สารต้านรา ก่อโรคจาก *Bacillus* sp. N1 ต่อ *Curvularia* sp. ที่คัดแยกจากปทุมมา

นางสาวกนิฏฐกา แดนราช

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ANTIFUNGAL COMPOUND FROM *Bacillus* sp. N1 AGAINST *Curvularia* sp. ISOLATED FROM SIAM TULIP

Miss Kanittaka Danrach

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | สารต้านราก่อโรคจาก *Bacillus* sp. N1 ต่อ *Curvularia* sp. ที่คัดแยกจากปทุมมา |
| โดย | นางสาวกนิฏฐกา แดนราช |
| สาขาวิชา | จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กนิฏฐกา แดนราช : สารต้านราก่อโรคจาก *Bacillus* sp. N1 ต่อ *Curvularia* sp. ที่คัดแยกจากปทุมมา. (ANTIFUNGAL COMPOUND FROM *Bacillus* sp. N1 AGAINST *Curvularia* sp. ISOLATED FROM SIAM TULIP) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร. ปาหนัน เริงสำราญ, 107 หน้า.

*Bacillus subtilis* N1 ที่คัดแยกได้จากดินในจังหวัดกาญจนบุรีมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ซึ่งเป็นราก่อโรคใบจุด (โรคจุดสีน้ำตาล) ในปทุมมา งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารยับยั้งราและการแยกสารให้บริสุทธิ์ จากการแปรผันปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ (NB, LB และ TSB), pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH 6, 7, 8 และ 9), อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง (30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส) และระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (0 ถึง 24 ชั่วโมง) พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ *B. subtilis* N1 คือการเลี้ยงในอาหาร TSB pH 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุด ซึ่ง *B. subtilis* N1 สร้างสารออกฤทธิ์ต่อ *Curvularia* sp. ในรูปแบบที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญ (non-growth associated product) เพราะสารดังกล่าวผลิตออกมาในระยะ stationary phase สารออกฤทธิ์นี้ยังทนต่ออุณหภูมิได้ตั้งแต่ 20 ถึง 121 องศาเซลเซียสและทนค่า pH ได้ตั้งแต่ pH 2 ถึง 10 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์เป็นวิธีแยกสารออกฤทธิ์ที่ดีที่สุดสำหรับ *B. subtilis* N1 ซึ่งโปรตีนมีแอกติวิตีจำเพาะ 379.82 AU ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน หลังจากทำ SDS-PAGE พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 61.38, 41.98, 36.14 และ 22.13 กิโลดาลตัน โปรตีนในส่วนน้ำใสของเซลล์เพาะเลี้ยง *B. subtilis* N1 ยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ด้วยความเข้มข้นต่ำสุด 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์มีประสิทธิภาพมากขึ้น 14 เท่าในการยับยั้ง *Curvularia* sp. โดยมีความเข้มข้นต่ำสุด 23.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เส้นใยของ *Curvularia* sp. มีความหนามากขึ้น บวมเป็นปล้องและบางบริเวณบวมเป็นก้อนกลมขนาดใหญ่ ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำสารออกฤทธิ์ที่ผลิตได้ไปพัฒนาเพื่อใช้ให้เกิดประโยชน์ในการป้องกันการแพร่ระบาดของ *Curvularia* sp. ในแปลงเพาะปลูกปทุมมาเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีได้ต่อไป

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต กนิฏฐกา แดนราช

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2553

## 5072203323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : ANTIFUNGAL PROTEIN / *Curvularia* sp. / SIAM TULIP

KANITTAKA DANRACH : ANTIFUNGAL COMPOUND FROM *Bacillus* sp. N1 AGAINST *Curvularia* sp. ISOLATED FROM SIAM TULIP.

ADVISOR : PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., 107 pp.

*Bacillus subtilis* N1 showed antagonistic effect against *Curvularia* sp., a causal agent of leaf spot on Siam tulip. The aims of this research were to verify the optimal conditions for production of antifungal substances by *B. subtilis* N1 and to purify the compound. In order to obtain the optimal conditions to produce the antifungal substances, factors which were types of cultivation medium (NB, LB and TSB), pH of the medium (6, 7, 8 and 9), temperatures of cultivation (30, 37 and 40 degree Celsius) and cultivation times (0 – 24 hours) were investigated. The results showed that the optimal cultivation conditions for *B. subtilis* N1 were grown in TSB medium, at pH 7, at 37 degree Celsius, for 12 hours. The antifungal substances were non-growth associated product since it was produced during stationary phase of growth. The active compound was thermostable at 20 – 121 degree Celsius for 20 minutes. The activity remained unchanged when exposed to pH ranged from 2 – 10. Separation of protein by 20 - 40 % ammonium sulfate precipitation gave partial purified proteins with specific activity 379.82 AU/mg. SDS-PAGE analysis revealed mixed proteins with major four bands at 61.38, 41.98, 36.14 and 22.13 kDa. MICs of culture filtrate and partial purified protein were 350 μg/ml and 23.43 μg/ml, respectively. The later exhibited stronger activity by 14 folds more than the culture filtrate. Observation under light microscope indicated that the antifungal proteins caused severe alteration in cell morphogenesis. It caused abnormal thickenings, swollen and rounded hyphae. These results revealed that *B. subtilis* N1 and its antifungal substances might be used as a biocontrol agent against *Curvularia* sp. to prevent damage from this fungal infection on Siam tulip production.

Department : Microbiology Student's Signature Kanittaka Danrach

Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature Panan Rerngsamran

Academic Year : 2010

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความช่วยเหลือของ อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ อบรมสั่งสอน รวมทั้งเป็นที่ปรึกษาในเรื่องต่างๆ และให้กำลังใจที่อบอุ่นเป็นอย่างดีเสมอมา ตลอดจนตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ และรองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยชี้แนะข้อบกพร่องของงานวิจัยพร้อมทั้งเสนอแนวทางแก้ไข

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และ ดร. อัญชนา พัฒนสุพงษ์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่กรุณามอบต้นปทุมมาติดเชื้อให้ผู้วิจัยคัดแยกราก่อโรคเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้

ขอบคุณนางสาวนิโลบล เหลากลม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์สำหรับปฏิบัติงาน ช่วยแนะนำการใช้เครื่องโครมาโทกราฟีและวิธีการทำบริสุทธิ์สารเป็นอย่างดี

ขอบคุณนางสาวรพีวรรณ โสวรรณปรีชา ที่เป็นเพื่อนคู่คิดที่ดี คอยแนะนำเทคนิคเล็กๆน้อยๆที่เป็นประโยชน์ระหว่างปฏิบัติงาน ร่วมทุกข์ร่วมสุขตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ ชื่นชมผลงานเมื่อประสบความสำเร็จและผ่านอุปสรรคต่างๆมาด้วยกัน

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่าน เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา รวมทั้งสมาชิกห้องวิจัย 448 ทุกคนที่ให้ข้อเสนอแนะ มีส่วนช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยตลอดเวลาที่ได้ศึกษาอยู่ ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ เป็นประสบการณ์และความทรงจำที่ดีให้ผู้วิจัยตลอดไป

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณทุกคนในครอบครัวที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษาตลอดมา

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฏ

บทที่

1. บทนำ..... 1
2. ปริทรรศน์วรรณกรรม..... 4
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง..... 20
   - 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 20
   - 3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ..... 22
   - 3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 25
     - 3.3.1 แบคทีเรีย..... 25
     - 3.3.2 รา..... 25
   - 3.4 การแยกและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราก่อโรคในปทุมมา..... 25
   - 3.5 การทดสอบความสามารถในการก่อโรค..... 25
   - 3.6 การคัดกรองแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคที่คัดแยกได้..... 26
     - 3.6.1 การเตรียมแบคทีเรีย..... 26
     - 3.6.2 การเตรียมราเป้าหมาย..... 26
   - 3.7 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรค..... 26
     - 3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย..... 26
     - 3.7.2 การหาชุดควบคุมผลบวกในการควบคุมการแพร่ของสารยับยั้งรา..... 27
     - 3.7.3 การแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้แอกติวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด..... 27

บทที่ หน้า

3.7.4 การแปรผันค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้แอกติวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด..... 28
3.7.5 การแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ให้แอกติวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด..... 28
3.8 การทดสอบความเสถียรของสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรค..... 28
3.8.1 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ..... 28
3.8.2 การทดสอบความเสถียรต่อค่า pH ..... 29
3.9 การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค..... 29
3.9.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต..... 29
3.9.2 การทดสอบแอกติวิตีของโปรตีน..... 30
3.9.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโปรตีน..... 30
3.9.4 การสกัดสารยับยั้งการเจริญของราด้วยตัวทำละลายอินทรีย์..... 30
3.9.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด..... 30
3.10 การทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค..... 31
3.11 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)..... 31
3.12 การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)..... 33
3.13 การทดสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนต่อสปอร์และเส้นใยของราก่อโรค..... 33
3.14 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย..... 34
3.14.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี..... 34
3.14.1.1 การย้อมแกรมและย้อมสปอร์..... 34
3.14.1.2 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี..... 34
3.14.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุล..... 35
3.14.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ..... 35
3.14.2.2 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้ากับเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector..... 37

บทที่ หน้า

3.14.2.3 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ*E. coli* DH5α..... 37
3.14.2.4 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์..... 38
3.14.2.5 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany)..... 38
3.14.2.6 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA..... 39
4. ผลการทดลอง..... 41
4.1 การแยกและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราก่อโรคในปทุมมา..... 41
4.2 การทดสอบความสามารถของราในการก่อโรค..... 41
4.3 การคัดกรองแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp. ที่คัดแยกได้..... 42
4.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรค..... 43
4.4.1 การหาชุดควบคุมผลบวกในการควบคุมการแพร่ของสารยับยั้งรา..... 43
4.4.2 การแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้แอกติวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด..... 44
4.4.3 การแปรผันค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้แอกติวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด..... 46
4.4.4 การแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ให้แอกติวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด..... 48
4.5 การทดสอบความเสถียรของสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรค..... 52
4.5.1 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ..... 52
4.5.2 การทดสอบความเสถียรต่อค่า pH ..... 52
4.6 การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค..... 53
4.6.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต..... 53

บทที่ หน้า

4.6.2 การสกัดสารยับยั้งการเจริญของราด้วยตัวทำละลายอินทรีย์..... 54

4.7 การทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค..... 55

4.8 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)…… 60

4.9 การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)..... 62

4.10 การทดสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนต่อราก่อโรค..... 65

4.11 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย..... 66

4.11.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี..... 66

4.11.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุล..... 67

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 70

รายการอ้างอิง..... 76

ภาคผนวก..... 85

ภาคผนวก ก..... 86

ภาคผนวก ข..... 90

ภาคผนวก ค..... 98

ภาคผนวก ง..... 99

ภาคผนวก จ..... 101

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 107

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | ปริมาณและมูลค่าการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมา ปี 2540-2547…….. | 6 |
| 2.2 | ปริมาณและมูลค่าการส่งออกดอกปทุมมา ปี 2543-2547……... | 6 |
| 2.3 | ตัวอย่างแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่ผลิตสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ…….. | 15 |
| 3.1 | ส่วนผสมของพอลิอะคริลาไมด์…….. | 32 |
| 4.1 | ขนาดของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นโดยแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ……..... | 42 |
| 4.2 | แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากแบคทีเรีย N1 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร NB LB และ TSB……..... | 45 |
| 4.3 | แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากแบคทีเรีย N1 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ที่ค่า pH เท่ากับ 6 7 8 และ 9……..…….…… | 47 |
| 4.4 | แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากแบคทีเรีย N1 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ที่ค่า pH เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส……..…… | 50 |
| 4.5 | แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งของส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N1 เมื่อทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิและค่า pH ……..…….. | 52 |
| 4.6 | การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนปริมาตร 2 ลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp……... | 56 |
| 4.7 | ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนเมื่อขยายขนาดขึ้นเป็น 5 ลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp……. | 59 |
| 4.8 | แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากโปรตีนความเข้มข้นต่างๆในการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp. จากส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย..... | 62 |
| 4.9 | แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากโปรตีนความเข้มข้นต่างๆในการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp…….. | 64 |
| 4.10 | ผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี..... | 67 |

# สารบัญภาพ


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | ต้นปทุมมาที่ใช้เป็นไม้ประดับหรือไม้กระถาง..... | 4 |
| 2.2 | ลักษณะโคโลนี [a] และสปอร์ของ *Curvularia* sp. ที่คัดแยกได้ [b]..... | 7 |
| 2.3 | อาการโรคใบจุดหรือโรคจุดสีน้ำตาลในปทุมมาที่บริเวณใบและก้านช่อดอก [a] และที่บริเวณกลีบดอก [b]..... | 8 |
| 4.1 | [a] โคโลนีของราที่แยกได้จากใบปทุมมา (บนอาหาร PDA) [b] สปอร์ของรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)..... | 41 |
| 4.2 | แสดงอาการของโรคในปทุมมาหลังจากหยดสปอร์แขวนลอยของ *Curvularia* sp. [a] และน้ำกลั่น [b]..... | 42 |
| 4.3 | แสดงบริเวณยับยั้งของแบคทีเรีย N1 ในการยับยั้งรา *Curvularia* sp..... | 43 |
| 4.4 | แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *Curvularia* sp. โดยนิสเตติน 500 μg/ml [a], 2.5 mg/ml [b], 7.5 mg/ml [c] และ 10 mg/ml [d]..... | 43 |
| 4.5 | กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย N1 ในอาหาร NB LB และ TSB..... | 44 |
| 4.6 | กราฟแสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งรา *Curvularia* sp. โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย N1 ในชั่วโมงที่ 12, 15 และ 18 เปรียบเทียบระหว่างอาหาร NB, LB และ TSB..... | 46 |
| 4.7 | กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย N1 ในอาหาร TSB ที่ค่า pH เท่ากับ 6 7 8 และ 9..... | 47 |
| 4.8 | กราฟแสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งรา *Curvularia* sp. โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย N1 ในชั่วโมงที่ 12, 15 และ 18 เปรียบเทียบระหว่างค่า pH 6, 7 และ 8..... | 48 |
| 4.9 | กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย N1ในอาหาร TSB pH 7 ที่อุณหภูมิ 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส..... | 49 |
| 4.10 | กราฟแสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งรา *Curvularia* sp. โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย N1 ในชั่วโมงที่ 12, 15 และ 18 เปรียบเทียบระหว่างอุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส..... | 51 |

| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 4.11 | แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งรา *Curvularia* sp. โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย N1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร TSB ที่ค่า pH เท่ากับ 7 ที่ 37 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง | 51 |
| 4.12 | แสดงการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ด้วยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ [a] และช่วง 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ [b] เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ [c] และชุดควบคุมผลบวก [d]…… | 54 |
| 4.13 | แสดงการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ด้วยสารละลายโปรตีนก่อนการตกตะกอน [a] หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ [b] ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ [c] และช่วง 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ [d]…….. | 55 |
| 4.14 | แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของลำดับส่วนต่างๆ จากการตกตะกอนโปรตีนปริมาตร 2 ลิตร…… | 57 |
| 4.15 | แสดงการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ด้วยสารละลายโปรตีนก่อนการตกตะกอน [a] หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ [b] ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ [c] และช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ [d]…….. | 58 |
| 4.16 | แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของลำดับส่วนต่างๆ จากการตกตะกอนโปรตีนปริมาตร 5 ลิตร…… | 60 |
| 4.17 | การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส…….. | 61 |
| 4.18 | แสดงลักษณะของเส้นใยปกติที่ทดสอบด้วยอาหาร PDB [a] และเส้นใยที่ทดสอบด้วยโปรตีนที่ความเข้มข้น 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [b] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า……... | 63 |
| 4.19 | แสดงลักษณะของเส้นใยปกติที่ทดสอบด้วยอาหาร PDB [a] และเส้นใยที่ทดสอบด้วยโปรตีนที่ความเข้มข้น 23.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [b] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า…… | 64 |
| 4.20 | แสดงลักษณะของเส้นใยที่งอกออกจากสปอร์ เมื่อทดสอบด้วยอาหาร PDB ที่ 9 ชั่วโมง [a] และเส้นใยที่ทดสอบด้วยโปรตีนที่ความเข้มข้น 23.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 14 ชั่วโมง ([b] และ [c]) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า…….. | 65 |

| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 4.21 | แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยของ *Curvularia* sp. ในชุดควบคุม [a] และชุดทดสอบ [b] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่กำลังขยาย 2,000 เท่า…… | 65 |
| 4.22 | แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย N1 บนอาหาร NA [a] ผลการย้อมแกรม [b] และผลการย้อมสปอร์ [c]..... | 66 |
| 4.23 | ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์…… | 67 |
| 4.24 | ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มีส่วนของบริเวณ 16S rDNA แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector…… | 68 |
| 4.25 | ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI..... | 69 |


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1
# บทนำ

ปทุมมาเป็นไม้ดอกในวงศ์ขิงข่า (Zingiberaceae) สกุลขมิ้น (Curcuma) อยู่ในกลุ่มที่สามารถพัฒนาเป็นไม้ตัดดอกได้ดี มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบอินโดจีน เช่น ไทย พม่า ลาว และกัมพูชา (มนัสวี ฉายผาด และ วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, 2549) สำหรับประเทศไทยพบเห็นปทุมมาได้แทบทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในเขตภาคเหนือ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน พะเยา และบริเวณอุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง จ.พิษณุโลก (วิภาดา ทองทักษิณ และ นิพัฒน์ สุขวิบูลย์ , 2537) ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ บริเวณอุทยานแห่งชาติป่าหินงาม จ.ชัยภูมิ จะมีความหลากหลายทางสายพันธุ์มากที่สุด (นิพัฒน์ สุขวิบูลย์ และ วิภาดา ทองทักษิณ, 2545) ปทุมมาเป็นไม้ดอกที่มีสีสันสวยงาม ให้ผลผลิตต่อปีจำนวนมาก ก้านช่อดอกแข็งแรงทำให้มีอายุการปักแจกันนาน สามารถปลูกเป็นไม้ดอก ไม้ประดับได้ดี ปทุมมาที่ส่งออกยังต่างประเทศรู้จักกันในชื่อ สยามทิวลิป (Siam Tulip) (สุรชาติ คูอาริยะกุล, 2543) ปทุมมาจัดเป็นพืชใหม่ที่กำลังได้รับความนิยมจากตลาดต่างประเทศในขณะนี้ โดยมีตลาดรองรับที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา นิวซีแลนด์ และกลุ่มประชาคมเศรษฐกิจยุโรป (EU) ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศเดียวในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาที่มีคุณภาพ โดยยังไม่พบข้อมูลคู่แข่งทางการค้าแต่อย่างใด ตลาดหลักกลุ่มดังกล่าวมีความต้องการหัวพันธุ์ปทุมมาสูงถึงปีละกว่า 3 ล้านหัว คิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 30 ล้านบาทต่อปี ซึ่งนับว่าเป็นอันดับสองรองจากการส่งออกกล้วยไม้ และมีแนวโน้มความต้องการมากขึ้นทุกปี (โสภิตา ตาปัน และ โสระยา ร่วมรังษี, 2549)

ปทุมมาจะออกดอกดีในช่วงฤดูฝน ซึ่งเป็นระยะที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่ เมื่อฤดูฝนสิ้นสุดลงจะเป็นเวลาที่ปทุมมาเข้าสู่ระยะพักตัวและออกดอกอีกครั้งในฤดูฝนปีถัดไป ในฤดูฝนนี้เองที่การปลูกปทุมมามักประสบกับปัญหาการระบาดของราก่อโรค เนื่องจากลมพายุและน้ำฝนเป็นตัวกลางที่ดีที่ทำให้ราก่อโรคแพร่ระบาดเป็นวงกว้าง พร้อมทั้งสภาพอากาศมีความชื้นสูงส่งผลให้ราเจริญได้ดี สำหรับโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราที่เกิดกับปทุมมาส่วนใหญ่มักเป็นโรคใบจุด ตัวอย่างราที่มีรายงานว่าก่อให้เกิดอาการใบจุดกับปทุมมาได้แก่ *Acremonium* sp. *Phoma* sp. (นันทินี ศรีจุมปา และ สุรชาติ คูอาริยะกุล, 2548) และ *Cercospora* sp. นอกจากนี้ยังมีสาเหตุจากรา *Curvularia* sp. ซึ่งยังพบว่าสามารถก่อโรคใบจุดกับพืชในวงศ์ขิงข่าชนิดอื่นได้อีกด้วย (นิพนธ์ ทวีชัย และคณะ, 2542)

วงจรชีวิตและการก่อโรคของ *Curvularia* sp. เกิดขึ้นในช่วงที่ปทุมมาเข้าสู่ระยะพักตัว หากไม่เก็บทำลายซากพืชที่หลงเหลืออยู่ในแปลงปลูก ราจะอาศัยอยู่บนเศษซากพืชนั้นได้เป็นเวลานานนับปี เมื่อเข้าสู่ฤดูฝนปีถัดไป สปอร์ที่ราสร้างขึ้นจะปลิวกระจายออกไปตามส่วนต่างๆของแปลงปลูกโดยแรงลมและน้ำฝน เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมสปอร์จะงอกและสร้างความเสียหายให้กับปทุมมาต้นอื่นๆต่อไปในเวลาอันรวดเร็วเพียง 2-3 วัน (อรวรรณ วิชัยลักษณ์, 2548)

การป้องกันกำจัดการเกิดโรคในปทุมมา เบื้องต้นจะเก็บทำลายซากพืชที่หลงเหลือในแปลงปลูก ใส่ปูนขาวหรือปุ๋ยหมักเพื่อปรับปรุงคุณภาพดิน ส่วนวิธีที่นิยมกันมากคือการพ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืชเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรค สารป้องกันกำจัดราก่อโรคในปทุมมาที่ใช้ได้ผลดีคือ ไดฟีโนโคนาโซล คาร์เบนดาซิม แมนโคเซบ และบีโนมิล(นันทินี ศรีจุมปา และ สุรชาติ คูอาริยะกุล, 2548) ถึงแม้ว่าการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อก่อโรคในปทุมมาจะได้ผลดี แต่ก็มีผลเสียต่างๆเกิดขึ้นด้วย เช่น สารเคมีที่ใช้ตกค้างในสิ่งแวดล้อมทั้งในดินและในน้ำที่อยู่รอบบริเวณแปลงเพาะปลูก เป็นผลเสียต่อสุขภาพของเกษตรกรเนื่องจากต้องฉีดพ่นสารเคมีเป็นเวลานานโดยเฉพาะในช่วงที่เชื้อก่อโรคมีแนวโน้มว่าจะเกิดการระบาด และนอกจากนี้เชื้อก่อโรคก็อาจมีพัฒนาการในการปรับตัวให้ทนต่อสารเคมี ทำให้ต้องเพิ่มปริมาณการใช้สารเคมี ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมายของสารเคมีได้รับผลกระทบตามไปด้วย และทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลในระบบนิเวศต่อไปในระยะยาว (อรวรรณ วิชัยลักษณ์, 2548) อีกทั้งพืชส่งออกจะต้องควบคุมปริมาณการใช้สารเคมีเพื่อไม่ให้เกิดสารตกค้างเกินค่ามาตรฐานที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก หากมีค่าสารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์จะถูกปฏิเสธจากตลาดรับซื้อทันที (ศิริพร วันฟั่น, 2545) ด้วยเหตุนี้จึงมีผู้ให้ความสนใจศึกษาการใช้วิธีทางชีวภาพในการป้องกันกำจัดโรคพืชกันมากขึ้น วิธีการที่ยังคงศึกษากันอยู่อย่างต่อเนื่องคือการค้นหาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตสารต่อต้านราก่อโรค เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่พึ่งพาการใช้สารเคมี ไม่รบกวนระบบนิเวศ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและมีความปลอดภัยต่อเกษตรกร

