธี cylinder plate method พบว่าน้ำกรองของแบคทีเรียไอโซเลท B6 และ H11
ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งราก่อโรคในลำไย โดยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียไอโซเลท B6
สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lasiodiplodia* sp. โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 22.0 mm ส่วน
น้ำกรองแบคทีเรียไอโซเลท H11 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Cladosporium* sp. มีขนาดเส้นผ่า
ศูนย์กลางวงใส 19.3 mm และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium* sp. โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง
วงใส 15.7 mm (ตาราง 8 และรูป 5)

ตาราง 8 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเมื่อทดสอบกับเชื้อทดสอบ 3
ชนิด โดย cylinder plate method

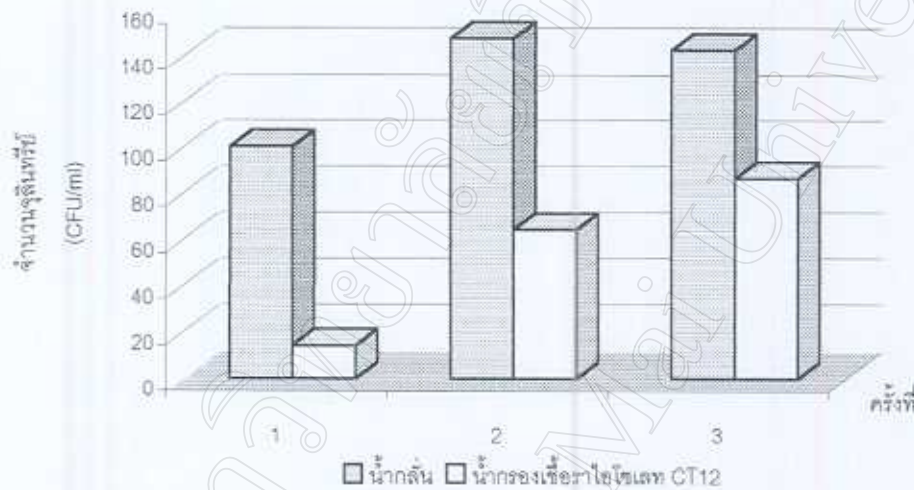
ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (mm)		
	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
B5	-	-	-
B6	-	-	22.0
D1	-	-	-
H11	19.3	15.7	-
M1	-	-	-
CON6	-	-	-
CON10	-	-	-



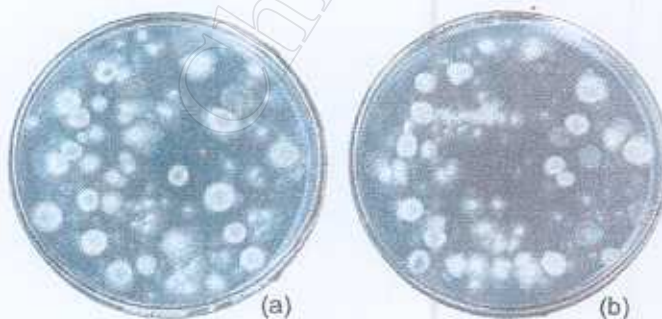
รูป 5 การทดสอบ cylinder cup method ของน้ำกรอง ไอโซเลท H11 กับ *Cladosporium* sp.

2.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชบนผลลำไย

ผลการศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลืออกบริเวณเปลือกนอกของผลลำไย ภายหลังจากที่จุ่มผลลำไยด้วยน้ำกรองเชื้อราไอโซเลท CT12 แล้วนำสารแขวนลอยมาทำการ spread plate เพื่อนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ พบว่า ชุดการทดลองของผลลำไยที่จุ่มในน้ำกลั่น ครั้งที่ 1, 2 และ 3 นับจำนวนโคโลนีได้ 101, 148.5 และ 143.5 CFU/ml ตามลำดับ ส่วนชุดที่จุ่มในน้ำกรองไอโซเลท CT12 นับได้ 14.7, 64.8 และ 87.3 CFU/ml ตามลำดับ (รูป 6 และรูป 7) โดย pH ของน้ำกรองก่อนทำการใส่เชื้อวัดได้ 6.8, 6.5 และ 6.4 ตามลำดับ หลังจากใส่เชื้อราไอโซเลท CT12 วัดได้ 8.5, 8.1 และ 8.3 ตามลำดับ

