

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการแยกและคัดเลือกลินทรีย์จากตัวอย่างดิน จากตัวอย่างอาหารบางชนิด และเชื้อจาก MSCMU ที่สามารถเจริญได้บนอาหารไคติน ซึ่งมี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามี 242 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้บนอาหารชนิดนี้ โดยแบ่งเป็นเชื้อรา 224 ไอโซเลท และแบคทีเรีย 18 ไอโซเลท และเมื่อทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20-55°C พบว่ามี 40 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ เมื่อนำมาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับราก่อโรคในลำไย 3 ชนิด คือ *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. พบว่ามีเชื้อรา 11 ไอโซเลท และแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ที่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อ *Cladosporium* sp. โดยเชื้อราไอโซเลท T2 และแบคทีเรีย ไอโซเลท B6 ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด มีเชื้อรา 4 ไอโซเลท แบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ที่แสดงการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อ *Fusarium* sp. โดยเชื้อราไอโซเลท T58 และแบคทีเรียไอโซเลท H11 ให้ผลการยับยั้งได้ดีที่สุด และเชื้อรา 12 ไอโซเลท แบคทีเรีย 7 ไอโซเลท เป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อ *Lasiodiplodia* sp. โดยเชื้อราไอโซเลท CT9 และแบคทีเรีย B6 ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด เมื่อนำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของราทดสอบทั้ง 3 ชนิด พบว่า เชื้อราไอโซเลท CT12 สามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. ได้ และแบคทีเรียไอโซเลท H11 ยับยั้งได้ทั้ง *Cladosporium* sp. และ *Fusarium* sp. ส่วนไอโซเลท B6 จะให้ผลยับยั้งต่อ *Lasiodiplodia* sp. ในส่วนของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของไอโซเลท T2, T58 และ CT9 ไม่สามารถยับยั้งราก่อโรคได้ ดังนั้นจึงได้เลือกเชื้อราไอโซเลท CT12 ที่ให้ผลการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ทั้ง 3 ชนิด และเป็นเชื้อราเพียงชนิดเดียวที่เกิดวงไตกับเชื้อ *Fusarium* sp. และเลือกแบคทีเรียไอโซเลท H11 ซึ่งเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับราก่อโรคทั้ง 3 ชนิดเช่นกัน และเกิดวงไตกับ *Cladosporium* sp. และ *Fusarium* sp. โดยนำเชื้อราและแบคทีเรีย ทั้ง 2 ไอโซเลทไปเลี้ยงในอาหารเหลว EPM เพื่อนำน้ำกรองมาทดสอบการยับยั้งราก่อโรคบนผลลำไย ซึ่งจากทุก ๆ ครั้งของการทดลองพบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดจากการจุ่มผลลำไยในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ มีเซลล์เหลือรอดน้อยกว่าผลลำไยที่จุ่มในน้ำกลั่น แสดงว่าในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของทั้งสองไอโซเลทต้องมีสารที่มีคุณสมบัติในการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรค และจากการศึกษาคุณสมบัติของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อโดยการหาค่า chitinase activity และ specific activity ก็ตรวจพบค่า chitinase activity จากทั้ง 2 ไอโซเลท แสดงว่าผลการยับยั้งราก่อโรคส่วนหนึ่งก็เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส ซึ่งอาจเกิดจากเอนไซม์ไคตินเนสเพียงอย่างเดียวหรือเอนไซม์ไคตินเนส

ร่วมกับสารอื่น ๆ ก็ได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อปริมาณเชื้อราบนผลลำไยลดลง การเน่าเสียของลำไยจะเกิดจากพวกยีสต์มากขึ้น คาดว่าเนื่องมาจากน้ำกรองของไอโซเลท CT12 และ H11 กำจัดราก่อโรคไปได้ส่วนหนึ่ง ทำให้จุลินทรีย์ที่เหลือที่น้ำกรองทำลายไม่ได้มีโอกาสเจริญขึ้นเพราะปราศจากคู่แข่ง สอดคล้องกับงานของนวลวรรณและคณะ (2536) ที่หุบผลเงาะด้วย cell suspension ของจุลินทรีย์แอนตาโกนิสต์ ไอโซเลท ANTA เพื่อลดอาการผลเน่าที่เกิดจาก *C. gloeosporioides* พบว่าความเสียหายของโรคลดลงจาก 85% เหลือเพียง 42.5% เท่านั้น ซึ่งความเสียหายที่ลดลงก็เนื่องมาจากสารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมานั่นเอง ส่วนราอื่น ๆ มีแนวโน้มในการตรวจพบได้มากขึ้น เนื่องมาจากการแข่งขันจากรา *C. gloeosporioides* ลดลง และจุลินทรีย์แอนตาโกนิสต์ไม่มีผลยับยั้งราอื่น