วิธีการทางชีวภาพ คือ การควบคุมปริมาณหรือลดกิจกรรมของราก่อโรคให้อยู่ในระดับที่ไม่ส่งผลเสียหายต่อการเพาะปลูกพืช โดยอาศัยการทำงานของสิ่งมีชีวิตหรือผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิตและให้ธรรมชาติจัดการกันเอง (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2544) ซึ่งวิธีทางชีวภาพประกอบด้วยหลายวิธี ได้แก่ 1) การแก่งแย่ง (competition) โดยใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรคเพื่อเข้าไปแย่งชิงถิ่นที่อยู่ อาหาร และอากาศ ทำให้ราก่อโรคขาดสารอาหาร เจริญเติบโตช้าลง และไม่สามารถเข้าทำลายต้นพืชได้ 2) การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) โดยจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของราก่อโรคได้ 3) การเป็นปรสิต

(parasitism) ด้วยวิธีที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เจริญอยู่ในบริเวณที่มีราก่อโรค แล้วจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะเข้าทำลายราก่อโรคเพื่อแย่งชิงอาหารและสารที่มีประโยชน์จากราก่อโรค และ 4) โดยการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการคัดแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรค เนื่องจากดินเป็นทรัพยากรที่อุดมสมบูรณ์มาก อีกทั้งยังเป็นแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรียนานาชนิด และแบคทีเรียในดินจำนวนมากสามารถผลิตสารต่อต้านการเจริญของราได้ แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้รับการศึกษากลไกการควบคุมโรคพืชมากที่สุดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Streptomyces* (พรพรรณ อู่สุวรรณ, 2550)

งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกหาแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในปทุมมา โดยคัดเลือกจากแบคทีเรีย 10 ไอโซเลตจากดินในจังหวัดกาญจนบุรีที่คัดแยกไว้โดยคงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549) ประกอบด้วยไอโซเลต N1, N3, N9, M10, M15, M22, M23, M25, M26 และ M27 ซึ่งพบว่ายับยั้งราได้หลายชนิด รวมทั้ง *Colletotrichum capsici* และ *Fusarium* sp. ที่ก่อโรคในมะเขือเทศ (ประภาศรี ศรีคง, 2552) ได้ แล้วหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารออกฤทธิ์นั้น และสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา เพื่อนำแบคทีเรียและสารออกฤทธิ์ที่สร้างขึ้นไปพัฒนาใช้ในการควบคุมราดังกล่าวต่อไป

**วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งรา *Curvularia* sp. ที่คัดแยกจากปทุมมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 2

# ปริทรรศน์วรรณกรรม

## ปทุมมา

ปทุมมาเป็นไม้ดอกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma alismatifolia* จัดเป็นพืชพื้นเมืองที่อยู่ในวงศ์ขิงข่า (Zingiberaceae) สกุลขมิ้น (Curcuma) มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบอินโดจีน เช่น อินเดีย เนปาล ศรีลังกา อินโดนิเซีย พม่า เวียดนาม กัมพูชา ลาว และไทย (สุรชาติ คูอาริยะกุล, 2543; มนัสวี ฉายผาด และ วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, 2549) สำหรับประเทศไทยพบเห็นปทุมมาได้ทั่วทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในเขตภาคเหนือ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน พะเยา และบริเวณอุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง จ.พิษณุโลก (วิภาดา ทองทักษิณ และ นิพัฒน์ สุขวิบูลย์, 2537) ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ บริเวณอุทยานแห่งชาติป่าหินงาม จ.ชัยภูมิ จะมีความหลากหลายทางสายพันธุ์มากที่สุด (นิพัฒน์ สุขวิบูลย์ และ วิภาดา ทองทักษิณ, 2545) จากรายงานพบว่าพืชในสกุลขมิ้นมีประมาณ 70 ชนิด ในขณะนี้พบประมาณ 30 ชนิด จึงถือได้ว่าประเทศไทยเป็นแหล่งพันธุกรรมของไม้ดอกสกุลนี้ (นิทยา อักษรเนียม, 2548) และจากการที่ปทุมมามีก้านช่อดอกยาวทำให้ดอกอยู่สูงกว่าใบ (รูปที่ 2.1) เมื่อใช้ตกแต่งเป็นไม้ดอกไม้ประดับหรือไม้กระถางแล้ว จะทำให้ดอกปทุมมาดูโดดเด่นมากยิ่งขึ้น

**รูปที่** 2.1 ต้นปทุมมาที่ใช้เป็นไม้ประดับหรือไม้กระถาง

**ความสำคัญของปทุมมา**

ปทุมมาเป็นไม้ดอกที่มีสีสันสวยงาม มีความหลากหลายทั้งทางด้านสีสันและรูปทรง ให้ผลผลิตต่อปีจำนวนมาก ในประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกปทุมมาเพื่อการส่งออกประมาณ 400 ไร่ สามารถผลิตหัวพันธุ์ได้ปีละไม่ต่ำกว่า 2 ล้านหัว พันธุ์ที่นิยมปลูกและส่งออกมากที่สุดคือ พันธุ์เชียงใหม่พิงค์ (อรวรรณ วิชัยลักษณ์, 2548) ก้านช่อดอกแข็งแรงทำให้มีอายุการปักแจกันนานประมาณ 7-14 วัน (วิภาดา ทองทักษิณ และ นิพัฒน์ สุขวิบูลย์, 2537) ปทุมมาที่ส่งออกยังต่างประเทศรู้จักกันในชื่อสยามทิวลิป (Siam tulip) ซึ่งลักษณะภายนอกดูคล้ายคลึงกับดอกทิวลิปของประเทศเนเธอร์แลนด์ ปัจจุบันปทุมมาจัดเป็นพืชใหม่ที่กำลังได้รับความนิยมจากตลาดต่างประเทศ โดยมีตลาดรองรับที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา นิวซีแลนด์ และกลุ่มประชาคมเศรษฐกิจยุโรป (EU) ถือเป็นตลาดที่มีกำลังซื้อสูง โดยประเทศเนเธอร์แลนด์จะให้ราคาดีกว่าประเทศอื่น ทั้งนี้ปทุมมาที่มีดอกสีชมพูเข้มจะเป็นที่ต้องการของตลาดทางฝั่งยุโรป ส่วนปทุมมาที่มีสีอ่อนจะเป็นที่นิยมของตลาดญี่ปุ่น ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศเดียวในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาที่มีคุณภาพและยังไม่พบข้อมูลคู่แข่งทางการค้าอีกด้วย ตลาดหลักกลุ่มดังกล่าวมีความต้องการหัวพันธุ์ปทุมมาสูงถึงปีละกว่า 3 ล้านหัว คิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 30 ล้านบาทต่อปี นับเป็นอันดับสองรองจากการส่งออกกล้วยไม้ และมีแนวโน้มความต้องการมากขึ้นทุกปี (กรมวิชาการเกษตร, 2542; กรมวิชาการเกษตร, 2545)

**สถานการณ์การผลิตและการตลาด**

ผลผลิตปทุมมาส่วนใหญ่ประเทศไทยจะส่งออกในรูปของหัวพันธุ์ ซึ่งมีข้อดีในแง่ของการขนส่งจำนวนมาก เก็บรักษาได้นานและดูแลง่ายกว่าดอกไม้สด นับจากปี พ.ศ. 2540-2547 สถานการณ์การส่งออกเริ่มดีขึ้นในปี พ.ศ. 2541-2547 มูลค่าการส่งออกคิดเป็น 16-29 ล้านบาท แบ่งเป็น 2 รูปแบบการส่งออกคือ หัวพันธุ์และดอกไม้สด (อรวรรณ วิชัยลักษณ์, 2548) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และ 2.2

**ตารางที่** 2.1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมา ปี 2540-2547

| ปี | ปริมาณ (หัวพันธุ์) | มูลค่า (บาท) |
|---|---|---|
| 2540 | 580,398 | 6,847,603 |
| 2541 | 1,344,103 | 24,355,450 |
| 2542 | 2,184,886 | 29,751,238 |
| 2543 | 2,884,367 | 26,515,360 |
| 2544 | 2,292,323 | 16,656,349 |
| 2545 | 2,080,976 | 16,870,588 |
| 2546 | 3,737,840 | 20,181,762 |
| 2547 | 3,870,068 | 24,871,170 |

**ตารางที่** 2.2 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกดอกปทุมมา ปี 2543-2547

| ปี | ปริมาณ (ดอก) | มูลค่า (บาท) |
|---|---|---|
| 2543 | 5,099 | 94,790 |
| 2544 | 11,325 | 51,371 |
| 2545 | 11,130 | 28,880 |
| 2546 | 25,954 | 51,055 |
| 2547 | 11,999 | 408,576 |

ที่มา : (อรวรรณ วิชัยลักษณ์, 2548)

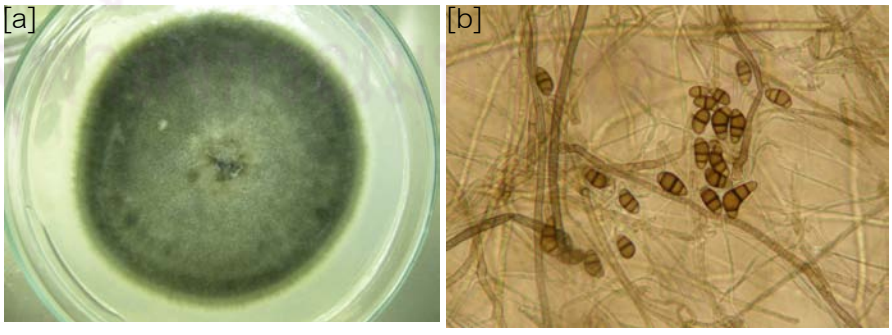
ส่วนตลาดภายในประเทศส่วนใหญ่จะจำหน่ายในรูปดอกไม้สดที่ใช้เป็นไม้ดอก ไม้ประดับ และไม้กระถาง นอกจากนี้พื้นที่เพาะปลูกยังขยายตัวจาก 82 ไร่ ในปี พ.ศ. 2539 เป็น 400 ไร่ ในปี พ.ศ. 2547 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปทุมมาเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ที่มีอนาคตสดใส ควรได้รับการผลักดันให้เป็นที่รู้จักมากขึ้นและควรได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีความหลากหลายเพื่อเป็นช่องทางในการเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรและประเทศ

**การเพาะปลูกและโรคระบาดสำหรับปทุมมา**

การเพาะปลูกปทุมมาจะเริ่มในเดือนเมษายนและจะออกดอกในช่วงฤดูฝนราวเดือนพฤษภาคมถึงตุลาคมซึ่งเป็นระยะที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่ เมื่อฤดูฝนสิ้นสุดลงจะเป็นเวลาที่ปทุมมาเข้าสู่ระยะพักตัวราวเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน และจะออกดอกอีกครั้งในฤดูฝนปีถัดไป ในฤดูฝนนี้เองที่การเพาะปลูกปทุมมามักประสบกับปัญหาการแพร่ระบาดของราก่อโรค เนื่องจากลมพายุและน้ำฝนเป็นตัวกลางที่ดีที่ทำให้ราก่อโรคแพร่ระบาดเป็นวงกว้าง พร้อมทั้งสภาพอากาศมีความชื้นสูงส่งผลให้ราเจริญได้ดี ราก่อโรคปทุมมามีหลายชนิด ได้แก่ *Phoma* sp. *Acremonium* sp. (สุรชาติ คูอาริยะกุล, 2542) *Sphaceloma* sp. (กรรณิการ์ เพี้ยนภักตร์ วิรัช ชูบำรุง และอภิรัชต์ สมฤทธิ์, 2541) หรือ *Curvularia* sp. ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้เป็นต้น

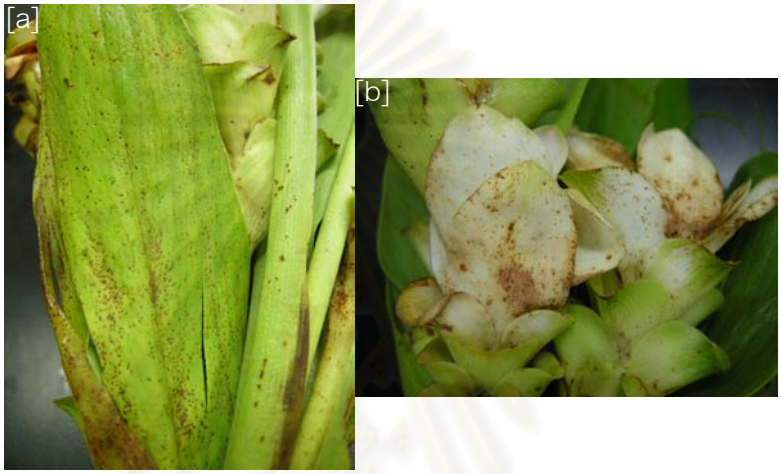
***Curvularia* sp.**

*Curvularia* sp. เป็นราดำ สมาชิกส่วนใหญ่ของราในสกุล *Curvularia* เป็นราที่ก่อโรคในดินและพืชในเขตร้อน ลักษณะโคโลนีของ *Curvularia* sp. บนอาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar) คือโตเร็วที่อุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส กลุ่มเส้นใยมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่สีขาว เมื่อมีอายุ 1 ถึง 3 วัน (รูปที่ 2.2 [a]) หลังจาก 3 วันแล้วเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มและกลายเป็นสีน้ำตาลเมื่อมีอายุมากกว่า 7 วัน จากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบเส้นใยมีสีน้ำตาลมีผนังกั้น เส้นใยแตกแขนงมากมาย ก้านชูโคนิเดียตั้งตรงมีโคนิเดียหรือสปอร์เป็นกลุ่มอยู่บริเวณปลายสุด โคนิเดียมีสีเขียวเข้มถึงสีน้ำตาล รูปร่างโค้ง ป่องตรงกลาง มีผนังกั้นแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ส่วนตรงกลางมีขนาดใหญ่และสีเข้มที่สุด (Larone, 1995; St-Germain และ Summerbell, 1996; Sutton และคณะ, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 [b]




**รูปที่** 2.2 ลักษณะโคโลนี [a] และสปอร์ของ *Curvularia* sp. ที่คัดแยกได้ [b]

*Curvularia* sp. ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคใบจุดหรือโรคจุดสีน้ำตาล อาการของโรคจะปรากฏได้ทั้งที่ใบ ก้านช่อดอก (รูปที่ 2.3 [a]) และกลีบดอก (รูปที่ 2.3 [b]) เห็นเป็นจุดสีน้ำตาลเล็กๆจำนวนมากอยู่กระจัดกระจาย เมื่ออาการของโรคลุกลามจะเห็นรอยจุดกลายเป็นปื้นคล้ายแผลไหม้ นอกจากนี้ยังพบว่า *Curvularia* sp. สามารถก่อโรคใบจุดในขิงซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับปทุมมาได้อีกด้วย (นิพนธ์ ทวีชัย และคณะ, 2542)




**รูปที่** 2.3 อาการโรคใบจุดหรือโรคจุดสีน้ำตาลในปทุมมาที่บริเวณใบและก้านช่อดอก [a] และที่บริเวณกลีบดอก [b]

**การแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากรา *Curvularia* sp.**

การแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากรา *Curvularia* sp. นั้น พบการระบาดในช่วงที่ปทุมมาเข้าสู่ระยะพักตัว หากไม่เก็บทำลายซากพืชที่หลงเหลือในแปลงเพาะปลูก ราจะอาศัยอยู่บนเศษซากพืชนั้นได้เป็นเวลานานนับปี เมื่อเข้าสู่ฤดูฝนปีถัดไป สปอร์ที่ราสร้างขึ้น จะปลิวกระจายออกไปตามส่วนต่างๆของแปลงเพาะปลูกโดยแรงลมและน้ำฝน เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม (ความชื้นสูงและอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส) สปอร์จะงอกและสร้างความเสียหายให้กับปทุมมาต้นอื่นๆต่อไปในเวลาอันรวดเร็ว

**การป้องกันและการกำจัดราโรคพืช**

เมื่อสิ้นสุดฤดูเพาะปลูกแล้ว เกษตรกรจะต้องเก็บทำลายเศษซากพืชทั้งหมดที่เหลือในแปลงเพาะปลูกแล้วจึงรวบรวมเผา ไถพรวนหน้าดิน และปลูกพืชหมุนเวียนก่อนที่ฤดูเพาะปลูกปีถัดไปจะมาถึง อาจใส่ปูนขาวหรือปุ๋ยหมักเพื่อปรับปรุงคุณภาพดิน ส่วนวิธีที่นิยมกันมากคือการพ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืชเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรค สารป้องกันกำจัดราก่อโรคในปทุมมาที่ใช้ได้ผลดีคือ ไดฟีโนโคนาโซล คาร์เบนดาซิม แมนโคเซบ หรือบีโนมิล โดยจะต้องฉีดพ่นทั้งก่อนและหลังการเพาะปลูก (อรวรรณ วิชัยลักษณ์, 2548)

ถึงแม้ว่าการใช้สารเคมีจะได้ผลดี แต่ก็มีผลเสียต่างๆหลายประการเกิดขึ้นด้วย เช่น สารเคมีที่ใช้ตกค้างในสิ่งแวดล้อมทั้งในดินและในน้ำที่อยู่รอบบริเวณแปลงเพาะปลูก ทั้งนี้อาจรวมไปถึงน้ำใต้ดินที่จะนำไปใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันของคน เป็นผลเสียต่อสุขภาพของเกษตรกรเนื่องจากต้องฉีดพ่นสารเคมีเป็นเวลานานโดยเฉพาะในช่วงที่ราก่อโรคมีแนวโน้มว่าจะเกิดการระบาด โดยคาร์เบนดาร์ซิมจะเข้าไปขัดขวางการทำงานของฮอร์โมนภายในร่างกาย (Yu และคณะ, 2009) ในขณะที่ไทรอยด์จะได้รับผลกระทบโดยตรงจากการใช้แมนโคเซบในปริมาณมาก ทำให้ไทรอยด์มีขนาดใหญ่ขึ้นและเปลี่ยนแปลงการทำงานของฮอร์โมนจากไทรอยด์ (Goldner และคณะ, 2010) ส่วนบีโนมิลมีผลต่อระบบสืบพันธุ์หรือทำให้พัฒนาการทางร่างกายของทารกผิดปกติ (Hellman และ Laryea, 1990) และไดฟีโนโคนาโซลซึ่งอาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ (US EPA, 1998) นอกจากนี้ราก่อโรคอาจมีพัฒนาการในการปรับตัวให้ทนต่อสารเคมี ทำให้ต้องเพิ่มปริมาณการใช้สารเคมี ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่ใช่เป้าหมายของสารเคมีได้รับผลกระทบตามไปด้วย และทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลของระบบนิเวศต่อไปในระยะยาว

ด้วยวิธีการเกษตรที่พึ่งพาการใช้สารเคมีเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เกิดผลกระทบต่อคน สัตว์และสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันจึงมีผู้ให้ความสนใจศึกษาการใช้วิธีทางชีวภาพในการป้องกันกำจัดโรคพืชกันมากขึ้น วิธีการที่ยังคงศึกษากันอยู่อย่างต่อเนื่องคือการค้นหาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตสารต่อต้านราก่อโรค เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่พึ่งพาการใช้สารเคมี ไม่รบกวนระบบนิเวศ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และมีความปลอดภัยต่อเกษตรกร

**วิธีการทางชีวภาพ** (Biological control)

วิธีการทางชีวภาพ คือ การควบคุมปริมาณหรือลดกิจกรรมของราก่อโรคให้อยู่ในระดับที่ไม่ส่งผลเสียหายต่อการเพาะปลูกพืช โดยอาศัยการทำงานของสิ่งมีชีวิตหรือผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิตและให้ธรรมชาติจัดการกันเอง (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2544) ซึ่งวิธีทางชีวภาพประกอบด้วยหลายวิธี ได้แก่

1. การแก่งแย่ง (Competition)

การแก่งแย่งเกิดจากการใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรคเพื่อเข้าไปแย่งชิงถิ่นที่อยู่ อาหาร และอากาศ ทำให้ราก่อโรคขาดสารอาหาร เจริญเติบโตช้าลง และไม่สามารถเข้าทำลายต้นพืชได้ เช่น ราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากต้นโกโก้จะทำงานต่อต้านการบุกรุกของ *Moniliophthora roreri, Moniliophthora perniciosa* และ *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นราก่อโรคในโกโก้ โดยการแย่งชิงอาหารของราทำให้ราอ่อนแอลงในที่สุด (Mejia และคณะ, 2008) หรือการผลิตสารที่เป็นพิษต่อราก่อโรค เช่น *Trichoderma harzianum* ที่คัดแยกได้จากฝักโกโก้ที่เป็นโรคสามารถผลิตและหลั่งกรดโนนะโนอิก (Nonanoic acid) ได้ ซึ่งกรดโนนะโนอิกยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยรา *Crinipellis perniciosa* และ *M. roreri* ที่ก่อโรคในโกโก้ได้ที่ความเข้มข้นต่ำ การงอกของสปอร์ราทั้ง 2 ชนิดถูกยับยั้งได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเจริญของเส้นใยถึงแม้จะไวต่อกรดโนนะโนอิกแต่ยังคงถูกยับยั้งได้ 75 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน ในทางกลับกันกรดโนนะโนอิกไม่มีผลกระทบต่อ *T. harzianum* ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (Aneja และคณะ, 2005)

2. การสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiosis)

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของราก่อโรคได้ Leelasuphakul และคณะ (2008) ได้ศึกษาการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจาก *Bacillus subtilis* ที่มีผลต่อรา *Penicillium digitatum* ซึ่งก่อโรคในพืชตระกูลส้ม สารที่ผลิตจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ 155 ยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้สูง 84 ถึง 99.95 เปอร์เซ็นต์ถึงแม้จะถูกเจือจาง 32 เท่าแล้วก็ตาม เมื่อนำส่วนเจือจาง 32 เท่าไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีแล้ว สารนี้ยังคงยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ 99.95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของสารนี้คือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเลือกผ่านสารของเยื่อหุ้มเซลล์ (permeability) เปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของลิปิด เส้นใยบวมพองและสปอร์บิดเบี้ยวผิดรูป เมื่อทดสอบการเกิดโรคในผลส้มโดยการหยดสปอร์แขวนลอยของ *P. digitatum* ลงบนแผลจะทำให้เกิดโรคภายใน 3 วันและเน่าภายใน 5 วัน แต่เมื่อหยดเอนโดสปอร์แขวนลอยของ *B. subtilis* ลงบนแผลก่อนการ

หยดสปอร์แขวนลอยของราจะช่วยลดอุบัติการณ์เกิดโรคลงได้ 86.7 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการเกิดโรคในวันที่ 6 และผลเน่าในวันที่ 9

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของราก่อโรคได้ โดยสารสำคัญที่ผลิตโดย *Bacillus* ได้แก่ อิทูริน (Iturin) เฟนจิซิน (Fengycin) หรือเซอร์แฟคทิน (Surfactin) (Leelasuphakul และคณะ, 2008) ซึ่งอิทูรินจัดเป็นสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพ มีโครงสร้างเป็นไลโพเพปไทด์ลักษณะเป็นวง (Cyclic lipopeptide) ผลิตโดย *B. subtilis* (Rahman และคณะ, 2006) Yu และคณะ (2002) ค้นพบว่า *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ B94 ก็สามารถผลิตอิทูรินได้เช่นเดียวกับ *B. subtilis* เนื่องจากมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และนอกจากนี้ยังพบว่าอิทูรินจาก *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ B94 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของรา *Rhizoctonia solani* ได้ โดยที่อิทูรินมีความเสถียรเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน หรือการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที มีผลทำให้แอกทิวิตีของอิทูรินลดลงเพียง 40 เปอร์เซ็นต์ และทนค่า pH ได้ตั้งแต่ 3 ถึง 11 นอกจากนี้ยังพบว่า *B. pumilus* สายพันธุ์ HY1 ที่คัดแยกได้จากถังหมักซอสถั่วเหลืองเกาหลีก็สามารถผลิตอิทูรินที่ยับยั้งการเจริญของรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* ซึ่งเป็นราที่สร้างอะฟลาทอกซินและมักพบว่าปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการหมักซอสและอิทูรินยังสามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินจากราทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ด้วยโดยที่อิทูรินความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลดการสร้างสารพิษจาก *A. flavus* และที่ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลดการสร้างสารพิษจาก *A. paraciticus* (Cho และคณะ, 2009)