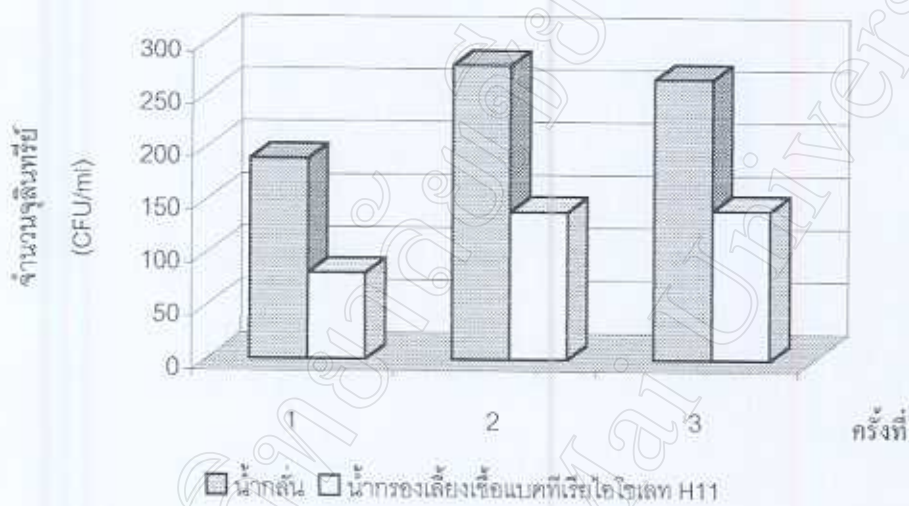


รูป 6 การเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่บริเวณเปลือกนอก ของลำไยภายหลังจากที่มี การจุ่มผลลำไยในน้ำกลั่นและน้ำกรองเชื้อราไอโซเลท CT12



รูป 7 เปรียบเทียบจำนวน โคโลนีของจุลินทรีย์ภายหลังจากที่มีการ spread plate (a) ชุดที่จุ่มผลลำไย ในน้ำกลั่น (b) ชุดที่จุ่มผลลำไยในน้ำกรองเชื้อราไอโซเลท CT12

ผลการศึกษาริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือน้อยบริเวณเปลือกนอกของผลลำไย ภายหลังจากที่จุ่มผลลำไยด้วยน้ำกรองแบคทีเรียไฮโซเลท H11 แล้วนำสารแขวนลอยมาทำการ spread plate เพื่อนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ พบว่า ชุดการทดลองของผลลำไยที่จุ่มในน้ำกลั่น ครั้งที่ 1, 2 และ 3 นับจำนวนโคโลนีได้ 189, 278.5 และ 266 CFU/ml ตามลำดับ ส่วนชุดที่จุ่มในน้ำกรองไฮโซเลท H11 นับได้ 81.2, 139.8 และ 141.5 CFU/ml ตามลำดับ (รูป 8 และรูป 9) โดย pH ของน้ำกรองก่อนทำการใส่เชื้อวัดได้ 6.2, 6.8 และ 6.5 ตามลำดับ หลังจากใส่แบคทีเรียไฮโซเลท H11 วัดได้ 7.2, 7.6 และ 7.1 ตามลำดับ



รูป 8 การเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่บริเวณเปลือกนอกของลำไยภายหลังจากที่มีการจุ่มผลลำไยในน้ำกลั่นและน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไฮโซเลท H11