ดังนั้นการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อราและแบคทีเรียที่แยกได้เหล่านี้ อาจไม่ได้เกิดจากเอนไซม์ไคตินเอสแต่เพียงอย่างเดียว แต่อาจเกิดจากกลไกอื่นๆ อีกหลายอย่าง เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะ การเป็นปรสิต หรือ hydrolytic enzyme อื่นนอกเหนือจากไคตินเอส เช่น กลูแคนเนส (glucanase) หรือโปรติเอส (protease) ซึ่งสามารถสร้างสารทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราได้เช่นกัน (Gomes *et al.*, 2000)

เมื่อนำน้ำกรองของเชื้อราไอโซเลท CT12 มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจะตกตะกอนได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 70% และน้ำกรองแบคทีเรียไอโซเลท H11 จะตกตะกอนได้มากที่สุดที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 80% แล้วนำมาให้ความร้อนปรากฏว่าไม่มีเชื้อใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้แม้แต่ในส่วนของตะกอนหรือ supernatant ที่ไม่ได้ให้ความร้อน ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุ ตัวอย่างเช่น อาจจะเป็นเพราะความสามารถในการยับยั้งไม่ได้อยู่ในส่วนของโปรตีนที่ตกตะกอนไป แต่เกิดจากสาเหตุอื่น เช่น สารเมตาโบไลต์ชนิดอื่น ๆ ที่เชื้อสร้างขึ้น หรือค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำกรองไม่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรตีน หรือความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของโปรตีนยังมีไม่มากพอ จึงควรทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นและบริสุทธิ์มากขึ้น โดยหลังจากตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วควรทำการไดอะไลซิสและทำโครมาโตกราฟี จากงานของ Wang and Chang (1997) ที่ได้ทำการ purify ไคตินเอสที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* K-187 โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การทำไดอะไลซิสและทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ปริมาณ chitinase I และ chitinase II 92 และ 40 mg และได้ค่า specific activity 1.52 และ 0.88 u/mg protein และ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ chitinase I คือ pH 8 ที่อุณหภูมิ 50°C ส่วนของ chitinase II อยู่ที่ pH 7 อุณหภูมิ 40°C ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด นอกจากนี้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราอาจสลายไปเพราะระยะเวลาและการให้ความร้อนเนื่องจากความร้อนที่ให้นั้นอุณหภูมิ

สูงถึง 100°C ดังนั้นจึงควรทดสอบที่หลากหลาย ๆ อุณหภูมิเพื่อหาอุณหภูมิที่โปรตีนสามารถทนความร้อนได้สูงสุด

จากการบ่งบอกชนิดของเชื้อราไอโซเลท CT12 ซึ่งมีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อราก่อโรคทั้ง 3 ชนิด และน้ำกรองสามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. ได้ มีคุณสมบัติเป็น thermotolerant คือเจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20-55°C โคโลนีมีสีเขียวเข้ม จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็น *Aspergillus fumigatus* group ส่วนแบคทีเรียไอโซเลท H11 ซึ่งเป็นพวก endospore-forming Gram-positive rods เจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20-55°C จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็น *Bacillus cereus*

จากการทดลองเบื้องต้นซึ่งพบว่าน้ำกรองของ *A. fumigatus* CT12 และ *B. cereus* H11 สามารถลดปริมาณเชื้อราก่อโรคบนผลลำไยได้ส่วนหนึ่งซึ่งดีกว่าการใช้น้ำกลั่น แต่การพัฒนาเพื่อให้นำไปใช้ได้จริงนั้นควรมีการลดต้นทุนการผลิต เช่นการเปลี่ยน substrate จาก colloidal chitin ไปเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่หาได้ง่ายเช่นการใช้เปลือกกุ้ง หรือกระดองปูที่เป็นขยะทิ้งกันอยู่ทั่วไป การเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำกรองเช่น การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำกรอง การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ไคตินเอสในแง่ของ pH และอุณหภูมิ หรือการเปลี่ยนรูปให้นำไปใช้ได้ง่ายขึ้นเพื่อประโยชน์และความสะดวกของเกษตรกรในการรักษาสภาพผลผลิตแทนการใช้สารเคมี