3. การเป็นปรสิต (Parasitism)

การเป็นปรสิตเป็นวิธีที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เจริญอยู่ในบริเวณที่มีราก่อโรค แล้วจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะเข้าทำลายราก่อโรคเพื่อแย่งชิงอาหารและสารที่มีประโยชน์จากราก่อโรค การเป็นปรสิตมี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เรียกว่า necrotrophic mycoparasite เป็นกลุ่มที่ต้องทำลายราก่อโรคแล้วนำสารอาหารจากเส้นใยหรือสปอร์มาใช้ในการดำรงชีวิต วิธีการทำลายเกิดจากการสร้างเอนไซม์เช่น ไคติเนสหรือกลูคาเนส ไปย่อยสลายผนังเซลล์ของราก่อโรค และกลุ่มที่ 2 เรียกว่า biotrophic mycoparasite เป็นกลุ่มที่แทงเส้นใยเข้าไปภายในเซลล์ของราก่อโรคเพื่อรับสารอาหารโดยไม่ทำให้ราก่อโรคตาย (พรพรรณ อู่สุวรรณ, 2550) การเป็นปรสิตมักพบในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สร้างเอนไซม์ไปย่อยสลายองค์ประกอบภายในผนังเซลล์ของราก่อโรคซึ่งเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผลิตได้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ไคติเนสและกลูคาเนส

1) ไคติเนส (Chitinase)

ไคติเนสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพสำหรับควบคุมราก่อโรคพืช ซึ่งไคติเนสจะย่อยสลายองค์ประกอบของไคตินที่ผนังเซลล์ราก่อโรคโดยการทำลายที่พันธะ β-1,4-glycosidic linkage ได้เป็น N-acetylglucosamine (Felse และ Panda, 1999) ทำให้มีผลต่อการเจริญของราโดยเฉพาะที่บริเวณปลายเส้นใย (Gunarantna และ Balasubramanian, 1994) การใช้ประโยชน์จากไคติเนสสามารถทำได้ทั้งทางตรงในการควบคุมราก่อโรคพืชและทางอ้อมคือการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ก่อนนำไปใช้งาน (Oppenheim และ Chett, 1992) ตัวอย่างเช่น *B. cereus* สายพันธุ์ 28-9 ที่คัดแยกได้จากดินในบริเวณแปลงเพาะปลูกดอกลิลลี่ สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่ยับยั้งการเจริญของรา *Botrytis elliptica* ซึ่งเป็นราก่อโรคที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคใบไหม้ในลิลลี่ ผู้วิจัยได้โคลนยีน ChiCW ที่ประมวลรหัสให้ไคติเนส แล้วนำไปแสดงออกใน *Escherichia coli* DH5α จากนั้นทำบริสุทธิ์เอนไซม์แล้วนำไปทดสอบกับราดังกล่าว พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *B. elliptica* ได้ถึง 84 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์เมื่อบ่มร่วมกับไคติเนสคือ สปอร์จะบวมใหญ่ขึ้นและเส้นใยไม่สามารถงอกได้ยาวตามปกติเนื่องจากไคติเนสไปยับยั้งให้เส้นใยงอกได้ช้าลง (Huang และคณะ, 2005) นอกจากนี้ Wang และคณะ (2006) ได้นำ *B. subtilis* สายพันธุ์ W118 มาศึกษาความสามารถในการผลิตไคติเนสเพื่อควบคุมการเจริญของรา *Fusarium oxysporum* โดยการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตและพบว่าไคติเนสบริสุทธิ์ที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของรา *F. oxysporum* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเติมสารละลายเอนไซม์บริสุทธิ์ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยง 1 วัน แต่ความสามารถของเอนไซม์จะลดลงเมื่อเพิ่มเวลาในการบ่มเนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ W118 นี้ไม่ทนต่อความร้อน โดยความสามารถของเอนไซม์ลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มร่วมกับราเป็นเวลา 3 วัน แตกต่างจากไคติเนสที่ผลิตจาก *B. thuringiensis* subsp. *colmeri* ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา 4 ชนิด ได้แก่ *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium chrysogenum* และ *Physalospora piricola* ซึ่งไคติเนสมีแอกทิวิตีดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่เวลา 72 ชั่วโมงโดยยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *R. solani* และ *B. cinerea* ได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่มีผลต่อ *P. chrysogenum* และ *P. piricola* เพียงเล็กน้อย (Liu และคณะ , 2010)

2) กลูคาเนส (Glucanase)

กลูคาเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์ราก่อโรคชนิดกลูแคนโดยการทำลายที่พันธะ β-glucosidic linkage ได้เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 สามารถผลิตเอนไซม์บีตา-1,3-กลูคาเนสและสารปฏิชีวนะที่ไปยับยั้งการเจริญของ

ราที่ก่อโรคในข้าว 2 ชนิด คือ *Pyricularia grisea* และ *Rhizoctonia solani* ได้ สารยับยั้งการเจริญของราทนความร้อนเนื่องจากหลังการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาทีแล้วยังคงมีแอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของราทั้ง 2 ชนิด กลไกการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งราคือ ทำให้เส้นใยเกิดการบวมอย่างผิดปกติ บริเวณปลายเส้นใยถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์และรบกวนการงอกของโคนิเดียและสเคลอโรเตียม แสดงให้เห็นว่าเป้าหมายของสารยับยั้งราอยู่ที่ผนังเซลล์โดยเฉพาะที่บริเวณปลายสุดของเส้นใยซึ่งประกอบไปด้วยไคติน บีตา-กลูแคนและโอลิโกแซ็กคาไรด์อื่นๆ ดังนั้นเอนไซม์บีตา-1,3-กลูคาเนสจึงมีส่วนสำคัญในการควบคุมการเจริญของรา (Leelasuphakul และคณะ, 2006)

4. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induced disease resistance)

ตัวอย่างการควบคุมทางชีวภาพโดยการชักนำให้เกิดความต้านทานโรค ได้แก่ *B. vallismortis* สายพันธุ์ EXTN-1 สามารถยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวในมะเขือเทศที่เกิดจาก *Ralstonia solanacearum* ได้ (Park และคณะ, 2007) ด้วยกลไกการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อแบคทีเรียโดยผนังเซลล์ของพืชที่ถูกเปลี่ยนแปลงไปมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของ *R. solanacearum* ภายในเนื้อเยื่อพืชหยุดชะงัก (Nakaho และคณะ, 2000) หรือทำให้อัตราการแพร่กระจายของแบคทีเรียในมะเขือเทศเกิดขึ้นได้ช้าลง (Grimault และคณะ, 1994)

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการคัดแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรค เนื่องจากดินเป็นทรัพยากรที่อุดมสมบูรณ์มาก อีกทั้งยังเป็นแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรียนานาชนิด และแบคทีเรียในดินจำนวนมากสามารถผลิตสารต่อต้านการเจริญของราได้ แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้รับการศึกษากลไกการควบคุมโรคพืชมากที่สุดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Streptomyces* (พรพรรณ อู่สุวรรณ, 2550)

***Bacillus* spp.**

วงศ์ Bacillaceae ประกอบด้วยสมาชิก 2 กลุ่มใหญ่คือ แบคทีเรียที่เจริญในที่ไม่มีอากาศและสร้างสปอร์ได้ในสกุล *Clostridium* และแบคทีเรียที่เจริญในที่มีอากาศและไม่มีอากาศและสร้างสปอร์ได้ในสกุล *Bacillus* *Bacillus* spp. มีรูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก ติดสีแกรมบวกสร้างสปอร์ในภาวะที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศ สปอร์มีความคงทนต่อความร้อน ความเย็น ความแห้งแล้ง รังสี และสารฆ่าเชื้อ โดยสร้าง 1 สปอร์ต่อ 1 เซลล์ซึ่งมีตำแหน่งการสร้างสปอร์ที่แตกต่างกันไป เช่น อยู่ที่ปลายสุดด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ค่อนไปทางปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ หรืออยู่

ตรงกลางเซลล์ ขึ้นกับสปีชีส์ (สุรางค์ สุธิราวุธ, 2538) โครงสร้างภายในสปอร์ประกอบด้วยชั้นด้านในสุดคือ ชั้นโพรโทพลาสต์มีกรดไดพิโคลินิกเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้สปอร์ทนต่อความร้อน ถัดออกไปคือคอร์เทกซ์เป็นชั้นที่มีเพปทิโดไกลแคนอยู่ปริมาณมากมีผลให้สปอร์ทนต่อความร้อนและรังสี ชั้นเยื่อหุ้มสปอร์ด้านในและด้านนอกมีปริมาณเป็นครึ่งหนึ่งของสปอร์เพื่อปกป้องสปอร์จากสารเคมีและเอนไซม์ การสร้างสปอร์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิและค่า pH ต้องอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญของเซลล์ปกติ สารที่มีส่วนประกอบของคาร์บอนและไนโตรเจน สปอร์ที่สร้างขึ้นภายใต้ภาวะที่แตกต่างกันจะมีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมได้ต่างกัน สมาชิกในสกุล *Bacillus* มีลักษณะทางสรีรวิทยาแตกต่างกันมากมายเพื่อประโยชน์ในการปรับตัวและอยู่รอดในสิ่งแวดล้อม *Bacillus* spp. เป็นพวกแซโพรไฟต์มีทั้งแบบดำรงชีวิตอิสระและเป็นเชื้อก่อโรค พบทั่วไปในดิน น้ำ อากาศ และตามพืชผักต่างๆ สามารถมีชีวิตในสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ เช่น ในทะเลทราย (Zhang และคณะ, 2011) น้ำพุร้อน (Alam และคณะ, 2011) ไปจนถึงดินในเขตอาร์กติก (Ruger และคณะ, 2000) ทั้งในน้ำจืดหรือน้ำเค็ม (Zhang และคณะ, 2010) พบเป็นได้ทั้งพวกทนร้อน ทนเย็นและทนเค็ม การจัดจำแนกแบคทีเรียในวงศ์ Bacillaceae เบื้องต้นอาศัยการทดสอบด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมีเนื่องจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เกือบทั้งหมดสร้างเอนไซม์แคทาเลสได้ในขณะที่แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* ไม่สร้างเอนไซม์นี้ (Turnbull, 1996)

**บทบาทสำคัญของ *Bacillus* spp. ทางเกษตรกรรม**

*Bacillus* spp. หลายสายพันธุ์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 โดยสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่ผลิตได้เป็นพวกพอลิเพปไทด์น้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น *B. brevis* ผลิตแกรมิซิดินและไทโรซิดิน *B. licheniformis* ผลิตเบซิตราซิน หรือ *B. subtilis* ผลิตมัยโคบาซิลิน บาซิลัยซินและซับทิลิน เป็นต้น (Mannanov และ Sattarova, 2001)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่** 2.3 ตัวอย่างแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่ผลิตสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ

| สายพันธุ์ของ *Bacillus* sp. | สารปฏิชีวนะ | สายพันธุ์ของ *Bacillus* sp. | สารปฏิชีวนะ |
|---|---|---|---|
| *Bacillus brevis* | Gramicidin S | *Bacillus subtilis* | Mycobacillin |
| | Tyrocidine | | Subtilin |
| | Brevin | | Bacilysin |
| | Edeine | | Bacillomycin |
| | Eseine | | Fungistatin |
| | Bresseine | | Bulbiformin |
| | Brevistin | | Bacillin |
| *Bacillus polymyxa* | Polymyxin | | Subsporin |
| | Colistin | | Bacillocin |
| | Gatavalin | | Mycosubtilin |
| | Jolipeptin | | Fungocin |
| *Bacillus mesentericus* | Esperin | | Iturin |
| *Bacillus thiaminolyticus* | Octopytin (Thianosine) | | Neocidin |
| | | | Eumycin |
| | Baciphelacin | | |
| *Bacillus licheniformis* | Bacitracin | *Bacillus pumilis* | Micrococcin P |
| | Licheniformin | | Pumilin |
| | Proticin | | Tetain |
| *Bacillus circulans* | Butirosin | *Bacillus laterosporus* | Laterosporamine |
| | Circulin | | Laterosporin |
| | Polypeptin | *Bacillus cereus* | Biocerin |
| | EM-49 | | Cerexin |
| | Xylostatin | | Thiocillin |

ที่มา : (Katz และ Demain, 1977)

*Bacillus* spp. หลายสายพันธุ์แสดงแอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของศัตรูพืชและราก่อโรค หรือช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ บางสายพันธุ์ได้รับการพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าสำหรับกำจัดราก่อโรค แมลง หรือหนอนพยาธิ การพัฒนา *Bacillus* spp. เพื่อใช้ในงานด้านการเกษตรอาศัยกลไก 3 อย่าง ได้แก่ 1) การเป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรค 2) ส่งเสริมการเจริญของพืชเจ้าบ้านโดยเพิ่มการดูดซึมสารอาหารให้พืช และ 3) กระตุ้นให้พืชมีความต้านทานต่อราก่อโรค แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* แสดงความเป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรคโดยการสร้างสารพิษไปยับยั้งการเจริญและแอกทิวิตีของราก่อโรค ซึ่ง *B. subtilis* ได้ถูกนำมาศึกษากลไกนี้มากที่สุด นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์อื่นๆที่มีความสามารถเช่นเดียวกับ *B. subtilis* ได้แก่ *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides* และ *B. pumilus* (Gardener, 2004)

Kim และ Chung (2004) ทดสอบโดยใช้ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ MET0908 เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสในแตงโมที่เกิดจากรา *Colletotrichum lagennarium* โปรตีนจากแบคทีเรียมีความสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ โดยเส้นใยจะเกิดการบวมอย่างผิดปกติในวันแรกที่มีการเติมโปรตีนเข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยงและเส้นใยจะถูกย่อยสลายภายใน 2 วัน เมื่อทำบริสุทธิ์โปรตีนแล้วตรวจสอบการแพร่กระจายของโปรตีนภายในเส้นใยด้วยการติดฉลากโปรตีนด้วยฟลูออเรสซีนไอโซไทโอไซนาเนต (Fluorescien isothiocyanate; FITC) จากสัญญาณการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนต์พบโปรตีนบริสุทธิ์สะสมอยู่ที่บริเวณผนังกั้นของเส้นใย ในขณะที่เส้นใยที่ไม่ได้เติมโปรตีนบริสุทธิ์ลงไปจะตรวจไม่พบสัญญาณการเรืองแสง โปรตีนนี้ทนความร้อนได้สูงถึง 70 องศาเซลเซียส และความสามารถของโปรตีนจะลดลงเล็กน้อยที่ 80 ถึง 100 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ MET0908 นอกจากจะผลิตโปรตีนได้แล้วยังผลิตบีตา-1,3-กลูคาเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลายองค์ประกอบภายในผนังเซลล์ของรา แสดงให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนอยู่ที่ผนังเซลล์ของรานั่นเอง

โปรตีนที่ผลิตจาก *B. polymyxa* สายพันธุ์ VLB16 สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Pyricularia grisea* ที่ก่อโรคเหี่ยวและ *Rhizoctonia solani* ที่ทำให้เกิดโรคกาบใบไหม้ในข้าวได้ โดย *P. grisea* ถูกยับยั้งได้มากถึง 93.4 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของสปอร์จะกลายเป็นสีดำและเกิดการหดตัว ส่วนเส้นใยจะบิดเบี้ยวผิดรูป ในขณะที่สเคลอโรเตียมของ *R. solani* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เนื่องจากตรวจไม่พบการงอกของสเคลอโรเตียมหลังจากเติมโปรตีนไปแล้ว 7 วัน โปรตีนทนความร้อนได้ตั้งแต่ 30 ถึง 100 องศาเซลเซียส แม้กระทั่งอุณหภูมิที่ใช้สำหรับนึ่งฆ่า

เชื้อจุลินทรีย์ (121 องศาเซลเซียส 15 นาที) ก็ไม่ทำให้ความสามารถของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป (Kavitha และคณะ, 2005)

Bacisubin เป็นโปรตีนที่ผลิตโดย *B. subtilis* สายพันธุ์ B-196 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น ที่ความเข้มข้น 0.055 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งรา *Alternaria brassicae*, ที่ 0.087 ไมโครโมลาร์ ยับยั้ง *Alternaria oleracea*, ที่ 2.74 ไมโครโมลาร์ ยับยั้ง *Botrytis cinerea* และที่ 4.01 ไมโครโมลาร์ ยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ซึ่ง Bacisubin มีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *R. solani* มากที่สุด โดยทำให้ปลายเส้นใยแตกแขนง บิดเบี้ยว และบวมพองหลังจากทดสอบกับ Bacisubin เข้มข้น 2.02 ไมโครโมลาร์ นาน 24 ชั่วโมง (Liu และคณะ, 2007)

*B. vallismortis* สายพันธุ์ ZZ185 ผลิตโปรตีน Bacillomycin D ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Alternaria alternat*a ได้ 94 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการเจริญของ *Fusarium graminearum* ได้ 86 เปอร์เซนต์ โดยที่โปรตีนนี้สามารถทนต่อค่า pH ได้ตั้งแต่ 1 ถึง 8 แต่แอกทิวิตีจะลดลงเมื่ออยู่ในภาวะเป็นเบส นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนทนต่อความร้อนได้สูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อทดสอบแอกทิวิตีของ Bacillomycin D ในพืช เปรียบเทียบกับสารควบคุมรา Chlorothalonil ที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมี และสารปฏิชีวนะชนิด Jinggangmycin พบว่าอาการของโรคในพืชที่ทดสอบด้วย Bacillomycin D จะมีความรุนแรงน้อยกว่าพืชที่ทดสอบด้วย Chlorothalonil และ Jinggangmycin (Zhao และคณะ, 2010)

E2 เป็นโปรตีนยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ EDR4 สามารถลดการเจริญของเส้นใยของ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ได้ 61.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดพบว่าโปรตีนทำให้เส้นใยเจริญอย่างผิดปกติโดยเฉพาะบริเวณที่จะเกิดการแตกแขนงมีความหนาเพิ่มมากขึ้น บริเวณปลายสุดของเส้นใยเกิดการบวมพอง เส้นใยบิดเบี้ยวและมีโปรตีน E2 รั่วออกมา โปรตีน E2 จัดเป็นโปรตีนที่ออกฤทธิ์ได้กว้างเนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของราได้อีกหลายชนิด ได้แก่ *Macrophoma kuwatsukai*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia cerealis* และ *Botrytis cinerea* (Liu และคณะ, 2010)

โรคมัมมี่เบอร์รี่เป็นโรคที่สำคัญของดอกบลูเบอร์รี่ซึ่งเกิดจากรา *Monilinia vaccinii-corymbosi* กระบวนการเกิดมัมมี่เกิดจากสปอร์ของราปลิวไปตกยังเกสรตัวเมียแล้วงอกเข้าไปในก้านชูเกสรตัวเมียในระยะเวลา 4-7 วัน สร้างความเสียหายอย่างมากในอเมริกาเหนือ (Scherm

และคณะ, 2004) ได้มีการนำ *B. subtilis* สายพันธุ์ QRD137 ที่มีชื่อทางการค้าว่า Serenade มาใช้เพื่อควบคุมโรคมัมมี่เบอร์รี่ ซึ่ง Serenade ยับยั้งไม่ให้เส้นใยรางอกเข้าไปยังก้านชูเกสรตัวเมีย กลไกการทำงานของ Serenade คือการปลดปล่อยสารออกมายับยั้งการเจริญของราก่อโรค อาจรวมถึงการแก่งแย่งสารอาหารที่บริเวณติดเชื้อหรือการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อราก่อโรค และการผสมพันธุ์บลูเบอร์รี่บางครั้งจำเป็นต้องอาศัยน้ำผึ้งช่วยให้เกิดการถ่ายละอองเรณู อย่างไรก็ตามน้ำผึ้งมักจะเป็นพาหะทำให้ดอกบลูเบอร์รี่เกิดการติดเชื้อ เกิดเป็นโรคมัมมี่เบอร์รี่ในที่สุด ด้วยเหตุนี้ Dedej และคณะ (2004) จึงได้ประยุกต์ใช้ Serenade กับน้ำผึ้งเพื่อป้องกันการติดเชื้อในระหว่างกระบวนการถ่ายละอองเรณู ซึ่งสามารถลดอัตราการเกิดโรคลงได้อีกทั้งยังลดการติดเชื้อที่ดอกเมื่อใช้น้ำผึ้งเป็นตัวช่วยถ่ายละอองเรณู

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *B. subtilis* ที่คัดแยกได้หลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของรา *B. cinerea* ที่ก่อโรคใบและดอกไหม้ในกุหลาบได้อย่างสมบูรณ์อีกด้วย (Tatagiba และคณะ, 1998)

ไม่เพียงแต่ *Bacillus* sp. เท่านั้นที่ผลิตโปรตีนหรือเพปไทด์ได้ ยังมีงานวิจัยที่ค้นพบว่าแบคทีเรียชนิดอื่นก็ผลิตโปรตีนได้ด้วย เช่น *Lactobacillus paracaesei* subsp. *tolelans* ผลิตโปรตีนที่เป็นพิษต่อ *Fusarium proliferatum* และ *Fusarium graminearum* ทำให้ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ (Hassan และ Bullerman, 2008)

เพื่อให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด จำเป็นต้องมีการแปรผันปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อแอกทิวิตีในการเลี้ยงแบคทีเรีย (Leelasuphakul และคณะ, 2006) ตัวอย่างเช่น Moita และคณะ (2005) ได้แปรผันปัจจัยในการเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ CCMI 355 เพื่อให้ผลิตเมแทบอไลต์ที่มีผลยับยั้งการเจริญของรา โดยแปรผันค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และอัตราการให้อากาศ พบว่าที่ค่า pH เท่ากับ 6 อุณหภูมิระหว่าง 27 ถึง 34 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศ 120 รอบต่อนาที ทำให้แบคทีเรียเจริญได้มากที่สุด ส่วนค่า pH เท่ากับ 7 ถึง 8 อุณหภูมิระหว่าง 28 ถึง 34 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศ 60 รอบต่อนาที ทำให้แบคทีเรียเกิดการสร้างสปอร์ได้ดีที่สุด ในขณะที่ค่า pH เท่ากับ 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการให้อากาศจะทำให้แบคทีเรียผลิตเมแทบอไลต์ที่ยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด Patel และคณะ (2004) ได้แปรผันภาวะในการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* สายพันธุ์ BC98 โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ค่า pH

เท่ากับ 5.8 และอัตราการให้อากาศ 150 รอบต่อนาที ส่งผลให้แบคทีเรียผลิตสารยับยั้งการเจริญของราได้มากขึ้น 30 เท่าเมื่อเทียบกับภาวะที่ยังไม่ได้แปรผัน

จากตัวอย่างดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช และมีศักยภาพนำมาใช้ในการควบคุมการเกิดโรคในพืชที่มีสาเหตุจากราได้ งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกหาแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในปทุมมา โดยคัดเลือกจากแบคทีเรีย 10 ไอโซเลตจากดินในจังหวัดกาญจนบุรีที่คัดแยกไว้โดย คงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549) ประกอบด้วยไอโซเลต N1, N3, N9, M10, M15, M22, M23, M25, M26 และ M27 ซึ่งพบว่ายับยั้งราได้หลายชนิด รวมทั้ง *Colletotrichum capsici* และ *Fusarium* sp. ที่ก่อโรคในมะเขือเทศ (ประภาศรี ศรีคง, 2552) เมื่อได้แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งราที่ก่อโรคในปทุมมาแล้ว จึงนำมาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารออกฤทธิ์ และสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา เพื่อนำแบคทีเรียและสารออกฤทธิ์ที่สร้างขึ้นไปพัฒนาใช้ในการควบคุมราดังกล่าวต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 3
# อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