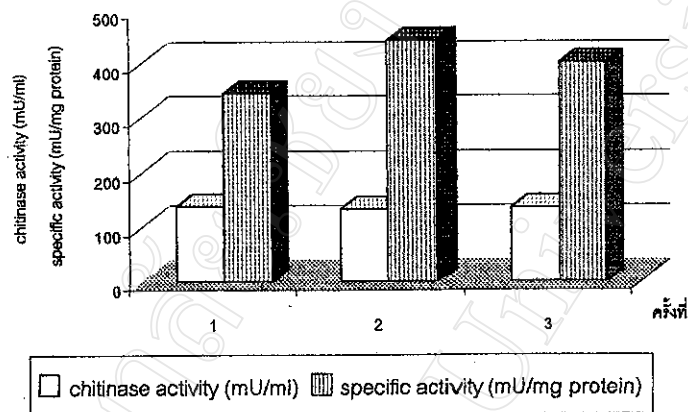


รูป 9 เปรียบเทียบจำนวน โคโลนีของจุลินทรีย์ภายหลังจากที่มีการ spread plate (a) ชุดที่จุ่มผลลำไยในน้ำกลั่น (b) ชุดที่จุ่มผลลำไยในน้ำกรองแบคทีเรียไฮโซเลท H11

3. ผลการศึกษาสมบัติบางประการของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของไอโซเลทที่ให้ผลยับยั้งราก่อโรค

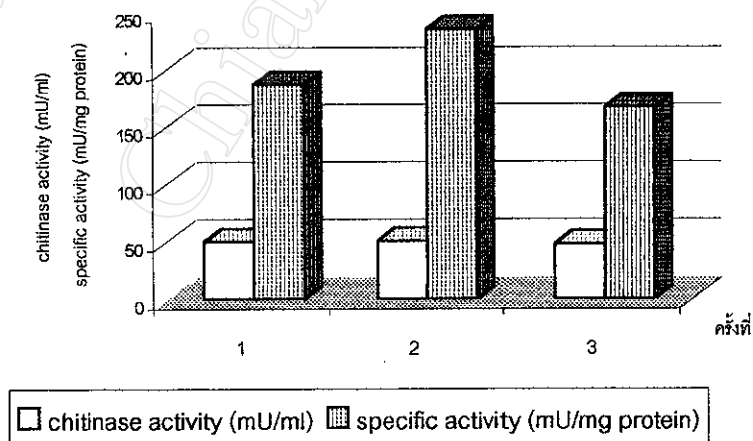
3.1 การวัดการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส

เมื่อนำน้ำกรองของเชื้อราไอโซเลท CT12 มาทำการหาค่า chitinase activity และ specific activity ทุกครั้งที่มีการทดลองจุ่มผลกล้าไย ซึ่งทำทั้งหมด 3 ครั้ง ให้ค่า chitinase activity เท่ากับ 138, 133 และ 135 mU/ml และให้ค่า specific activity 345, 443 และ 401 mU/mg protein (รูป 10)



รูป 10 ค่า chitinase activity และ specific activity ที่วัดได้จากน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท CT12

เมื่อนำน้ำกรองของแบคทีเรียไอโซเลท H11 มาทำการหาค่า chitinase activity และ specific activity ทุกครั้งที่มีการทดลองจุ่มผลกล้าไย ซึ่งทำทั้งหมด 3 ครั้ง ให้ค่า chitinase activity เท่ากับ 50, 51 และ 48 mU/ml และให้ค่า specific activity 187, 235 และ 167 mU/mg protein (รูป 11)



รูป 11 ค่า chitinase activity และ specific activity ที่วัดได้จากน้ำกรองแบคทีเรียไอโซเลท H11

3.2 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวต่าง ๆ กัน พบว่า น้ำกรองเชื้อราไอโซเลท CT12 จะตกตะกอนได้ในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 40-70% ส่วนน้ำกรองแบคทีเรียไอโซเลท H11 จะตกตะกอนได้ในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80%

3.3 ผลการศึกษาคุณสมบัติในการทนความร้อนของน้ำกรองเชื้อราไอโซเลท CT12 และน้ำกรองแบคทีเรียไอโซเลท H11

เมื่อนำส่วนของ supernatant และตะกอนที่ละลายในบัฟเฟอร์ไปทดสอบผลการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธี cylinder cup method โดยนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C ก่อนเป็นเวลา 0, 3, 5, 10 และ 15 นาที แล้วตรวจสอบผลการยับยั้งโดยวัดวงใสที่เกิดขึ้น พบว่าทั้งน้ำกรองเชื้อราไอโซเลท CT12 และน้ำกรองแบคทีเรียไอโซเลท H11 เมื่อผ่านการต้มที่ 100°C เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ไม่มีชุดใดเลยที่มีผลการยับยั้งกับเชื้อราทดสอบเกิดขึ้น