## 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บริษัท Whatman International Ltd, England
2. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร บริษัท NisshoNipro, Japan
3. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
4. เครื่องกวนแม่เหล็ก รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, USA
5. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น innova 4330 บริษัท New Brunwick Scientific, Edison, N.J., USA
6. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบใช้ความร้อน รุ่น Mylab$^{TH}$ thermo-block SLTDB-120 บริษัท Seoulin Bioscience, Korea
7. เครื่องโครมาโทกราฟี รุ่น Bio-Logic LP บริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
8. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-S และรุ่น AG 285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
9. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo, Japan และรุ่น HV-25 บริษัท Hiroyama, Japan
10. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น 3700 บริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, Germany
11. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น 200H บริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
12. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA
13. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Thermo Spectronic, USA และ รุ่น Perkin Elmer Instruments Lambda 25 UV/VIS Spectrometer บริษัท PerkinElmer Inc., USA
15. เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ Qubit® 2.0 Fluorometer บริษัท Invitrogen, USA
16. เครื่องวัดค่า pH (Digital pH meter) รุ่น Seven Easy บริษัท Mettler Toledo, Switzerland

17. ชุดเครื่องมือทำพอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis) รุ่น Mini-PROTEIN Tetra Cell บริษัท Bio-Rad, Japan และรุ่น omniPAGE บริษัท Clever Scientific
18. ชุดวัดปริมาณดีเอ็นเอสายคู่สำเร็จรูป Qubit™ dsDNA BR Assay Kit บริษัท Invitrogen, USA
19. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Agarose gel electrophoresis) รุ่น Mini gel electrophoresis system บริษัท Mupid®-2 plus Advance, Japan
20. ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar flow) ISSGO รุ่น Clean บริษัท Triwork, Thailand, Bosstech รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific Associate, Thailand และ Microtech รุ่น V8-6 บริษัทแล็บไมโคร ประเทศไทย
21. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -70 องศาเซลเซียส บริษัท Sanyo Electric, Japan
22. ตู้แช่เย็น (Refrigerator) 4 องศาเซลเซียส บริษัท Mitsubishi, Japan
23. ตู้บ่มเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท Memmert, Germany
24. ตู้อบความร้อน (Hot air oven) รุ่น UE600 และรุ่น UL80 บริษัท Memmert, Germany
25. ถุงไดอะไลซิส ขนาดรู 3500 MWCO รุ่น JE 123986 บริษัท Snakeskin®, USA
26. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 10 20 100 200 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France และบริษัท Nichiryo, Japan
27. หัวกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Millipore, Ireland
28. อ่างน้ำชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) บริษัท Memmert, Germany
29. อ่างน้ำชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB14 รุ่น W760 บริษัท Memmert, Germany และชนิดที่ประกอบเข้ากับเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องทำความเย็น รุ่น CCA-110 บริษัท Eyela, Japan และเครื่องดูดอากาศ รุ่น A-3S บริษัท Eyela, Japan
30. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One version 4.4.1 บริษัท Bio-Rad, Japan
31. ฮีมาไซโทมิเตอร์ (Haemacytometer) บริษัท Schott Duran, Germany
32. Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร
33. Sonicator รุ่น SONOREX RX 100 บริษัทสยามแอนด์โกร, กรุงเทพ, ประเทศไทย

## 3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. กรดอะซีติกเข้มข้น (Glacial $CH_3COOH$) บริษัท Merck, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท LAB-SCAN, Ireland
3. กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Merck, Germany
4. ไกลซีน (Glycine) บริษัท Amresco, USA
5. คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) บริษัท Nacalai tesque, Japan
6. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland
7. ชุดโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง บริษัท Fermentas, USA
8. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล (Qiaquick Gel Extraction Kit) บริษัท Qiagen, Germany
9. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย (Qiagen Spin Miniprep Kit) บริษัท Qiagen, Germany
10. ไซโคลเฮกซิไมด์ (Cycloheximide), ($C_{15}H_{23}NO_4$) บริษัท Sigma – Aldrich Co., USA
11. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
12. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) บริษัท Fluka, Germany
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
14. ดีอีเออี ซัพพอร์ท (DEAE support) บริษัท Bio-Rad, USA
15. ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (N,N-dimethylformamide) บริษัท Fluka, Germany
16. เตตราไซคลิน (Tetracycline) บริษัท Bio Basic Inc, Canada
17. ทริปโตน (Tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
18. ทู-เมอร์แคปโตเอธาทอล (2-mercatoethanol) บริษัท Merck, Germany
19. นอร์มัลบิวทานอล (N-butanol) บริษัท Merck, Germany
20. นอร์มัลเฮกเซน (N-hexane) บริษัท Merck, Germany
21. นิสเตติน (Nystatin), ($C_{47}H_{75}NO_{17}$) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
22. บีโนมิล (Benomyl), ($C_{14}H_{18}N_4O_3$) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
23. แบคโตเปปโทน (Bacto peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
24. ผงบราโนส (Branose) บริษัท Bronson and Jacobs International, ประเทศไทย
25. ผงวุ้น (Agar) บริษัท Productora the Agar SA, Chili
26. ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA

27. สารละลายผสมระหว่างฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (Phenol/Chlorofom) บริษัท USB Corporation, USA
28. สารละลายสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Bio-Rad Protein Assay) บริษัท Bio-Rad, USA
29. สีคูแมสซีบริลเลียนท์บลูจี-250 (Coomassies brilliant blue G-250) บริษัท Fluka, Switzerland
30. สีบรอมฟีนอลบลู (Bromphenol blue) บริษัท Fluka, Germany
31. อะกาโรสเจล (Agarose gel) บริษัท Bio-Rad, USA
32. อาหารแข็ง Citrate สำเร็จรูป บริษัท Difco Laboratories, USA
33. อาหาร MR/VP broth สำเร็จรูป บริษัท Difco Laboratories, USA
34. อาหาร Nitrate broth สำเร็จรูป บริษัท Difco Laboratories, USA
35. อาหาร Trypticase soy broth สำเร็จรูป บริษัท Difco Laboratories, USA
36. อาหารเหลว PDB สำเร็จรูป บริษัท Himedia, India
37. อีเธอร์แอนไฮดรัส (Ether anhydrous) บริษัท J.T. Baker Inc., USA
38. เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidiumbromide) บริษัท BioExcellence, Germany
39. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI บริษัท New England Biolabs, USA
40. เอนไซม์ T4 DNA Ligase บริษัท New England Biolabs, USA
41. แอมพิซิลลิน (Ampicillin) บริษัท Bio Basic Inc., USA
42. 100% เอธานอล บริษัท Merck, Germany
43. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) บริษัท Merck, Germany
44. แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) บริษัท Biolabs, USA
45. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) บริษัท BDH AnalaR®, Qatar
46. 40% Acrylamide และ 2% Bis-acrylamide บริษัท Amersham Biosciences, Sweden
47. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP บริษัท SibsEnzyme, Russia
48. EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท Sigma, USA
49. GeneRuler® 1 Kb DNA Ladder บริษัท Fermentas, USA
50. IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) บริษัท Promega, USA
51. pGEM®-T Easy Vector บริษัท Promega, USA
52. *Taq* DNA Polymerase บริษัท New England Biolabs, USA

53. TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) บริษัท USB Corporation, USA
54. Trisma Base (tris[hydroxymethyl]aminomethane) บริษัท Sigma, USA
55. Tween 80 บริษัท Merck, Germany
56. X-gal (5-bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside) บริษัท Fermentas, USA



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในจังหวัดกาญจนบุรีโดยคงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549) มีทั้งหมด 10 ไอโซเลต ได้แก่ N1, N3, N9, M10, M15, M22, M23, M25, M26 และ M27

3.3.2 รา

รา *Curvularia* sp. เป็นราที่คัดแยกได้จากปทุมมาที่มีอาการโรคจุดสีน้ำตาลในงานวิจัยนี้

## 3.4 การแยกและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราก่อโรคในปทุมมา

นำใบของปทุมมาซึ่งมีอาการของโรคใบจุดมาทำความสะอาดผิวใบด้วย เอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ผึ่งให้แห้ง แล้วใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดใบที่เป็นโรคไปวางลงบนอาหาร PDA (ภาคผนวก ก4) ที่มีคลอแรมเฟนิคอล (ภาคผนวก ข3) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นแยกราให้บริสุทธิ์ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราก่อโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำรานั้นไปทดสอบการก่อให้เกิดโรคใบจุดในปทุมมา แล้วแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้ง

## 3.5 การทดสอบความสามารถในการก่อโรค

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของราก่อโรค

เลี้ยง *Curvularia* sp. บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween80 (ภาคผนวก ข32) ลงในจานเพาะเลี้ยงแล้วขูดสปอร์ออกโดยใช้ลูปปลอดเชื้อ กรองสิ่งแขวนลอยผ่านผ้าขาวบางปลอดเชื้อหนา 3 ชั้น แล้วนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโทมิเทอร์ เจือจางด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween80 จนกระทั่งได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ $5x10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ทำความสะอาดผิวใบปทุมมาด้วย เอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ผึ่งให้แห้ง จากนั้นทำให้ใบปทุมมาเกิดแผลขนาดเล็กโดยการสะกิดที่ใบเบาๆด้วยเข็มปลอดเชื้อ นำสปอร์แขวนลอยของราก่อโรคที่เตรียมได้หยดลงบนรอยแผลปริมาตรแผลละ 20 ไมโครลิตร บ่มในที่มีความชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สำหรับชุดควบคุมผลลบหยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสปอร์แขวนลอยของรา

**3.6 การคัดกรองแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคที่คัดแยกได้**

3.6.1 การเตรียมแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต บนอาหาร NA (ภาคผนวก ก2) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.6.2 การเตรียมราเป้าหมาย

หยดสปอร์แขวนลอยของราที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 3.5 ลงบนอาหาร PDA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้ทั่วด้วยแท่งแก้วงอปลอดเชื้อ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง 1 ชั่วโมง

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมาขีดลงบนอาหาร PDA ที่มีราเป้าหมาย แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นวัดรัศมีของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

**3.7 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรค**

แปรผันภาวะทั้งหมด 4 ภาวะ คือ 1) ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อาหาร nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก1), อาหารเหลว Luria Bertani (LB) (ภาคผนวก ก5) และอาหาร trypticase soy broth (TSB) (ภาคผนวก ก6) 2) ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ pH 6, 7, 8 และ 9 3) อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส และ 4) ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ตั้งแต่ 0 ถึง 24 ชั่วโมง

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6 ซึ่งคัดเลือกจากไอโซเลตที่ให้บริเวณยับยั้งกว้างที่สุด มาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ($OD_{660}$) ให้เท่ากับ 0.5

3.7.2 การหาชุดควบคุมผลบวกในการควบคุมการแพร่ของสารยับยั้งรา

เนื่องจากปริมาตรอาหาร PDA ในจานเพาะเลี้ยงนั้นกำหนดให้ใกล้เคียงกันแต่ไม่สามารถควบคุมให้เท่ากันทุกจานเพาะเลี้ยงในทุกการทดลอง ทำให้อาจมีผลต่อการแพร่ของสารยับยั้งการเจริญของรา ดังนั้นจำเป็นต้องหาสารมาตรฐานเพื่อใช้เป็นชุดควบคุมการแพร่ จึงได้แปรผันความเข้มข้นของสารสังเคราะห์ทางเคมี 3 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคดังนี้ บีโนมิล (ภาคผนวก ข8) ใช้ความเข้มข้นที่ 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ไซโคลเฮกซิไมด์ (ภาคผนวก ข5) ใช้ความเข้มข้นที่ 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนิสเตติน (ภาคผนวก ข6) ใช้ความเข้มข้นที่ 0.5, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมราเป้าหมายตามวิธีข้อ 3.6.2 จากนั้นวางกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และหยดสารมาตรฐานลงบนกระดาษกรองปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นวัดรัศมีของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

3.7.3 การแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้แอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารแต่ละชนิด ได้แก่ NB, LB และ TSB ที่ค่า pH เท่ากับ 7 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 วัดการเจริญของเซลล์แบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นนำเซลล์เพาะเลี้ยงไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนน้ำใสมากรองแยกเซลล์แบคทีเรียออกด้วยเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำส่วนน้ำใสมาทดสอบกับราเป้าหมายด้วยวิธี agar-well diffusion (Yilmaz และคณะ, 2006) โดยเกลี่ยสปอร์แขวนลอยของราเป้าหมายปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงบนอาหาร PDA แล้วเจาะวุ้นออกด้วย cork borer ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร 5 หลุม นำส่วนน้ำใสหยดลงหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 4 หลุม และเติมอาหาร NB ลงในหลุมที่เหลือเพื่อเป็นชุดควบคุมผลลบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นวัดรัศมีของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น โดยมีชุดควบคุมผลลบเป็นอาหาร NB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.7.4 การแปรผันค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้แอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.7.3 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยแปรผันค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 6, 7, 8 และ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 วัดการเจริญของเซลล์แบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เตรียมส่วนน้ำใสและทดสอบกับราเป้าหมายตามวิธีข้อ 3.7.3 โดยมีชุดควบคุมผลบวกเป็นนิสเตตินความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.7.5 การแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ให้แอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารที่มีค่า pH ที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.7.4 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 วัดการเจริญของเซลล์แบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เตรียมส่วนน้ำใสและทดสอบกับราเป้าหมายตามวิธีข้อ 3.7.3 โดยมีชุดควบคุมผลบวกเป็นนิสเตตินความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## 3.8 การทดสอบความเสถียรของสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรค

3.8.1 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ 3.7.1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในภาวะที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.7.5 จากนั้นนำเซลล์เพาะเลี้ยงไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เตรียมส่วนน้ำใสตามวิธีข้อ 3.7.3 นำส่วนน้ำใสไปบ่มที่อุณหภูมิ 20, 40, 60, 80, 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และทดสอบกับราเป้าหมายตามวิธีข้อ 3.7.3 โดยมีชุดควบคุมผลบวกเป็นนิสเตติน ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.8.2 การทดสอบความเสถียรต่อค่า pH

เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียและส่วนน้ำใสเช่นเดียวกับการทดสอบความเสถียรต่อความร้อน นำส่วนน้ำใสมาวัดค่า pH เริ่มต้น จากนั้นปรับค่า pH ให้เป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 ด้วย HCl 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข10) หรือ NaOH 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข15) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับกลับเป็นค่า pH เริ่มต้น และทดสอบกับราเป้าหมายตามวิธีข้อ 3.7.3 โดยมีชุดควบคุมผลบวกเป็นนิสเตติน ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## 3.9 การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค

เพื่อคัดเลือกหาวิธีแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคด้วยวิธีที่ดีที่สุด จึงใช้วิธีการแยกสาร 2 วิธีเปรียบเทียบกัน ดังนี้

3.9.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ 3.7.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารที่เหมาะสม ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มในภาวะที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.7.5 จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดปริมาตรของส่วนน้ำใสแล้วตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 40, 40 ถึง 80 และ 80 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะตกตะกอนต้องกวนสารละลายให้เข้ากันเบาๆด้วยแท่งแม่เหล็ก ใช้เวลาประมาณ 1 ถึง 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกจากส่วนน้ำใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ละลายตะกอนโปรตีนแต่ละช่วงด้วย Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 (ภาคผนวก ข29) ด้วยปริมาตรน้อยที่สุด นำไปกำจัดเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยถุงไดอะไลซ์ขนาด cutoff ที่ 3,500 MW ใน Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกๆ 5 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายใช้ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ที่มีกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข1) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลายโปรตีนไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อกำจัดตะกอนโปรตีนที่หลงเหลืออยู่ แล้วจึงวัดปริมาณโปรตีนด้วยสารละลายสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Bio -Rad Protein Asaay, USA) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

3.9.2 การทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีน

ปฏิบัติตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Mataragas และคณะ (2003) ดังนี้ วัดปริมาณโปรตีนและปรับความเข้มข้นโปรตีนที่จะทดสอบให้เท่ากัน จากนั้นเจือจางโปรตีนแบบลำดับส่วนทีละสองเท่า แล้วนำมาทดสอบกับราเป้าหมายตามวิธีข้อ 3.7.3 โดยมีชุดควบคุมผลบวกเป็นนิสเตตินความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดผลเป็นค่า Arbitary Unit (AU) คือส่วนกลับของการเจือจางที่สูงที่สุดที่สามารถให้ขอบเขตการยับยั้งต่อราเป้าหมายได้ แล้วรายงานค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (Specific activity) ของโปรตีนเป็น AU ต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Mataragas และคณะ, 2003)

3.9.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายโปรตีน

กำหนดความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนแต่ละช่วงให้เท่ากัน ทดสอบกับราเป้าหมายตามวิธีข้อ 3.7.3 โดยมีชุดควบคุมผลบวกเป็นนิสเตติน ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.9.4 การสกัดสารยับยั้งการเจริญของราด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ 3.7.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารที่เหมาะสม ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มในภาวะที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.7.5 จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที วัดปริมาตรของส่วนน้ำใส แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม นอร์มัลเฮกเซน หรือ นอร์มัลบิวทานอล ในกรวยแยก อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เขย่า 4 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้จนกว่าสารละลายจะแยกชั้นอย่างชัดเจน นำสารละลายในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ไประเหยตามจุดเดือดของตัวทำละลายอินทรีย์นั้นๆ จนกระทั่งเหลือปริมาตรของสารละลายน้อยที่สุด ชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณความเข้มข้นของสารละลาย

3.9.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด

กำหนดความเข้มข้นของสารสกัดให้เท่ากัน ทดสอบกับราเป้าหมายตามวิธีข้อ 3.7.3 โดยมีชุดควบคุมผลลบเป็นตัวทำลายอินทรีย์ชนิดนั้นๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและชุดควบคุมผลบวกเป็นนิสเตติน ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.10 การทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค

เมื่อได้วิธีแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดแล้วจึงขยายขนาดการแยกสารนั้น โดยเลี้ยงแบคทีเรียตามภาวะที่แปรผันได้ในข้อ 3.7.5 นำส่วนน้ำใสไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดปริมาตร ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงที่ให้แอกทิวิตีดีที่สุดจากข้อ 3.9.3 นำสารละลายโปรตีนมาทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร ดังนี้ ล้างสารแขวนลอยดีอีเออีซัพพอร์ทด้วยน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆแล้วปล่อยให้เม็ดเจลค่อยๆตกตะกอนเอง เทส่วนน้ำใสและเจลละเอียดที่ลอยอยู่ด้านบนทิ้ง ล้างเจลจนกระทั่งหมดกลิ่นแอลกอฮอล์ ในการล้างครั้งสุดท้ายให้เปลี่ยนจากน้ำกลั่นเป็น Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 แล้วนำไปกำจัดฟองอากาศออกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จากนั้นค่อยๆบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน นำสารละลายที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์โปรตีน ประกอบด้วย Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, NaCl 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 (ภาคผนวก ข26), NaOH 1 โมลาร์ และน้ำกลั่นนำไปกำจัดฟองอากาศโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำให้คอลัมน์ที่มีเจลบรรจุแล้วอยู่ในภาวะสมดุล (equilibrate) โดยผ่าน Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ค่อยๆเติมสารละลายโปรตีนลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนที่ไม่จับกับดีอีเออีซัพพอร์ทออกด้วยบัฟเฟอร์เดิม ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ จึงชะโปรตีนที่จับกับเจลออกโดยใช้สารละลายเกรเดียนท์ของ NaCl 1 โมลาร์ใน Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 เก็บลำดับส่วน ส่วนละ 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากนั้นนำลำดับส่วนที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงใกล้เคียงกันในแต่ละช่วงมารวมกันแล้วกำจัดเกลือออกตามวิธีข้อ 3.9.1 และวัดปริมาณโปรตีนด้วยสารละลายสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

### 3.11 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้กระจกขนาด 8.3x10.2 เซนติเมตรและขนาด 7.3x10.2 เซนติเมตร มีช่องว่างระหว่างกระจกทั้ง 2 แผ่น หนา 1.5 มิลลิเมตร

ประกอบกระจกเข้ากับอุปกรณ์เตรียมเจล MiniPROTEIN II (Bio-Rad Laboratories, USA) แล้วเตรียมเจลตามส่วนประกอบ ดังตารางที่ 3.1

**ตารางที่** 3.1 ส่วนผสมของพอลิอะคริลาไมด์

| สาร | 15 เปอร์เซ็นต์ เซพาเรติงเจล | 4.5 เปอร์เซ็นต์ สแต็กกิงเจล |
|---|---|---|
| 40 เปอร์เซ็นต์ อะคริลาไมด์ | 3.56 มิลลิลิตร | 1.095 มิลลิลิตร |
| 2 เปอร์เซ็นต์ บิสอะคริลาไมด์ | 2.003 มิลลิลิตร | 601 ไมโครลิตร |
| Tris-HCl 1.5 โมลาร์ pH 8.8 (ภาคผนวก ข31) | 2.5 มิลลิลิตร | - |
| Tris-HCl 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (ภาคผนวก ข30) | - | 2.5 มิลลิลิตร |
| 10% SDS (ภาคผนวก ข14) | 100 ไมโครลิตร | 100 ไมโครลิตร |
| น้ำกลั่น | 1.848 มิลลิลิตร | 5.804 มิลลิลิตร |
| แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข24) | 50 ไมโครลิตร | 50 ไมโครลิตร |
| TEMED | 10 ไมโครลิตร | 10 ไมโครลิตร |

ผสมสารให้เข้ากันเบาๆ ระวังอย่าให้เกิดฟอง เติมเซพาเรติงเจลลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกให้มีความสูง 5 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำกลั่นทันทีเพื่อปรับให้หน้าเจลเรียบ รอให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 15 นาที เทน้ำกลั่นทิ้ง จากนั้นเติมสแต็กกิงเจลลงไปจนเต็ม วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่างขนาด 10 ช่องลงไประหว่างแผ่นกระจก รอให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 15 นาที เมื่อเจลแข็งแล้วประกอบชุดกระจกเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส เติมอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข34) ลงในช่องว่างด้านในจนเต็มและด้านนอกให้มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วจึงดึงแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่างออก เตรียมตัวอย่างโปรตีนให้มีความเข้มข้น 120 ไมโครกรัมโดยผสมกับ 5X Laemmli buffer (ภาคผนวก ข36) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X นำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใส่ตัวอย่างปริมาตร 45 ไมโครลิตรและโปรตีนมาตรฐานปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วทำอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ 200 โวลท์ เป็นเวลา 45-55 นาที นำเจลออกจากแผ่นกระจก ย้อมสีเจลด้วยน้ำยาย้อมสีคูแมสซีบลู (ภาคผนวก ข21) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำยาล้างสี (ภาคผนวก ข20)

จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ค2)

### 3.12 การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

แบ่งออกเป็น 2 การทดลองเปรียบเทียบกันคือ 1) การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคจากส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมตามวิธีข้อ 3.7.1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารที่เหมาะสมปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในภาวะที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.7.5 จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปทำแห้งเยือกแข็งภายใต้สุญญากาศ ละลายผงที่ได้จากการทำแห้งเยือกแข็งด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้ววัดปริมาณโปรตีนด้วยสารละลายสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และ 2) การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคจากโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.9.3 กำหนดค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของโปรตีนทั้ง 2 ส่วนแล้วเจือจางลำดับส่วนทีละ 2 เท่า นำส่วนเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตรไปทดสอบกับราเป้าหมายตามวิธีข้อ 3.7.3 โดยมีชุดควบคุมผลบวกเป็นนิสเตติน ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวัดความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น และบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้

### 3.13 การทดสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนต่อสปอร์และเส้นใยของราก่อโรค

ทดสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนต่อราก่อโรคตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kim และ Chung (2004) โดยใช้โปรตีนในช่วงที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคที่ได้จากข้อ 3.9.3 กำหนดให้โปรตีนมีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในข้อ 3.12 เตรียมสปอร์แขวนลอยของราก่อโรคตามวิธีข้อ 3.6 ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรพร้อมกับอาหาร PDB (ภาคผนวก ข3) จากนั้นเติมสารละลายโปรตีนลงไป บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการงอกของสปอร์และลักษณะของเส้นใยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบซึ่งใส่สปอร์แขวนลอยของราก่อโรคลงไปในหลอดไมโครฟิวจ์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรพร้อมกับอาหาร PDB โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) โดยใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบซึ่งใส่สปอร์แขวนลอยของราลงในหลอดไมโครฟิวจ์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรพร้อมกับอาหาร PDB

## 3.14 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

### 3.14.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

#### 3.14.1.1 การย้อมแกรมและย้อมสปอร์

การย้อมแกรม ปฏิบัติโดยเลี้ยงแบคทีเรีย N1 บนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง นำแบคทีเรียมาเกลี่ยบางๆบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ปล่อยให้แห้ง จากนั้นตรึงด้วยความร้อนโดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หยดคริสตัลไวโอเลต (ภาคผนวก ข12) บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที เทสีทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดสารละลายแกรมไอโอดีน (ภาคผนวก ข11) ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 15 วินาที ล้างน้ำสะอาด หยดซาฟรานิน (ภาคผนวกข 13) บนรอยเกลี่ย ประมาณ 15-30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายของเลนส์วัตถุ 100 เท่า

การย้อมสปอร์ ปฏิบัติโดยเลี้ยงแบคทีเรีย N1 บนอาการ NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำแบคทีเรียมาเกลี่ยบางๆบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ปล่อยให้แห้ง จากนั้นตรึงด้วยความร้อนโดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หยดสารละลายมาลาไคท์กรีน (ภาคผนวก ข 19) บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วมแล้วลนด้วยเปลวไฟโดยตรงหรือใช้ไอน้ำเดือด เป็นเวลา 5-10 นาที ระวังอย่าให้สีเดือดหรือแห้ง เทสีทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น หยดซาฟรานินบนรอยเกลี่ย ประมาณ 15-30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายของเลนส์วัตถุ 100 เท่า

#### 3.14.1.2 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

ในทุกการทดลองปฏิบัติโดยเลี้ยงแบคทีเรีย N1 บนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทดสอบด้วยปฏิกิริยาต่างๆ ดังนี้ 1) การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลส โดยเขี่ยแบคทีเรียมาวางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด $H_2O_2$ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ลงบนแบคทีเรีย 1 หยด แล้วอ่านผล 2) การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท โดยเขี่ยแบคทีเรียใส่ลงใน nitrate broth (ภาคผนวก ก9) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นหยด naphthylamine 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข23) 3 หยด แล้วหยดกรดซัลฟานิลิก 0.8 เปอร์เซ็นต์ใน

กรดอะซิติกความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข9) อีก 3 หยด ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วอ่านผล 3) การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดหรืออะเซทิลเมธิลคาร์บินอลจากการหมักน้ำตาล โดยเขี่ยแบคทีเรียใส่ลงใน MR/VP broth (ภาคผนวก ก8) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งหยด methyl red (ภาคผนวก ข16) เพื่อทดสอบการสร้างกรด ผสมให้เข้ากัน แล้วอ่านผล และส่วนที่สองทดสอบอะเซทิลเมธิลคาร์บินอล โดยใส่ $\alpha$-naphthol (ภาคผนวก ข37) ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยง 600 ไมโครลิตร แล้วจึงใส่ KOH ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข18) ลงไป เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วอ่านผล 4) การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท โดยเขี่ยแบคทีเรียไปเลี้ยงบนอาหาร Simmons citrate slant (ภาคผนวก ก10) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วอ่านผล และ 5) การทดสอบการย่อยสลายเจลาติน โดยนำหลอดอาหาร Gelatin medium (ภาคผนวก ก7) ไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยแบคทีเรียแล้วแทงลงไปในอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดเลี้ยงเชื้อไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีถึง 1 ชั่วโมง แล้วอ่านผล

3.14.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

3.14.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ

เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ที่มี Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 8 (ภาคผนวก ข28) บรรจุอยู่ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาสเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอของแบคทีเรียไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ 10F และ 1500R (Ogata และคณะ, 1997) ด้วยส่วนผสมดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| 10X บัฟเฟอร์ | 5 | ไมโครลิตร |
| ไพรเมอร์ 10F (50 ไมโครโมลาร์) | 2 | ไมโครลิตร |
| ไพรเมอร์ 1500R (50 ไมโครโมลาร์) | 2 | ไมโครลิตร |
| สารละลายผสมของ 10 มิลลิโมลาร์ dNTPs (ภาคผนวก ข17) | 2 | ไมโครลิตร |

| | | |
|---|---|---|
| ดีเอ็นเอแม่แบบ | 5 | ไมโครลิตร |
| *Taq* DNA Polymerase (5 หน่วยต่อไมโครลิตร) | 1 | ไมโครลิตร |
| น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ | 33 | ไมโครลิตร |
| ปริมาตรสุทธิ | 50 | ไมโครลิตร |

ผสมสารให้เข้ากันเบาๆด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 5 วินาที นำไปทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (DNA Thermal cycler) ที่ปรับอุณหภูมิไว้ ดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| Initial denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที | |
| Denaturation | ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที | 30 รอบ |
| Annealing | ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที | |
| Extention | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที | |
| Final extention | ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที | |

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่หลอมละลายอยู่ใน 1X TAE บัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข7) เทลงในถาดสำหรับขึ้นรูปเจล รอจนกระทั่งเจลแข็ง จากนั้นวางเจลลงบนเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส ใส่ 1X TAE บัฟเฟอร์ลงไปจนท่วมเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับสีติดตาม ใส่สารละลายดีเอ็นเอและสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, USA) ลงในช่องใส่ตัวอย่าง ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสที่ 100 โวลท์ เป็นเวลา 25 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 (Bio-Rad Laboratories, USA)

ตัดอะกาโรสเจลบริเวณที่มีผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ นำชิ้นอะกาโรสเจลที่มีแถบของดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายหมด เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา แล้วนำสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน QIAquick spin

column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาที หมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที 2 ครั้ง ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใส เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.14.2.2 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเข้ากับเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากข้อ 3.14.2.1 มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector (Promega, USA) โดยผสมสารละลายต่างๆ ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| 10X บัฟเฟอร์ไลเกส | 10 | ไมโครลิตร |
| pGEM®-T Easy Vector | 1 | ไมโครลิตร |
| ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส | 6 | ไมโครลิตร |
| T4 DNA Ligase | 1 | ไมโครลิตร |
| น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ | 2 | ไมโครลิตร |
| ปริมาตรสุทธิ | 20 | ไมโครลิตร |

บ่มหลอดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.14.2.3 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α

ทำทรานสฟอร์มด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ดังนี้ นำคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาแช่ในอ่างน้ำแข็งจนละลาย ใส่สารละลายผสมจากปฏิกิริยาไลเกชันทั้งหมดลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตรลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1

นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไป นำเซลล์แขวนลอยไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข24) 4 เปอร์เซ็นต์ X-gal (ภาคผนวก ข33) และ 100 มิลลิโมลาร์ IPTG (ภาคผนวก ข 25) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง และตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่เกิดขึ้น

3.14.2.4 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์

เขี่ยโคโลนีสีขาวของทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อบรรจุอยู่ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอของแบคทีเรียไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยส่วนผสมดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| 10X บัฟเฟอร์ | 5 | ไมโครลิตร |
| ไพรเมอร์ 10F (50 ไมโครโมลาร์) | 2 | ไมโครลิตร |
| ไพรเมอร์ 1500R (50 ไมโครโมลาร์) | 2 | ไมโครลิตร |
| สารละลายผสมของ 10 มิลลิโมลาร์ dNTPs | 2 | ไมโครลิตร |
| ดีเอ็นเอแม่แบบ | 10 | ไมโครลิตร |
| Taq DNA Polymerase (5 หน่วยต่อไมโครลิตร) | 1 | ไมโครลิตร |
| น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ | 28 | ไมโครลิตร |
| ปริมาตรสุทธิ | 50 | ไมโครลิตร |

ผสมสารให้เข้ากันเบาๆด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 5 วินาที นำไปทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA ที่ปรับอุณหภูมิไว้ตามโปรแกรมเดิม และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

3.14.2.5 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany)

นำโคโลนีที่มีส่วนของบริเวณ 16S rDNA แทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* DH5$\alpha$ ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเหลว LB

ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์เพาะเลี้ยงใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ แล้วหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง กระจายเซลล์โดยเติมบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในเวลาไม่เกิน 3 นาที แล้วเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสใส่ลงใน QIAprep spin column หมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนหมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.14.2.6 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA

นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยผสมสารละลายต่างๆลงในหลอดไมโครฟิวจ์ ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| 10X บัฟเฟอร์ | 1.5 | ไมโครลิตร |
| เอนไซม์ *Eco*RI | 1 | ไมโครลิตร |
| พลาสมิด | 5 | ไมโครลิตร |
| น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ | 7.5 | ไมโครลิตร |
| ปริมาตรสุทธิ | 15 | ไมโครลิตร |

ผสมให้เข้ากันเบาๆแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส นำพลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วว่ามีส่วนของบริเวณ 16S rDNA แทรกอยู่ ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนบริเวณ 16S rDNA โดยใช้บริการของบริษัท 1$^{st}$ Base (ประเทศมาเลเซีย) นำข้อมูล

นิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ด้วยโปรแกรม BlastN

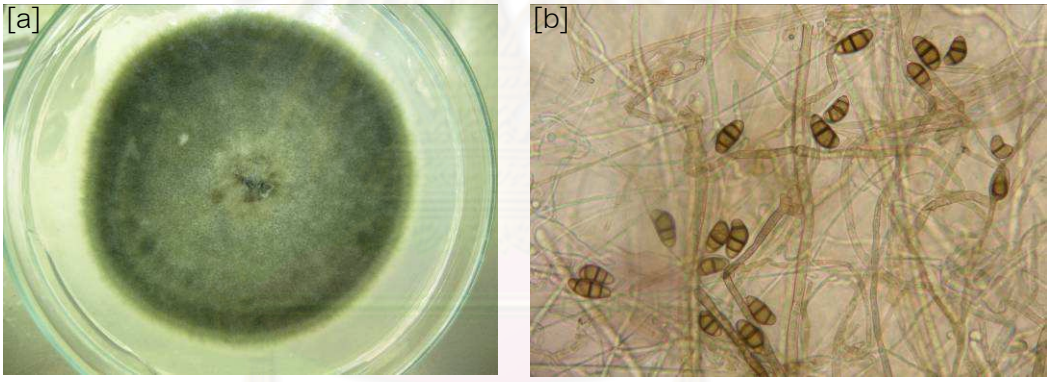
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 4

# ผลการทดลอง

## 4.1 การแยกและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราก่อโรคในปทุมมา

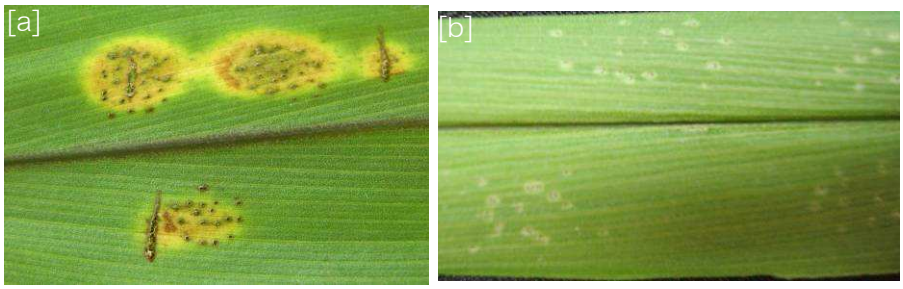
จากการศึกษาลักษณะของราที่คัดแยกได้จากปทุมมาที่มีอาการจุดสีน้ำตาล บนอาหาร PDA พบว่าเส้นใยรามีสีขาวเมื่อมีอายุ 1-3 วัน หลังจาก 3 วันแล้ว เส้นใยราจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ดังแสดงในรูปที่ 4.1 [a] เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายของเลนส์วัตถุ 40X พบเส้นใยที่มีผนังกั้น สร้างสปอร์สีเขียวเข้ม สร้างผนังกั้นและแบ่งออกเป็น 4 ส่วน โดยส่วนตรงกลางมีขนาดใหญ่กว่าส่วนอื่น (รูปที่ 4.1 [b]) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวสามารถบ่งชี้ได้ว่าราที่แยกได้เป็นราในสกุล *Curvularia*




**รูปที่ 4.1** [a] โคโลนีของราที่แยกได้จากใบปทุมมา (บนอาหาร PDA) [b] สปอร์ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 400 เท่า)

## 4.2 การทดสอบความสามารถของราในการก่อโรค

เมื่อหยดสปอร์แขวนลอยของราลงบนรอยแผลที่ทำขึ้นบริเวณใบ แล้วบ่มในที่มีความชื้นเป็นเวลา 7 วัน พบอาการของโรคเกิดขึ้น และเมื่อปล่อยไว้นานหลายวันบริเวณที่ถูกราทำลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลและแห้งกรอบ (รูปที่ 4.2 [a]) ในขณะที่ชุดควบคุมที่หยดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อไม่เกิดอาการใดๆ (รูปที่ 4.2 [b])



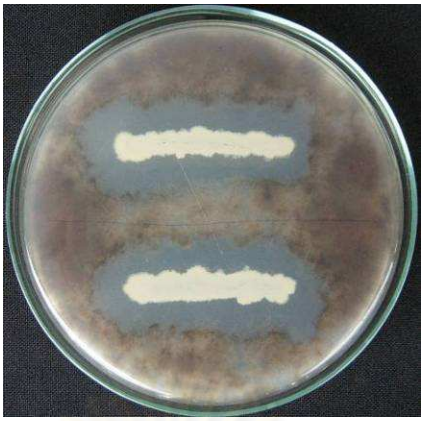

**รูปที่ 4.2** แสดงอาการของโรคในปทุมมาหลังจากหยดสปอร์แขวนลอยของ *Curvularia* sp. [a] และน้ำกลั่น [b]

### 4.3 การคัดกรองแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp. ที่คัดแยกได้

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลตที่แยกไว้โดยคงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549) มาขีดลงบนอาหาร PDA ที่เกลี่ยผิวหน้าไว้ด้วยสปอร์แขวนลอยของรา *Curvularia* sp. แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีบริเวณยับยั้งเกิดขึ้นด้วยขนาดที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย N1 สามารถยับยั้งรา *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 5.5 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.3) จึงเลือกแบคทีเรีย N1 เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

**ตารางที่ 4.1** ขนาดของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นโดยแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ

| | ไอโซเลตของแบคทีเรีย | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N1 | N3 | N9 | M10 | M15 | M22 | M23 | M25 | M26 | M27 |
| ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) | 5.5 | 3 | - | 5 | 4 | 2 | 2 | 3 | 5 | 4 |

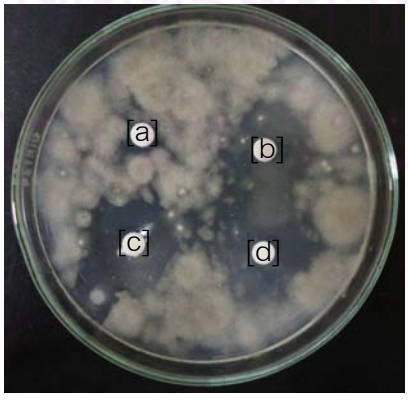


**รูปที่** 4.3 แสดงบริเวณยับยั้งของแบคทีเรีย N1 ในการยับยั้งรา *Curvularia* sp.

## 4.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรค

### 4.4.1 การหาชุดควบคุมผลบวกในการควบคุมการแพร่ของสารยับยั้งรา

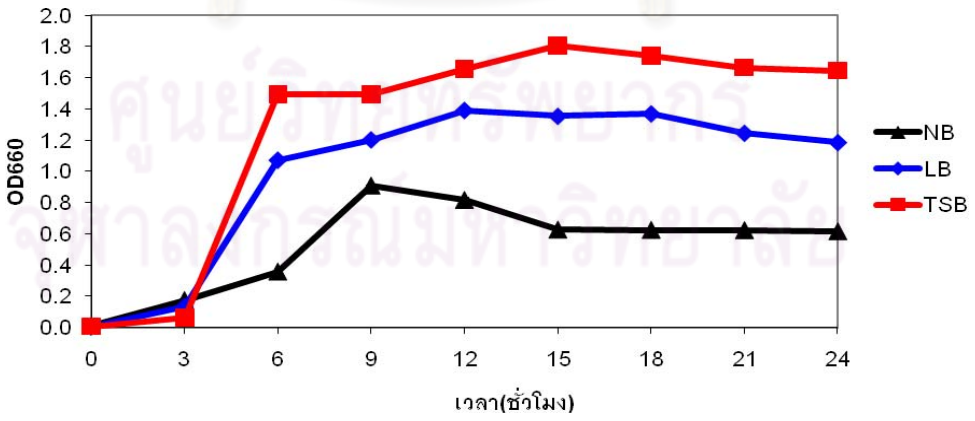
เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารสังเคราะห์ทางเคมีที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคเพื่อใช้ควบคุมการแพร่ของสารยับยั้งราในอาหาร PDA ซึ่งปฏิบัติดังนี้ บีโนมิล ใช้ความเข้มข้นที่ 5, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ไซโคลเฮกซิไมด์ ใช้ความเข้มข้นที่ 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนิสเตติน ใช้ความเข้มข้นที่ 0.5, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลองพบว่าบีโนมิลและไซโคลเฮกซิไมด์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp. ได้ แต่นิสเตตินยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ได้ด้วยความเข้มข้นต่ำสุดที่ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.4) จึงใช้นิสเตตินเป็นชุดควบคุมผลบวกสำหรับทุกการทดลองที่ทดสอบกับราเป้าหมาย




**รูปที่** 4.4 แสดงความกว้างของบริเวณยับยั้งรา *Curvularia* sp. โดยนิสเตติน 500 μg/ml [a], 2.5 mg/ml [b], 7.5 mg/ml [c] และ 10 mg/ml [d]

### 4.4.2 การแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้แอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ อาหารเหลว NB LB และ TSB ที่ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรีย N1 มีการเจริญดีที่สุดในอาหารเหลว TSB รองลงมาคือ LB และ NB ตามลำดับ (รูปที่ 4.5) โดยในอาหารทั้งสามชนิดนั้นแบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ระยะ exponential phase ในชั่วโมงที่ 3 และเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่แต่ละช่วงเวลาไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp. พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากชั่วโมงที่ 9 ถึง 24 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ซึ่งมีรัศมีของบริเวณยับยั้งเกิดขึ้นแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยน้ำเลี้ยงเชื้อจากชั่วโมงที่ 12 ถึง 15 ให้บริเวณยับยั้งราได้มากที่สุด ในอาหาร NB ให้บริเวณยับยั้งสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 15 โดยมีรัศมีของบริเวณยับยั้ง 3.77 มิลลิเมตร ในอาหาร LB ให้บริเวณยับยั้งสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 โดยมีรัศมีของบริเวณยับยั้ง 3.56 มิลลิเมตร ส่วนในอาหาร TSB ให้บริเวณยับยั้งสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 โดยมีรัศมีของบริเวณยับยั้งมากที่สุด 5.62 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.6) เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติแล้วพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกอาหารชนิดนี้ไปแปรผันค่า pH ที่ส่งเสริมให้ผลิตสารออกฤทธิ์ได้ดีขึ้นต่อไป



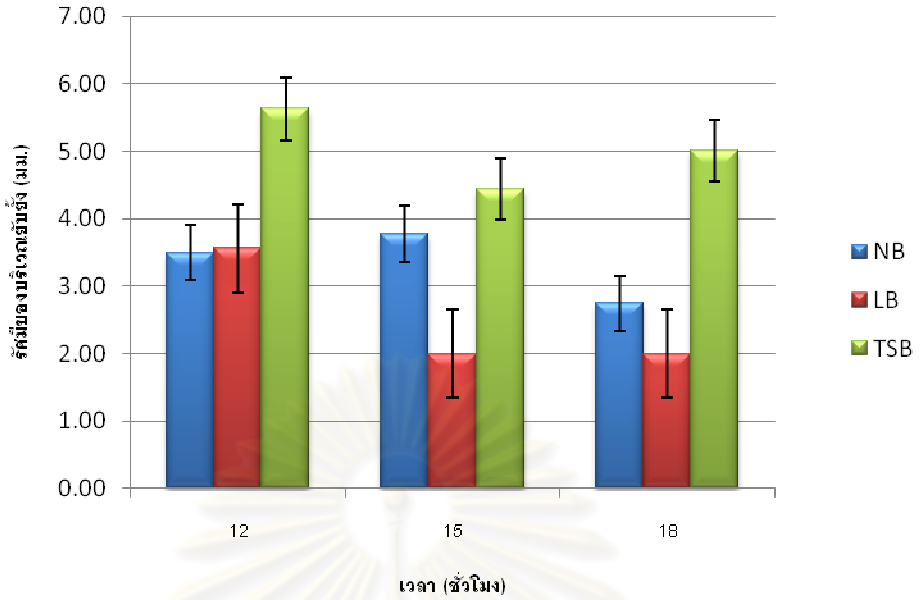

**รูปที่** 4.5 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย N1 ในอาหาร NB LB และ TSB

**ตารางที่** 4.2 แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากแบคทีเรีย N1 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร NB LB และ TSB

| ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ | เวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมงที่) | รัศมีของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) |
|---|---|---|
| NB | 9 | $1.56 \pm 0.51^{b,d}$ |
| | 12 | $3.50 \pm 0.41^{b,a}$ |
| | 15 | $3.77 \pm 0.65^{b,b}$ |
| | 18 | $2.75 \pm 0.46^{b,bc}$ |
| | 21 | $2.75 \pm 0.46^{b,cd}$ |
| | 24 | $1.93 \pm 0.31^{b,cd}$ |
| LB | 9 | $1.68 \pm 0.64^{c,d}$ |
| | 12 | $3.56 \pm 0.37^{c,a}$ |
| | 15 | $2.00 \pm 0.00^{c,b}$ |
| | 18 | $2.00 \pm 0.82^{c,bc}$ |
| | 21 | $2.43 \pm 0.59^{c,cd}$ |
| | 24 | $2.12 \pm 0.25^{c,cd}$ |
| TSB | 9 | $4.87 \pm 0.48^{a,d}$ |
| | 12 | $5.62 \pm 0.32^{a,a}$ |
| | 15 | $4.43 \pm 0.24^{a,b}$ |
| | 18 | $5.00 \pm 0.82^{a,bc}$ |
| | 21 | $3.37 \pm 0.75^{a,cd}$ |
| | 24 | $4.37 \pm 0.43^{a,cd}$ |

หมายเหตุ $^{x}$ แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT

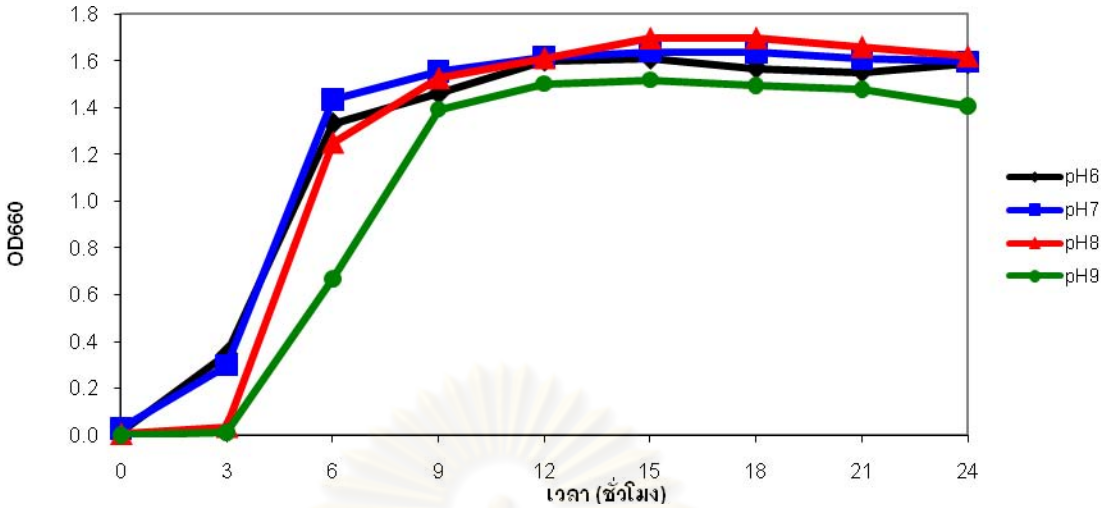
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่** 4.6 กราฟแสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งรา *Curvularia* sp. โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย N1 ในชั่วโมงที่ 12, 15 และ 18 เปรียบเทียบระหว่างอาหาร NB, LB และ TSB