3.4 การบ่งบอกชนิดของจุลินทรีย์

เชื้อราไอโซเลท CT12

จากการนำเชื้อราไอโซเลท CT12 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Czapek's agar พบว่าโคโลนีของเชื้อรามีเส้นใยลักษณะบางใส เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร malt extract agar ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเส้นใยมีสีเขียวเข้มดังรูป 15 (a) เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-55°C เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า vesicle มีลักษณะเป็นคนโท มี sterigma ขึ้นเดี่ยวขึ้นคลุม vesicle เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบกับหนังสือ The Genus *Aspergillus* (Raper and Fennell, 1965) พบว่าเป็นกลุ่มของ *Aspergillus fumigatus* โดยมีลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้ (Barnett and Hunter, 1987)

Superkingdom *Eukaryonta*

Kingdom *Myceteae*

Division *Amastigomycotina*

Subdivision *Deuteromycotina*

Class *Deuteromycetes*

Subclass *Hyphomycetidae*

Order *Moniliales*

Family	Moniliaceae
Genus	<i>Aspergillus</i>
Species	<i>A. fumigatus</i> CT12



a



b

รูป 12 ลักษณะของ *Aspergillus fumigatus* CT12 (a) เมื่อเจริญในอาหาร Malt extract agar (b) ลักษณะเส้นใยเมื่อส่องดูได้กล้องจุลทรรศน์

แบคทีเรียไฮโซเลท H11

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไฮโซเลท H11 บนอาหาร nutrient agar พบว่าโคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวหน้าไม่เรียบ ขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน ขอบมีรอยหยักคล้าย rhizoid โคโลนีแนบติดผิวอาหาร เป็นแบคทีเรียแกรมบวกสร้างเอนโดสปอร์ เมื่อตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการพบว่าอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp. โดยให้ผลการทดสอบดังตาราง 9 ดังนี้

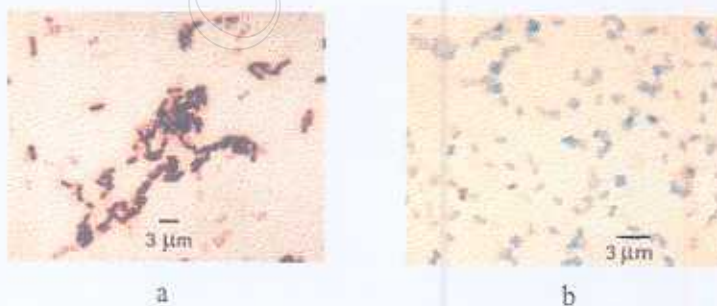
ตาราง 9 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียไฮโซเลท H11 และ *Bacillus cereus*

Characteristic	แบคทีเรียไฮโซเลท H11	<i>Bacillus cereus</i>
Rod-shaped	+	+
Endospores produced	+	+
Motile	+	+
Stain Gram-positive at least in young culture	+	+
Catalase	+	+
Voges-Proskauer test	+	+
Acid from		
D-Glucose	+	+
D-Mannitol	-	-
Gas from glucose	-	-
Hydrolysis of Gelatin	+	+
Utilization of Citrate	+	+
Nitrate reduced to nitrite	+	+
Formation of Indole	-	-

หมายเหตุ: + = positive, - = negative

ที่มา: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition (Holt *et al.*, 1994)

จากการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียไฮโซเลท H11 สามารถจัดกลุ่มให้อยู่ในกลุ่มของ Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci และบ่งบอกชนิดได้ว่าเป็น *Bacillus cereus* H11



รูป 13 แบคทีเรียไฮโซเลท H11 (a) ลักษณะตัวเซลล์เมื่อย้อมด้วยสีแกรม ซึ่งจะติดสีม่วง (b) ลักษณะของเอนโดสปอร์ ซึ่งจะย้อมติดสีแดง