### 4.4.3 การแปรผันค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้แอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด

เมื่อแปรผันค่า pH ของอาหาร TSB ให้เท่ากับ 6, 7, 8 และ 9 แล้วตรวจติดตามการเจริญของแบคทีเรียและความสามารถในการยับยั้งรา *Curvularia* sp. พบว่าที่ค่า pH 6, 7 และ 8 แบคทีเรีย N1 มีอัตราการเจริญที่ไม่แตกต่างกันมาก แต่เมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นเป็น 9 อัตราการเจริญของแบคทีเรียจะลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 4.7) โดยที่แบคทีเรียยังคงสร้างสารยับยั้งการเจริญของราได้ในระยะ stationary phase คือตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ถึง 24 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของราได้โดยมีรัศมีของบริเวณยับยั้งเกิดขึ้นแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และให้รัศมีของบริเวณยับยั้งมากที่สุดในชั่วโมงที่ 9 และ 12 ที่ค่า pH เท่ากับ 6 ให้บริเวณยับยั้งสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 9 โดยมีรัศมีของบริเวณยับยั้ง 5.25 มิลลิเมตร ที่ค่า pH เท่ากับ 7 ให้บริเวณยับยั้งสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 โดยมีรัศมีของบริเวณยับยั้ง 5.65 มิลลิเมตร และที่ค่า pH 8 ให้บริเวณยับยั้งสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 9 โดยมีรัศมีของบริเวณยับยั้ง 4.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.8) จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย N1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ค่า pH เท่ากับ 7 แล้ว แบคทีเรีย N1 จะผลิตสารที่ยับยั้งรา *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่า pH อื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกภาวะนี้เพื่อนำไปแปรผันหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ส่งเสริมให้ผลิตสารออกฤทธิ์ดีขึ้นต่อไป




**รูปที่** 4.7 กราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย N1 ในอาหาร TSB ที่ค่า pH เท่ากับ 6 7 8 และ 9

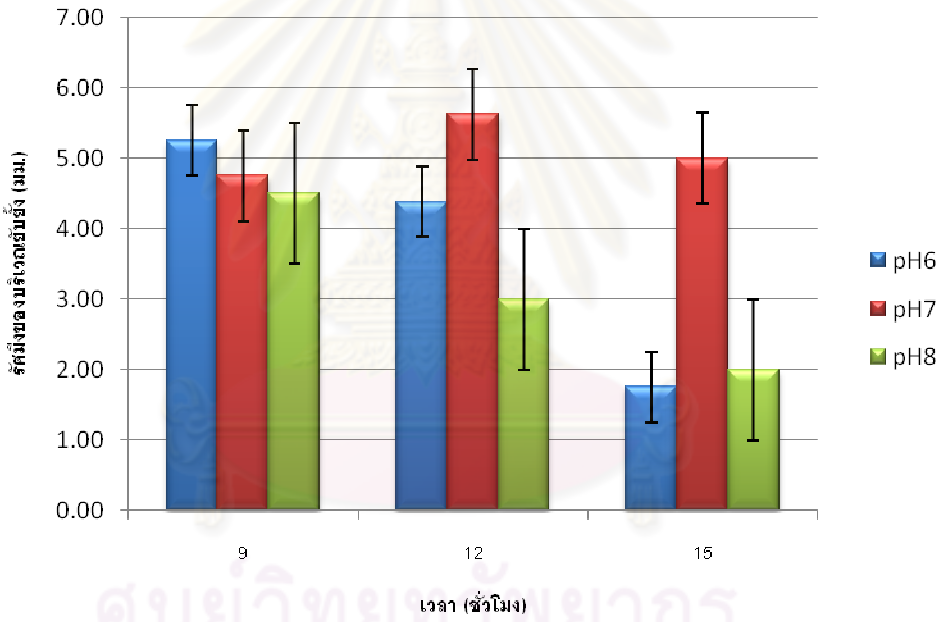
**ตารางที่** 4.3 แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากแบคทีเรีย N1 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ที่ค่า pH เท่ากับ 6 7 8 และ 9

| pH | เวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมงที่) | รัศมีของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) |
|---|---|---|
| 6 | 9 | $5.25 \pm 0.96^{b,a}$ |
| | 12 | $4.37 \pm 0.95^{b,a}$ |
| | 15 | $1.75 \pm 0.50^{b,b}$ |
| | 18 | $2.25 \pm 0.50^{b,bc}$ |
| | 21 | $2.12 \pm 0.25^{b,c}$ |
| | 24 | $2.00 \pm 0.82^{b,bc}$ |
| 7 | 9 | $4.75 \pm 0.64^{a,a}$ |
| | 12 | $5.65 \pm 0.75^{a,a}$ |
| | 15 | $5.00 \pm 0.00^{a,b}$ |
| | 18 | $4.25 \pm 0.50^{a,bc}$ |
| | 21 | $2.93 \pm 0.31^{a,c}$ |
| | 24 | $4.87 \pm 1.03^{a,bc}$ |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| | | |
|---|---|---|
| 8 | 9 | $4.50 \pm 1.00^{c,a}$ |
| | 12 | $3.00 \pm 0.00^{c,a}$ |
| | 15 | $2.00 \pm 0.00^{c,b}$ |
| | 18 | $1.75 \pm 0.29^{c,bc}$ |
| | 21 | $1.81 \pm 0.24^{c,c}$ |
| | 24 | $1.43 \pm 0.43^{c,bc}$ |

หมายเหตุ $^{x}$ แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT

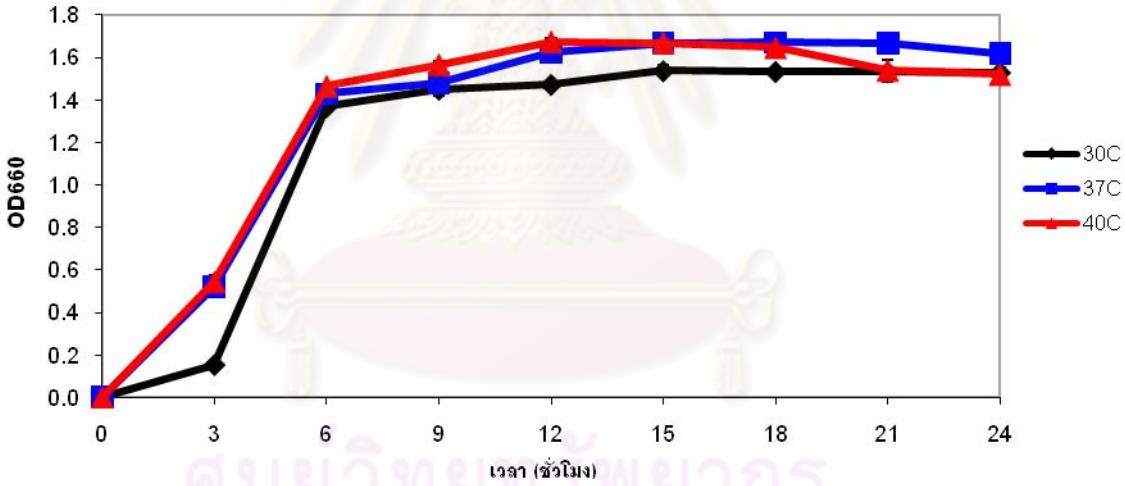



**รูปที่** 4.8 กราฟแสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งรา *Curvularia* sp. โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย N1 ในชั่วโมงที่ 12, 15 และ 18 เปรียบเทียบระหว่างค่า pH 6, 7 และ 8

### 4.4.4 การแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ให้แอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย N1 ในอาหาร TSB ที่ค่า pH เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส แล้วตรวจติดตามการเจริญของแบคทีเรียและความสามารถในการยับยั้งรา

*Curvularia* sp. พบว่าแบคทีเรีย N1 มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของแบคทีเรียจะลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 4.9) แบคทีเรียยังคงสร้างสารยับยั้งการเจริญของราเมื่อเจริญอยู่ในระยะ stationary phase คือตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ถึง 24 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้โดยมีรัศมีของบริเวณยับยั้งเกิดขึ้นแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และให้รัศมีของบริเวณยับยั้งมากที่สุดในชั่วโมงที่ 12 ทุกๆ อุณหภูมิโดยมีรัศมีของบริเวณยับยั้ง 5.75, 7 และ 5.5 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (รูปที่ 4.10) ทั้งนี้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส จึงสามารถสรุปได้ว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแบคทีเรีย N1 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp.คือการเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ค่า pH เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตัวอย่างบริเวณยับยั้งราโดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสมที่สุด แสดงในรูปที่ 4.11



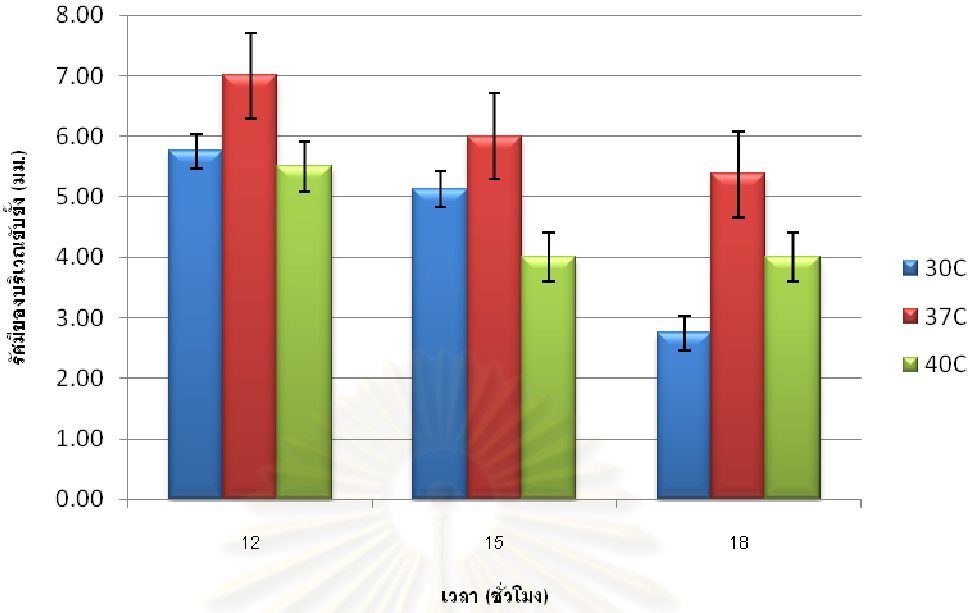

**รูปที่** 4.9 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย N1ในอาหาร TSB ค่า pH เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส

**ตารางที่ 4.4** แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากแบคทีเรีย N1 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB ที่ค่า pH เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส

| อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง (องศาเซลเซียส) | เวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมงที่) | รัศมีของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) |
|---|---|---|
| 30 | 9 | $6.00\pm0.82^{b,b}$ |
| | 12 | $5.75\pm0.50^{b,a}$ |
| | 15 | $5.12 \pm 0.48^{b,b}$ |
| | 18 | $2.75 \pm 0.29^{b,c}$ |
| | 21 | $2.12 \pm 2.50^{b,c}$ |
| | 24 | $2.50 \pm 0.00^{b,d}$ |
| 37 | 9 | $4.00 \pm 0.91^{a,b}$ |
| | 12 | $7.00 \pm 0.71^{a,a}$ |
| | 15 | $6.00 \pm 0.82^{a,b}$ |
| | 18 | $5.37 \pm 0.75^{a,c}$ |
| | 21 | $5.50 \pm 1.08^{a,c}$ |
| | 24 | $4.00 \pm 1.22^{a,d}$ |
| 40 | 9 | $5.37 \pm 0.75^{b,b}$ |
| | 12 | $5.50 \pm 1.08^{b,a}$ |
| | 15 | $4.00 \pm 0.91^{b,b}$ |
| | 18 | $4.00 \pm 0.41^{b,c}$ |
| | 21 | $4.00 \pm 0.41^{b,c}$ |
| | 24 | $2.75 \pm 0.29^{b,d}$ |

หมายเหตุ $^{x}$ แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่** 4.10 กราฟแสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งรา *Curvularia* sp. โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย N1 ในชั่วโมงที่ 12, 15 และ 18 เปรียบเทียบระหว่างอุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส

**รูปที่** 4.11 แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งรา *Curvularia* sp. โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย N1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร TSB ที่ค่า pH เท่ากับ 7 ที่ 37 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

## 4.5 การทดสอบความเสถียรของสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรค

### 4.5.1 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ

เมื่อนำส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N1 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ค่า pH เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มาทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิต่างๆโดยบ่มที่อุณหภูมิ 20, 40, 60, 80, 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและทดสอบกับราเป้าหมาย พบว่าสารยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp. ที่แบคทีเรีย N1 ผลิตนั้นสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ใช้ทดสอบได้ โดยที่อุณหภูมิ 20, 40, 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส สารยับยั้งการเจริญของรามีแอกทิวิตีใกล้เคียงกัน ซึ่งทำให้เกิดบริเวณยับยั้งได้ 6.31, 5, 5.12, 5.56 และ 5.06 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่แอกทิวิตีจะลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส มีบริเวณยับยั้งกว้างเพียง 3 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.5, ซ้าย)

**ตารางที่ 4.5** แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งของส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N1 เมื่อทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิและค่า pH

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | รัศมีของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) |
|---|---|
| 20 | 6.31±0.97 |
| 40 | 5.00±0.00 |
| 60 | 5.12±0.32 |
| 80 | 5.56±0.54 |
| 100 | 5.06±1.09 |
| 121 | 3.00±0.00 |

| pH | รัศมีของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) |
|---|---|
| 2 | 4.31±0.83 |
| 4 | 5.00±0.00 |
| 6 | 5.06±0.24 |
| 8 | ลดการเจริญ |
| 10 | ลดการเจริญ |

### 4.5.2 การทดสอบความเสถียรต่อค่า pH

จากการนำส่วนน้ำใสของแบคทีเรีย N1 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ค่า pH เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มาทดสอบความเสถียรต่อค่า pH โดยนำส่วนน้ำใสมาปรับค่า pH เป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 ด้วย HCl 1 โมลาร์ หรือ NaOH 1 โมลาร์ แล้วทดสอบกับรา

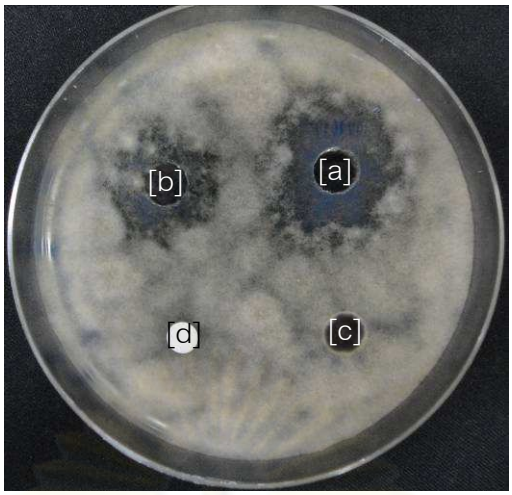
เป้าหมาย พบว่าสารยับยั้งการเจริญของราทนต่อค่า pH ได้ตั้งแต่ 2, 4 และ 6 โดยมีบริเวณยับยั้งเกิดขึ้น 4.31, 5 และ 5.06 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนที่ pH 8 และ 10 จะทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราลดลง เนื่องจากทำได้เพียงลดการเจริญของราแต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ (ตารางที่ 4.5, ขวา)

## 4.6 การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค

### 4.6.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

จากการเลี้ยงแบคทีเรีย N1 ในอาหาร TSB ค่า pH เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นภาวะที่แปรผันแล้วให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุด ในกรณีที่สารออกฤทธิ์เป็นโปรตีน จะใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตโดยการเลี้ยงแบคทีเรีย N1 ในอาหาร TSB ปริมาตร 200 มิลลิลิตรในภาวะที่ได้แปรผันแล้ว นำเซลล์เพาะเลี้ยงไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออก นำส่วนน้ำใสไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวา 20 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 40, 40 ถึง 80 และ 80 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ละลายตะกอนโปรตีนในแต่ละช่วงด้วย Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 แล้วกำจัดเกลือออกด้วยการไดอะไลซ์

ในการทดลองนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ในช่วง 0 ถึง 40 และ 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น เมื่อนำตะกอนโปรตีนที่ได้ไปทดสอบแอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. พบว่าโปรตีนทั้ง 2 ช่วงสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ โดยสารละลายโปรตีนในช่วง 0 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกว้าง 8.5 มิลลิเมตร และสารละลายโปรตีนในช่วง 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกว้าง 6.25 มิลลิเมตร โดยมีชุดควบคุมผลลบเป็น Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 และชุดควบคุมผลบวกเป็นนิสเตติน ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.12)




**รูปที่** 4.12 แสดงการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ด้วยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ [a] และช่วง 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ [b] เปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบ [c] และชุดควบคุมผลบวก [d]

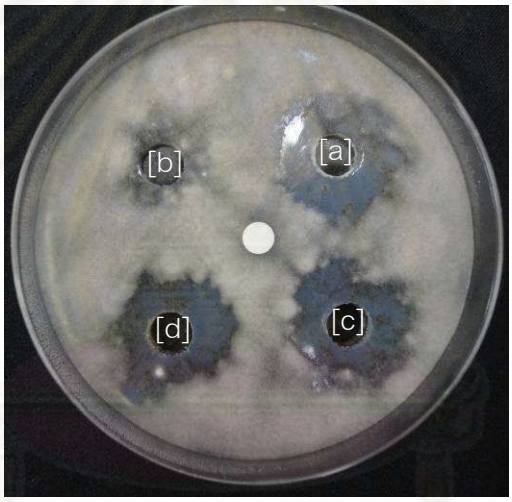
### 4.6.2 การสกัดสารยับยั้งการเจริญของราด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ในกรณีที่สารออกฤทธิ์นี้เป็นสารอินทรีย์อื่นๆ จะใช้วิธีการสกัดสารยับยั้งการเจริญของราด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยการเลี้ยงแบคทีเรีย N1 ในอาหาร TSB ปริมาตร 200 มิลลิลิตรในภาวะที่ได้แปรผันแล้ว นำเซลล์เพาะเลี้ยงไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออก สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม นอร์มัลเฮกเซน หรือ นอร์มัลบิวทานอล นำสารละลายในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ไประเหยตามจุดเดือดของตัวทำละลายอินทรีย์นั้นๆ จนกระทั่งเหลือปริมาตรของสารละลายน้อยที่สุด

เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบแอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. โดยทำให้สารสกัดมีความเข้มข้นเท่ากันที่ประมาณ 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทดสอบกับราเป้าหมายในจานเพาะเลี้ยงที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากอีเทอร์และนอร์มัลบิวทานอลไม่พบการเจริญของราก่อโรค ส่วนจานเพาะเลี้ยงที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากคลอโรฟอร์มเกิดบริเวณยับยั้งขึ้น 2.79 มิลลิเมตร และจานเพาะเลี้ยงที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากนอร์มัลเฮกเซนเกิดบริเวณยับยั้งขึ้น 4.91 มิลลิเมตร ซึ่งในการทดลองนี้มีชุดควบคุมผลลบเป็นตัวทำลายอินทรีย์ชนิดนั้นๆ โดยทดสอบแยกจากชุดทดลองเพื่อป้องกันการเกิดผลบวกลวง อย่างไรก็ตามไม่พบการเจริญของราก่อโรคเกิดขึ้นในชุดควบคุมผลลบทั้ง 4 ชนิด

**4.7 การทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค**

จากการทดลองในข้อ 4.6 การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นวิธีการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสมกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จึงขยายขนาดการเลี้ยงแบคทีเรีย N1 เป็น 2 ลิตร ในอาหาร TSB ค่า pH เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 40 และ 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีน พบว่าสารละลายโปรตีนในช่วง 0 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกว้าง 5.87 มิลลิเมตร และสารละลายโปรตีนในช่วง 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกว้าง 5.12 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.13)




**รูปที่ 4.13** แสดงการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ด้วยสารละลายโปรตีนก่อนการตกตะกอน [a] หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ [b] ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ [c] และช่วง 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ [d]

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีในการยับยั้งรา *Curvularia* sp. จากส่วนน้ำใสทั้งก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ และหลังจากตกตะกอนโปรตีนในช่วง 0 ถึง 40 และ 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณโปรตีน 0.14, 0.13, 0.67 และ 0.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด 251.41, 0.13, 1.74 และ 5.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ให้แอกทิวิตีเท่ากับ 1,280 AUต่อมิลลิลิตร และแอกทิวิตีจำเพาะมากที่สุดเท่ากับ 1,910.45 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน แอกทิ

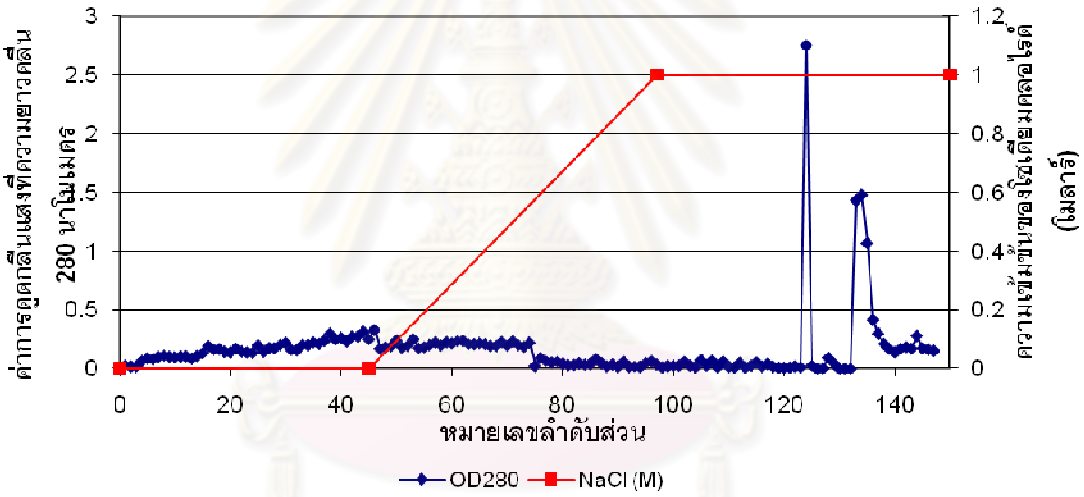
วิตีรวมก่อนการตกตะกอนมีโปรตีน 296,000 AU และมีแอกทิวิตีรวมหลังการตกตะกอนโปรตีนลดลงเป็น 3,328 และ 2,752 AU ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) จากการทดลองขนาดเล็กคือการตกตะกอนโปรตีนปริมาตร 200 มิลลิลิตร และการขยายขนาดขึ้นเป็น 2 ลิตร พบว่าการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด จึงนำโปรตีนส่วนนี้ไปทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

**ตารางที่** 4.6 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนปริมาตร 2 ลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp.

| ตัวอย่าง | ปริมาตร (มิลลิลิตร) | ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) | ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม) | แอกทิวิตี (AU/มิลลิลิตร) | แอกทิวิตีจำเพาะ (AU/มิลลิกรัมของโปรตีน) | แอกทิวิตีรวม (AU) | ความบริสุทธิ์ (เท่า) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| สารสกัดโปรตีนเริ่มต้น | 1,850 | 0.14 | 259 | 160 | 1,142.86 | 296,000 | 1 |
| สารสกัดโปรตีนหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ | 1 | 0.13 | 0.13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 0-40 % | 2.60 | 0.67 | 1.74 | 1,280 | 1,910.45 | 3,328 | 0.011 |
| ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80 % | 8.60 | 0.67 | 5.76 | 320 | 955.22 | 2,752 | 0.009 |

นำโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 0.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายอยู่ใน Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ที่ผ่านการไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์แล้ว มาทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี บนดีอีเออีซัพพอร์ท ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ(anion

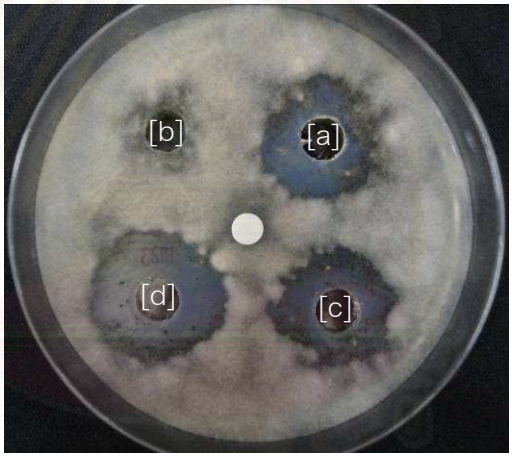
exchanger) ชะโปรตีนที่ไม่จับกับดีอีเออีซัพพอร์ทออกด้วย Tris- HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 แล้วชะโปรตีนที่จับกับเจลออกโดยใช้เกรเดียนท์ของ NaCl 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 เก็บลำดับส่วน ส่วนละ 2 มิลลิลิตร ผลการติดตามปริมาณโปรตีนทั้งก่อนและหลังการชะด้วยเกรเดียนท์ของ NaCl 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ไม่มีพีคใดๆของโปรตีนปรากฏขึ้นในช่วงดังกล่าว แต่พบพีคสูงในช่วงการชะคอลัมน์ด้วย NaOH 1 โมลาร์ เมื่อนำลำดับส่วนต่างๆไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (รูปที่ 4.14) แล้วนำลำดับส่วนที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงใกล้เคียงกันในแต่ละช่วง ได้แก่ ลำดับส่วนที่ 16 ถึง 20, 21 ถึง 25, 35 ถึง 40, 41 ถึง 46, 51 ถึง 53, 55 ถึง 58, 133 ถึง 136, 137 ถึง 139 และ 140 ถึง 145 มารวมกันแล้วนำไปกำจัดเกลือออก และทดสอบแอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. พบว่าลำดับส่วนทั้ง 10 ช่วงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้




**รูปที่ 4.14** แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของลำดับส่วนต่างๆ จากการตกตะกอนโปรตีนปริมาตร 2 ลิตร

จึงได้ขยายขนาดการตกตะกอนโปรตีนจาก 2 ลิตร เป็น 5 ลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนมากขึ้น และได้กำหนดช่วงการตกตะกอนให้แคบลงโดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 20 และ 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ แล้วทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีน พบว่าสารละลายโปรตีนในช่วง 0 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกว้าง 4.87 มิลลิเมตร และสารละลายโปรตีนในช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกว้าง 7.37 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.15) เมื่อวิเคราะห์

ปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีในการยับยั้งรา *Curvularia* sp. จากส่วนน้ำใสทั้งก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ และหลังจากตกตะกอนโปรตีนในช่วง 0 ถึง 20 และ 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณโปรตีน 0.13, 0.13, 2.45 และ 3.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด 575.90, 0.13, 2.45 และ 11.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ให้แอกทิวิตีเท่ากับ 1,280 AUต่อมิลลิลิตรและแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 379.82 AUต่อมิลลิกรัมของโปรตีน แอกทิวิตีรวมก่อนการตกตะกอนมีโปรตีน 708,800 AU และมีแอกทิวิตีรวมลดลงหลังการตกตะกอนโปรตีนเป็น 640 และ 4,352 AU ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) จากการทดลองพบว่าการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด แล้วนำโปรตีนส่วนนี้ไปทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีการสกัดโปรตีนออกจากโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลซึ่งไม่สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้ (แสดงผลในข้อ 4.8)

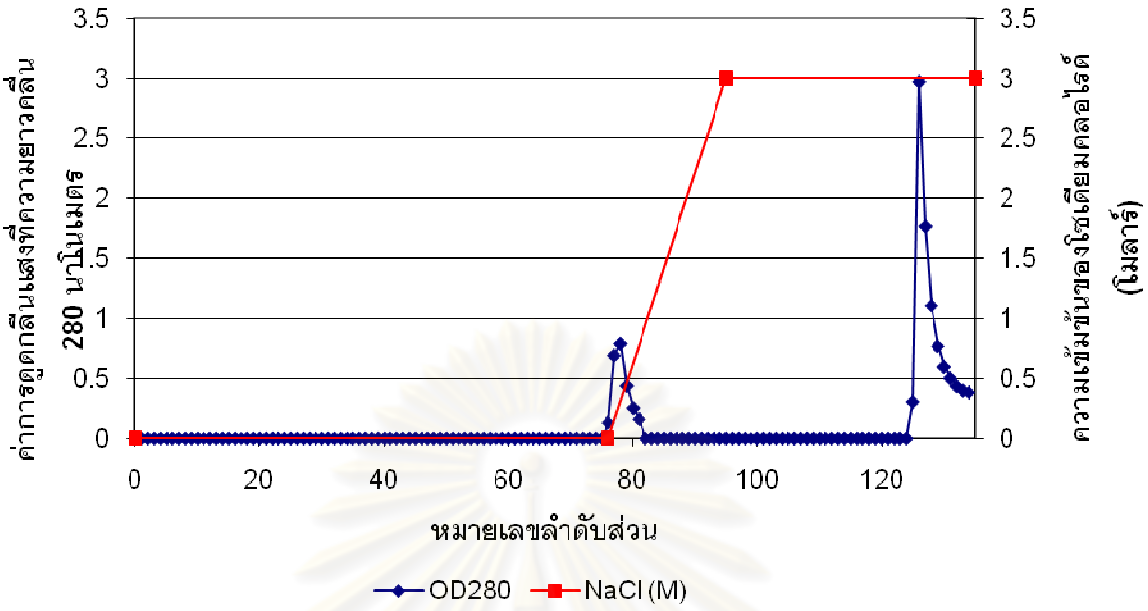



**รูปที่ 4.15** แสดงการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ด้วยสารละลายโปรตีนก่อนการตกตะกอน [a] หลังการนึ่งฆ่าเชื้อ [b] ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ [c] และช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ [d]

**ตารางที่** 4.7 ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนเมื่อขยายขนาดขึ้นเป็น 5 ลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp.

| ตัวอย่าง | ปริมาตร (มิลลิลิตร) | ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) | ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม) | แอกทิวิตี (AU/มิลลิลิตร) | แอกทิวิตีจำเพาะ (AU/มิลลิกรัมของโปรตีน) | แอกทิวิตีรวม (AU) | ความบริสุทธิ์ (เท่า) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| สารสกัดโปรตีนเริ่มต้น | 4,430 | 0.13 | 575.90 | 160 | 1,230.77 | 708,800 | 1 |
| สารสกัดโปรตีนหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ | 1 | 0.13 | 0.13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 0-20 % | 1 | 2.45 | 2.45 | 640 | 261.22 | 640 | 0.21 |
| ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 20-40 % | 3.40 | 3.37 | 11.46 | 1,280 | 379.82 | 4,352 | 0.31 |

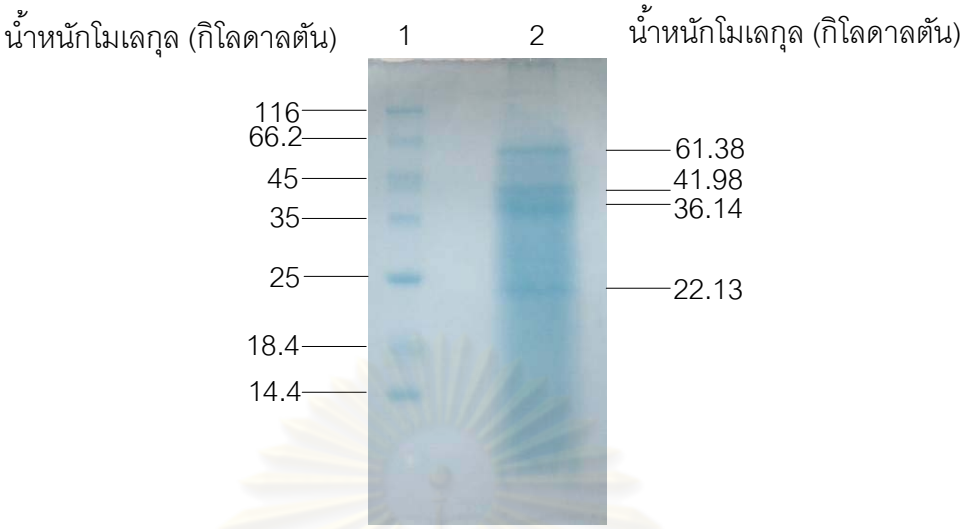
จึงทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้งโดยเพิ่มเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์จาก 1 โมลาร์ เป็น 3 โมลาร์ ผลการติดตามปริมาณโปรตีนทั้งก่อนและหลังการชะด้วยเกรเดียนท์ ของ NaCl 3 โมลาร์ ใน Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ยังคงไม่มีพีคใดๆของโปรตีนปรากฏขึ้นในช่วงดังกล่าวและยังคงปรากฏพีคสูงในช่วงการชะคอลัมน์ด้วย NaOH 1 โมลาร์ เช่นเดิม เมื่อนำลำดับส่วนต่างๆไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (รูปที่ 4.16) แล้วนำลำดับส่วนที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงใกล้เคียงกันในแต่ละช่วง ได้แก่ ลำดับส่วนที่ 76 ถึง 81, 125 ถึง 129 และ 130 ถึง 134 มารวมกันแล้วนำไปกำจัดเกลือออก และทดสอบแอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. พบว่าลำดับส่วนทั้ง 3 ช่วงก็ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้เช่นเดียวกัน




**รูปที่** 4.16 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของลำดับส่วนต่างๆจากการตกตะกอนโปรตีนปริมาตร 5 ลิตร

## 4.8 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรีตีนโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

นำโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ มาหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ใช้โปรตีนความเข้มข้น 120 ไมโครกรัม เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 4.17 ซึ่งแสดงให้เห็นแถบโปรตีนหลักจำนวน 4 แถบ เมื่อวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการึทึมของน้ำหนักโปรตีนมาตรฐานกับระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนตัวอย่าง พบว่าโปรตีนมีน้ำหนัก 61.38, 41.98, 36.14 และ 22.13 กิโลดาลตัน ตามลำดับ




**รูปที่ 4.17** การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง

ช่องที่ 2 โปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นนำโปรตีนความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส จะปรากฏแถบโปรตีนหลัก 4 แถบ นำแต่ละแถบไปสกัดโปรตีนออกจากเจลตามวิธีของบริษัท ThermoScientific โดยตัดแถบโปรตีนแต่ละแถบใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่บรรจุสารละลายสำหรับชะโปรตีน (ภาคผนวก ข22) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดเจลแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยสารละลายสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแต่ไม่สามารถวัดปริมาณโปรตีนได้ เมื่อนำส่วนน้ำใสไปทดสอบกับราเป้าหมายก็พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทดลองนี้ไม่สามารถชะโปรตีนออกจากโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลได้ จึงทดสอบการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้ง ผลการทดลองแสดงในข้อ 4.7

## 4.9 **การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรค** (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

ในการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp. จะเปรียบเทียบกันระหว่างส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ยังไม่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ โดยจะนำส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์แล้วมาเจือจางลำดับส่วนทีละ 2 เท่า นำแต่ละส่วนเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตรไปทดสอบกับราเป้าหมาย จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคคือ 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความกว้างของบริเวณยับยั้งเกิดขึ้น 4 มิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.8

**ตารางที่** 4.8 แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากโปรตีนความเข้มข้นต่างๆในการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp. จากส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

| ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | รัศมีของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) |
|---|---|
| 1,400 | $6.50 \pm 0.58^{a}$ |
| 700 | $4.75 \pm 0.50^{b}$ |
| 350 | $4.00 \pm 0.82^{b}$ |

หมายเหตุ $^{x}$ แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อนำเส้นใยของราที่บริเวณริมขอบของบริเวณยับยั้งมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยกำลังขยาย 400 เท่า พบเส้นใยมีความหนามากขึ้น บวมเป็นปล้อง และบางบริเวณบวมเป็นก้อนกลมขนาดใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบที่ทดสอบด้วยอาหาร PDB เส้นใยมีการเจิญได้ตามปกติโดยเส้นใยมีลักษณะเรียวเล็ก (รูปที่ 4.18)

**รูปที่** 4.18 แสดงลักษณะของเส้นใยปกติที่ทดสอบด้วยอาหาร PDB [a] และเส้นใยที่ทดสอบด้วยโปรตีนที่ความเข้มข้น 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [b] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า

และจากการใช้โปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ มาเจือจางลำดับส่วนทีละ 2 เท่า แล้วนำแต่ละส่วนเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตรไปทดสอบกับราเป้าหมาย พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคคือ 23.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเข้มข้นลดลง 14 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนในส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ยังไม่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยมีรัศมีของบริเวณยับยั้งเกิดขึ้น 3.12 มิลลิเมตร ซึ่งสารละลายโปรตีนนี้แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรค ดังแสดงในตารางที่ 4.9

**ตารางที่** 4.9 แสดงรัศมีของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากโปรตีนความเข้มข้นต่างๆในการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp.

| ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | รัศมีของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) |
|---|---|
| 3,000 | $9.75 \pm 0.35^{a}$ |
| 1,500 | $8.87 \pm 1.59^{ab}$ |
| 750 | $7.87 \pm 0.18^{bc}$ |
| 375 | $7.00 \pm 0.00^{cd}$ |
| 187.50 | $6.12 \pm 0.18^{de}$ |
| 93.75 | $5.50 \pm 0.35^{e}$ |
| 46.87 | $5.06 \pm 0.08^{e}$ |
| 23.43 | $3.12 \pm 0.18^{f}$ |

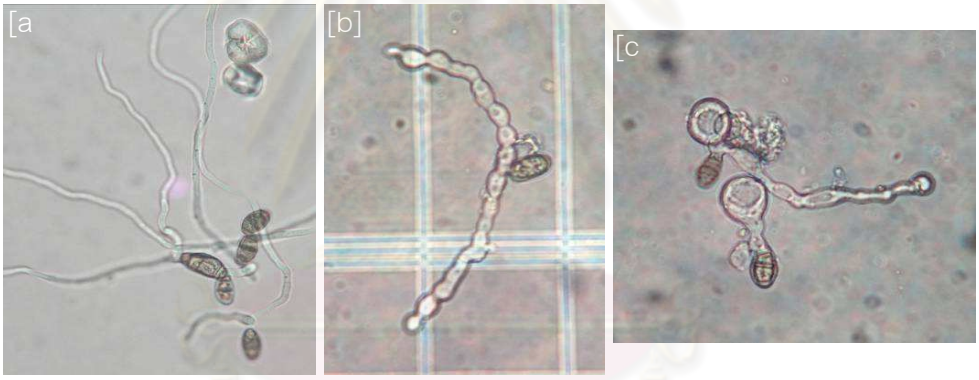
หมายเหตุ $^{x}$ แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี DMRT

เมื่อตรวจสอบการเจริญของเส้นใยราที่บริเวณริมขอบของบริเวณยับยั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยกำลังขยาย 400 เท่า พบเส้นใยมีลักษณะคล้ายกับการทดสอบด้วยส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 4.19)

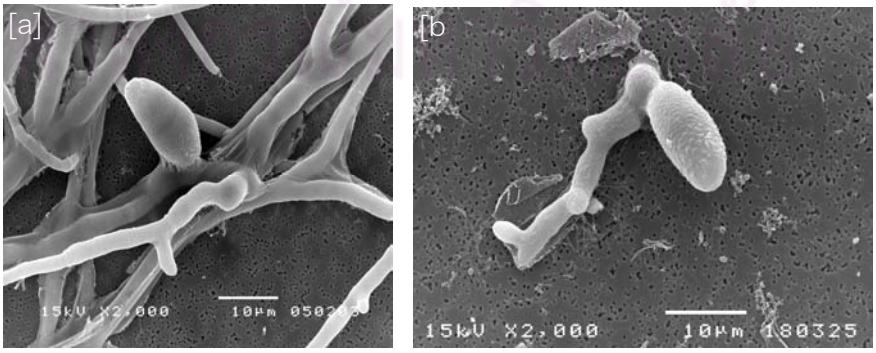
**รูปที่** 4.19 แสดงลักษณะของเส้นใยปกติที่ทดสอบด้วยอาหาร PDB [a] และเส้นใยที่ทดสอบด้วยโปรตีนที่ความเข้มข้น 23.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [b] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า

## 4.10 การทดสอบผลเบื้องต้นของโปรตีนต่อราก่อโรค

เมื่อนำสปอร์ของรามาทดสอบด้วยสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 23.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วตรวจสอบการงอกของสปอร์และลักษณะของเส้นใยทุกๆ 1 ชั่วโมง พบว่าเส้นใยของชุดควบคุมผลลบซึ่งบ่มสปอร์ร่วมกับอาหาร PDB เริ่มงอกในชั่วโมงที่ 3 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 เส้นใยมีขนาดเล็กเรียว (รูปที่ 4.20 [a]) ความหนาของเส้นใยสม่ำเสมอ และแตกแขนงมากมายในชั่วโมงหลังของการทดสอบ ในขณะที่เส้นใยของชุดทดลองจะเริ่มงอกในชั่วโมงที่ 3 เช่นเดียวกันแต่มีความยาวน้อยกว่าชุดควบคุมผลลบ จนกระทั่งในชั่วโมงที่ 14 เส้นใยจะมีลักษณะบวมพองเป็นกระเปาะ (รูปที่ 4.20[b]) หรือบวมเป็นก้อนกลมขนาดใหญ่ใกล้ๆกับบริเวณที่งอกออกจากสปอร์ (รูปที่ 4.20 [c]) และเป็นเช่นนี้ไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 และเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า พบว่าเส้ยใยราในชุดควบคุมเจริญได้ดี (รูปที่ 4.21[a]) แต่เส้นใยราในชุดทดลองงอกได้น้อยกว่า (รูปที่ 4.21[b])




**รูปที่ 4.20** [a] แสดงลักษณะของเส้นใยที่งอกออกจากสปอร์เมื่อทดสอบด้วยอาหาร PDB ที่ 9 ชั่วโมง [a] และเส้นใยที่ทดสอบด้วยโปรตีนที่ความเข้มข้น 23.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 14 ชั่วโมง ([b] และ [c]) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 400 เท่า

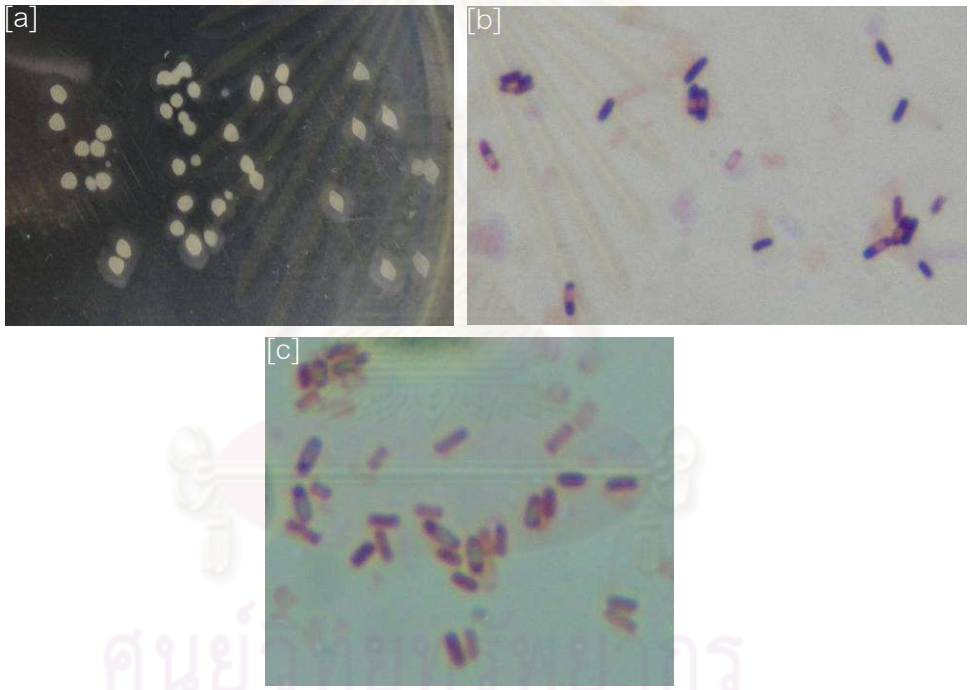



**รูปที่ 4.21** แสดงลักษณะสปอร์และเส้นใยของ *Curvularia* sp. ในชุดควบคุม [a] และชุดทดสอบ [b] ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่กำลังขยาย 2,000 เท่า

## 4.11 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

4.11.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

แบคทีเรีย N1 มีโคโลนีสีขาวขุ่น ลักษณะเหมือนกระสวย ขอบเรียบ แบน และทึบแสง (รูปที่ 4.22 [a]) จากการตรวจสอบแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (รูปที่ 4.22 [b]) รูปร่างเป็นท่อน และสร้างสปอร์ได้ (รูปที่ 4.22 [c]) สำหรับผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี แสดงในตารางที่ 4.10 พบว่าแบคทีเรีย N1 สามารถสร้างเอนไซม์แคทาเลส และรีดิวซ์ไนเตรท รวมทั้งสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไม่สามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนได้



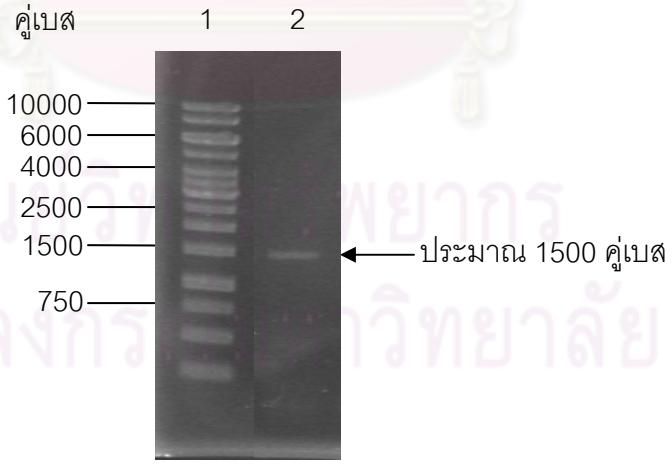

**รูปที่** 4.22 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย N1 บนอาหาร NA [a] ผลการย้อมแกรม [b] และผลการย้อมสปอร์ [c]

**ตารางที่** 4.10 ผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี

| การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี | ผลการทดสอบ |
|---|---|
| 1. การสร้างเอนไซม์แคทาเลส | + |
| 2. การรีดิวซ์ไนเตรท | + |
| 3. MR/VP | -/+ |
| 4. การใช้ซิเตรท | - |
| 5. การย่อยสลายเจลาติน | - |

4.11.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย N1 ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ โดยเลี้ยงแบคทีเรีย N1 บนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียมาหลายๆโคโลนีใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ที่มี Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 8 บรรจุอยู่ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาสเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาสเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอของแบคทีเรียไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้คู่ของ 10F กับ 1500R เป็นไพรเมอร์ ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จำนวน 30 รอบ แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (รูปที่ 4.23)

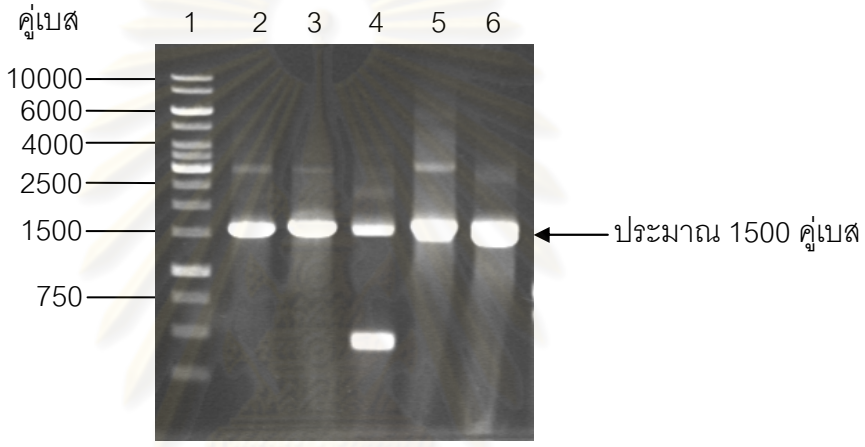



**รูปที่** 4.23 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์

ช่องที่ 1 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์

จากนั้นนำสารละลายผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* DH5α นำไปคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของทรานสฟอร์แมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ โดยใช้คู่ของ 10F กับ 1500R เป็นไพรเมอร์ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส



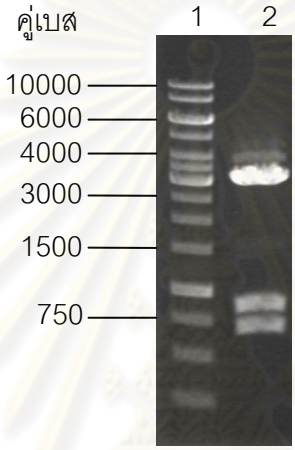

**รูปที่ 4.24** ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำโคโลนีพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบทรานสฟอร์แมนท์ที่มีส่วนของบริเวณ 16S rDNA แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector

ช่องที่ 1 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 ถึง 6 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้โคโลนีที่คัดเลือกได้บนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพินิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากรูปที่ 4.24 แสดงให้เห็นว่าทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2 3 5 และ 6 ได้รับพลาสมิด pGEM®-T Easy Vector ที่มีส่วนของบริเวณ 16S rDNA แทรกอยู่ จึงเลือกทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 6 ไปสกัดพลาสมิดที่มีส่วนของบริเวณ 16S rDNA แทรกอยู่ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพื่อยืนยันว่าภายในพลาสมิดมีส่วนของบริเวณ 16S rDNA แทรกอยู่จริง ตรวจสอบผลการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส จากรูปที่ 4.25 พบว่า

รีคอมบิแนนท์พลาสมิดสามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เนื่องจากชิ้นส่วนของบริเวณ 16S rDNA มีตำแหน่งที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้ ดังนั้นจึงพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ถูกตัดเป็นสองชิ้นที่มีขนาดประมาณ 700 และ 800 คู่เบส ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวมีชิ้นส่วนบริเวณ 16S rDNA ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส แทรกอยู่ จึงส่งรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนบริเวณ 16S rDNA โดยใช้บริการของบริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย




**รูปที่** 4.25 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ช่องที่ 1 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนบริเวณ 16S rDNA (partial sequence) มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ด้วยโปรแกรม BlastN พบว่าแบคทีเรีย N1 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ MSB10 เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาคผนวก ง

# บทที่ 5
# สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ราก่อโรคในปทุมมานับเป็นปัญหาหนึ่งที่มีผลทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพลดลง เนื่องจากราสามารถสร้างสปอร์ที่ปลิวกระจายไปตามแรงลมหรืออาจติดไปกับเสื้อผ้าของเกษตรกร ซึ่งสปอร์นั้นทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ประกอบกับช่วงเวลาที่ราแพร่กระจายได้ดีอยู่ในช่วงที่ปทุมมาให้ผลผลิตมากที่สุดคือช่วงฤดูฝน สภาพภูมิอากาศจึงส่งเสริมให้ราเจริญเร็วทำให้เกิดการติดเชื้อลุกลามเป็นวงกว้าง แม้บางครั้งการแพร่ระบาดจะไม่รุนแรง แต่เมื่อเกิดการติดเชื้อขึ้นแล้ว ผลิตภัณฑ์มักถูกปฏิเสธจากผู้รับซื้อหรือตลาดคู่ค้า ราก่อโรคในปทุมมามีหลายชนิดที่ทำให้เกิดโรค 2 ชนิดหลักคือโรคใบไหม้และโรคใบจุด (โรคจุดสีน้ำตาล) ในงานวิจัยนี้ได้คัดแยกราก่อโรคในปทุมมาที่มีอาการจุดสีน้ำตาล ซึ่งพบจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กจำนวนมากกระจายไปทั่วทั้งต้นโดยจะมีความหนาแน่นของจุดสีน้ำตาลแต่ละบริเวณแตกต่างกัน โดยจะพบจุดสีน้ำตาลหนาแน่นมากที่บริเวณใบ ลดลงมาที่บริเวณกลีบดอก และมีจำนวนน้อยที่ก้านช่อดอก หลังจากแยกเชื้อบนอาหาร PDA ที่มีคลอแรมเฟนิคอลแล้ว พบว่าราที่คัดแยกได้เจริญเร็วที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า สามารถระบุได้ว่าเป็นราในสกุล *Curvularia* ถึงแม้จะยังไม่มีรายงานการติดเชื้อจาก *Curvalaria* sp. ในปทุมมา แต่อย่างไรก็ตาม *Curvalaria* sp. ก็จัดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคใบจุดในขิงซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับปทุมมา (นิพนธ์ ทวีชัย และคณะ, 2542)

การกำจัดราก่อโรคมักจะใช้สารเคมีเหมือนกับการควบคุมราโรคพืชทั่วๆไป และเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่ามีผลเสียต่างๆเกิดขึ้นมากมาย จึงมีการประยุกต์ใช้วิธีทางชีวภาพเพื่อควบคุมราโรคพืชมากขึ้น วิธีที่ยังคงศึกษาอยู่เรื่อยมาคือการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์หรือผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรค (Pliego และคณะ, 2007; Thomashow และคณะ, 2007; Card และคณะ, 2009) ซึ่งแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ได้ถูกค้นพบและศึกษาความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชมากที่สุด โดยเฉพาะ *B. subtilis* เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในดิน ทนต่อความร้อนสูงได้ เจริญเร็วในอาหารเหลว สร้างสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างได้ (Li และคณะ, 2009) และยังผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่า 20 ชนิด สารออกฤทธิ์เหล่านี้ได้แก่ สารอินทรีย์ระเหย (volatile organic compound) (Chaurasia และคณะ, 2005; Zou และคณะ, 2007; Liu และคณะ, 2008) โปรตีนขนาดเล็กและเพปไทด์ (Liu

และคณะ, 2007; Liu และคณะ, 2010) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ปฏิกิริยาชีวเคมี ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์บางส่วนบริเวณ 16S rDNA พบว่า แบคทีเรีย N1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน และสร้างสปอร์ได้ ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนบริเวณ 16S rDNA มีความใกล้เคียงกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ MSB10 ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ จึงตั้งชื่อว่า *Bacillus subtilis* N1 ซึ่งเป็นกลุ่มสกุลของแบคทีเรียที่นำมาใช้ควบคุมราโรคพืชกันมากที่สุดดังได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

เมื่อทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* N1 ในการยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. บนอาหาร PDA จะเกิดบริเวณยับยั้งมากที่สุดเมื่อเทียบกับไอโซเลตอื่นๆ จึงเลือก *B. subtilis* N1 ไปทดลองในขั้นต่อไป โดยการหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ที่ดีที่สุด ด้วยการแปรผันทั้งหมด 4 ภาวะคือ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและเวลาในการเพาะเลี้ยง การทดลองที่ได้จากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ *B. subtilis* N1 คือการเลี้ยงในอาหาร TSB pH 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง อาหาร TSB ช่วยส่งเสริมการเจริญของ *B. subtilis* N1 ได้มากที่สุด โดยสังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ซึ่งมีค่าสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบส่วนประกอบของอาหารทั้ง 3 ชนิด อาหาร NB ประกอบด้วยผงสกัดจากเนื้อ และเปปโตน อาหารเหลว LB ประกอบด้วย ผงสกัดจากยีสต์ ทริปโตน และโซเดียมคลอไรด์ ส่วนอาหาร TSB ประกอบด้วย เคซีน ซอยเปปโตน เด็กซ์โทรส โซเดียมคลอไรด์ และไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่อุดมสมบูรณ์ ใช้สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียทั่วไปหรือแบคทีเรียที่เจริญยาก เคซีนกับซอยเปปโตนร่วมกันทำหน้าที่เป็นแหล่งไนโตรเจน เด็กซ์โทรสเป็นแหล่งพลังงาน โซเดียมคลอไรด์ควบคุมสมดุลออสโมติก ในขณะที่ไดโพแทสเซียมฟอสเฟตคอยควบคุม pH ซึ่งจะเห็นได้ว่าองค์ประกอบของอาหาร TSB มีคุณค่าทางอาหารมากกว่าอาหารอีก 2 ชนิด ซึ่งนอกจากจะสนับสนุนการเจริญได้ดีที่สุดแล้ว ยังให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุดด้วย ผลการทดลองที่คล้ายกันได้รับจากงานวิจัยของ Kumar และคณะ (2009) โดย *B. subtilis* MTCC-8114 มีอัตราการเจริญและมีแอกทิวิตีดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร TSB pH 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเจริญได้น้อยในอาหาร NB เช่นเดียวกัน ในการแปรผันภาวะทั้ง 3 ภาวะนั้น *B. subtilis* N1 จะเข้าสู่ exponential phase ในชั่วโมงที่ 3 และเข้าสู่ stationary phase ในชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไป โดยแบคทีเรียผลิตสารยับยั้งราได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ถึง 24 แต่มีแอกทิวิตีดีในชั่วโมงที่ 12 ถึง 18 จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า *B. subtilis* N1 สร้างสารออกฤทธิ์ต่อ *Curvularia* sp. ในรูปแบบที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญ (non-

growth associated product) เพราะสารดังกล่าวผลิตออกมาเมื่อแบคทีเรียเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase นอกจากนี้สารยับยั้งราจาก *B. subtilis* N1 ยังมีความเสถียรต่ออุณหภูมิและค่า pH ต่างๆที่ใช้ทดสอบได้อีกด้วย

ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นว่า *B. subtilis* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากมายหลายชนิดปะปนกันอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งไม่อาจระบุได้ว่าสารชนิดใดมีสมบัติเด่นในการยับยั้งราเป้าหมาย จึงจำเป็นที่จะต้องสกัดแยกสารออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ทราบเบื้องต้นว่าเป็นสารชนิดใดแล้วจึงทำให้สารบริสุทธิ์ต่อไป การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เป็น 2 วิธีหลักในการแยกสารออกฤทธิ์ (Williams, 2003) สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดได้แก่ อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม นอร์มัลเฮกเซน และนอร์มัลบิวทานอล โดยที่อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน เป็นตัวทำละลายพื้นฐานที่ใช้สกัดแยกสารอินทรีย์ทั่วไปชนิดไม่มีขั้วไปจนถึงมีขั้วปานกลาง (Hennion และ Scribe, 1993) ส่วนบิวทานอลมักใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ (Mellan, 1950; Doolittle, 1954) เมื่อนำสารสกัดจากแต่ละตัวทำละลายอินทรีย์ไปทดสอบกับราเป้าหมาย ปรากฏว่า *Curvularia* sp. ในชุดควบคุมผลลบที่ทดสอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด รวมทั้งชุดทดลองที่สกัดด้วยอีเทอร์และนอร์มัลบิวทานอลไม่มีการเจริญเกิดขึ้น แต่ราเจริญได้ในชุดที่ทดสอบโดยสารที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มและนอร์มัลเฮกเซน เกิดบริเวณยับยั้ง 2.79 และ 4.91 มิลลิเมตรตามลำดับ ซึ่งไม่สามารถยืนยันได้แน่นอนว่า *Curvularia* sp. ถูกยับยั้งการเจริญจากสารยับยั้งราที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากในชุดควบคุมผลลบนั้นราไม่เจริญ อาจเกิดจากสาเหตุดังนี้ 1) ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นพิษต่อเซลล์รา 2) ราอาจไวต่อตัวทำละลายอินทรีย์ และ/หรือ 3) ตัวทำละลายไม่สามารถสกัดสารยับยั้งราออกมาได้ ในกรณีของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและนอร์มัลเฮกเซนที่ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งได้ อาจเกิดจากสารยับยั้งราและตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดมีสภาพขั้วใกล้เคียงกันจึงถูกสกัดออกมาได้ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์มีผลต่อการคืนสู่สภาพปกติ (recovery) ของสารยับยั้งราหลังกระบวนการสกัด ดังนั้นการเลือกชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญ (Ahmed, 2008)

สำหรับการแยกสารโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ในขั้นแรกจะใช้ส่วนน้ำใสจากเซลล์เพาะเลี้ยง *B. subtilis* N1 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสแล้วในปริมาณน้อยเพื่อหาช่วงการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 40 และ 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกโปรตีนที่ยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ได้ โดยช่วง 0 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ มีแอกทิวิตีดีกว่าช่วง 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ จึง

ขยายขนาดการเลี้ยง N1 ขึ้นเป็น 2 ลิตรเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น แล้วทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ ผลการติดตามปริมาณโปรตีนทั้งก่อนและหลังการชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์ของ NaCl 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ไม่มีพีคของโปรตีนปรากฏขึ้นจนกระทั่งชะคอลัมน์ด้วย NaOH 1 โมลาร์ จึงจะปรากฏพีคสูงขึ้นเพียง 1 พีค

จากการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบในครั้งแรกไม่สำเร็จ อาจเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของโปรตีนที่มีน้อยเกินไปเพียง 0.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือโปรตีนอาจมีความแรงของประจุสูงซึ่งเกรเดียนต์ของ NaCl 1 โมลาร์ ชะโปรตีนออกมาไม่ได้ (Rosenberg, 2005) จึงได้ทดลองขยายขนาดการเลี้ยง *B. subtilis* N1 จาก 2 ลิตร เป็น 5 ลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนมากขึ้น ทั้งนี้ทราบแล้วว่าโปรตีนมีแอกทิวิตีดีจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ จึงกำหนดช่วงการตกตะกอนให้แคบลงโดยอยู่ในช่วง 0 ถึง 20 และ 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการตกตะกอนที่เหมาะสมที่สุดในงานวิจัยนี้อยู่ในช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ โดยได้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 3.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบอีกครั้ง รวมทั้งเพิ่มเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์จาก 1 โมลาร์เป็น 3 โมลาร์ ผลการติดตามปริมาณโปรตีนทั้งก่อนและหลังการชะด้วยเกรเดียนท์ ของ NaCl 3 โมลาร์ ใน Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ยังคงไม่มีพีคใดๆของโปรตีนปรากฏขึ้นในช่วงดังกล่าวและยังคงปรากฏพีคสูงในช่วงการชะคอลัมน์ด้วย NaOH 1 โมลาร์ เช่นเดิม เมื่อนำโปรตีนช่วงนี้ไปทดสอบก็พบว่าโปรตีนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ได้ การทดลองทั้ง 2 ครั้งไม่สามารถทำบริสุทธิ์โปรตีนได้ เนื่องมาจากโปรตีนอาจมีความแรงของประจุสูงจึงเข้าไปแทนที่ counter ion แล้วยึดจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุเอาไว้ (Amersham Biosciences, 2002) โดยที่เกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์แตกตัวให้ประจุที่มีความแรงไม่พอที่จะชะโปรตีนให้หลุดจากตัวแลกเปลี่ยนประจุได้ถึงแม้จะเพิ่มเกรเดียนท์จาก 1 โมลาร์เป็น 3 โมลาร์แล้วก็ตาม เมื่อถึงขั้นตอนการชะคอลัมน์ด้วย NaOH 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์จะแตกตัวให้ประจุที่มีความแรงจึงชะโปรตีนออกมา ปรากฏเป็นพีคสูงในช่วงดังกล่าว แต่โปรตีนไม่มีแอกทิวิตีแล้วเนื่องจากโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเบสแก่จึงทำให้โปรตีนเสียสภาพไป (Karlsson และคณะ, 1997)

เมื่อนำโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมาทำบริสุทธิ์ด้วยการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และปรากฏแถบโปรตีนหลัก 4 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 61.38, 41.98, 36.14 และ 22.13 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เมื่อนำแต่ละแถบไปสกัดโปรตีนออกจากเจลด้วยการแช่ในสารละลายสำหรับชะโปรตีน

จากนั้นนำสารละลายไปหาปริมาณโปรตีน พบว่าไม่สามารถวัดปริมาณโปรตีนได้ และเมื่อทดสอบกับราเป้าหมายก็ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ อาจเป็นไปได้ว่าสารละลายสำหรับชะโปรตีนสกัดโปรตีนออกจากเจลไม่ได้ หรือมีปริมาณโปรตีนน้อยเกินไป หรือหากแม้สกัดได้ก็อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการที่โปรตีนถูกทำให้เสียสภาพจากการเติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้าไปในกระบวนการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แล้วสารละลายสำหรับชะโปรตีนไม่สามารถทำให้โปรตีนกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ (renature) โปรตีนจึงไม่มีแอกทิวิตีนั่นเอง จากการศึกษาของ Leelasuphakul และคณะ (2006) พบว่าการทำนอนดีเนเจอริงพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของเอนไซม์บีตากลูคาเนสที่ผลิตจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 ปรากฏแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ แต่เมื่อทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสจะเห็นแถบโปรตีน 2 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยลง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์บีตากลูคาเนสนี้ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อยที่ต้องทำงานร่วมกันจึงจะมีแอกทิวิตี แต่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนเกิดขึ้นหลังจากการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ดังนั้นการศึกษาดังกล่าวอาจเป็นเหตุผลสนับสนุนการสูญเสียแอกทิวิตีของโปรตีนจาก *B. subtilis* N1 เนื่องจากทั้ง 4 หน่วยย่อยของโปรตีนน่าจะต้องทำงานร่วมกันจึงจะยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ได้

ในการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp. จะเปรียบเทียบกันระหว่างส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ยังไม่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ เท่ากับ 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้เท่ากับ 23.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความสามารถมากกว่าส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ยังไม่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนถึง 14 เท่า โดยโปรตีนจากทั้ง 2 ส่วนมีผลต่อการเจริญของ *Curvularia* sp. เหมือนกันคือ ทำให้เส้นใยของราเกิดความผิดปกติ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์ก็สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้แล้ว ดังเช่นการศึกษาของ พรพรรณ อู่สุวรรณ (2550) ที่ทดสอบความสามารถของ *Bacillus* spp. ในรูปแบบเซลล์แขวนลอยและส่วนน้ำใสต่อการควบคุมการเกิดโรคในใบองุ่น ก็พบว่าผลิตภัณฑ์จาก *Bacillus* spp. ทั้ง 2 รูปแบบยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในใบองุ่นได้โดยไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์เลย หากพิจารณาถึงขั้นตอนการประยุกต์ใช้จริงในสิ่งแวดล้อม โปรตีนที่ไม่ได้ทำบริสุทธิ์ถือว่ามีข้อดีในแง่ของการประหยัดเวลาและ

ต้นทุนในการผลิต เนื่องจากกระบวนการทำบริสุทธิ์มักจะใช้สารเคมีและเครื่องมือราคาแพงและใช้เวลาพอสมควร

ดังนั้นผลจากการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในการที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์จาก *B. subtilis* N1 เพื่อใช้ควบคุมราก่อโรคในปทุมมาแทนการใช้สารเคมี ซึ่งงานวิจัยนี้ค้นพบว่าส่วนน้ำใสจากเซลล์เพาะเลี้ยง *B. subtilis* N1 ที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์แล้ว ยังคงให้โปรตีนที่มีประสิทธิภาพและยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. ได้ จึงอาจนำโปรตีนส่วนนี้ไปประยุกต์ใช้กับพืชในสิ่งแวดล้อมจริงได้ ทั้งนี้ต้องผ่านการทดสอบความคงตัวของโปรตีนต่อสภาพแวดล้อม และไม่มีผลกระทบต่อคน สัตว์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่ไม่เกี่ยวข้องก่อนการนำไปใช้จริง และเป้าหมายหนึ่งที่ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมจากงานวิจัยนี้คือ การหาวิธีที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์โปรตีน จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนเพื่อให้ทราบชนิดของโปรตีนแล้วประเมินว่าหมู่ฟังก์ชันใดของโปรตีนที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน รวมทั้งการทดสอบความสามารถของโปรตีนในรูปแบบต่างๆ ต่อการควบคุมราก่อโรคในต้นปทุมมาด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# รายการอ้างอิง

**ภาษาไทย**


กรมวิชาการเกษตร. 2542. ปทุมมา. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร. 2545. เกษตรที่ดีที่เหมาะสมสำหรับปทุมมา. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ.

กรรณิการ์ เพี้ยนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และอภิรัชต์ สมฤทธิ์. 2541. โรคจุดสนิมของปทุมมา. *วารสารกสิกร*. 71: 525-528.

คงยุทธ เลิศมงคลธรรม. 2549. การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช. โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2544. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการโครงการการถ่ายทอดเทคโนโลยีทางด้านคลินิกสุขภาพพืช. นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. หน้า 1-20.

นันทินี ศรีจุมปา และ สุรชาติ คูอาริยะกุล. 2548. การแพร่ระบาดและการป้องกันกำจัดโรคใบไหม้และโรคใบจุดปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep). *วารสารวิชาการเกษตร*. 23: 241-251.

นิทยา อักษรเนียม. 2548. ปทุมมาพันธุ์ใหม่ แบบฉบับการเพิ่มมูลค่าพืชสวน. *เคหการเกษตร*. 29: 77-87.

นิพนธ์ ทวีชัย และคนอื่นๆ. 2542. การผลิตขิงปลอดโรค. เจฟิล์มโปรเซล: กรุงเทพฯ.

นิพัฒน์ สุขวิบูลย์ และ วิภาดา ทองทักษิณ. 2545. ปทุมมาพัฒนาจากป่าสู่เมืองถึงการส่งออก. *วารสารกสิกร*. 75: 59-77.

ประภาศรี ศรีคง. 2552. การแยกและฤทธิ์ของสารต้านราก่อโรคในมะเขือเทศจากแบคทีเรีย เอ็ม 10. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรพรรณ อู่สุวรรณ. 2550. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

มนัสวี ฉายผาด และ วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2549. การบ่งชี้เชื้อสาเหตุโรคใบและดอกไหม้ของปทุมมา (*Curcuma alismatifolia*) โดยใช้ DNA sequence ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 rDNA และการศึกษาผลของสารเคมีที่ใช้ควบคุม. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 37: 1025-1028.

วิภาดา ทองทักษิณ และ นิพัฒน์ สุขวิบูลย์. 2537. ปทุมมา. *วารสารกสิกร*. 67: 415-419.

ศิริพร วันฟั่น. 2545. ผักปลอดสารพิษ. *นิตยสารนิวไลฟ์*. 76: 22-23.

สุรชาติ คูอาริยะกุล. 2542. โรคปทุมมาและการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 กรมวิชาการเกษตร:

สุรชาติ คูอาริยะกุล. 2543. กลุ่มอาการโรคใบจุดเกิดจากเชื้อราโฟม่าของปทุมมาและการป้องกันกำจัด. *เคหการเกษตร*. 24: 121-125.

สุรางค์ สุธิราวุธ. 2538. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียใน genus *Bacillus*. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โสภิตา ตาปัน และ โสระยา ร่วมรังษี. 2549. ผลของธาตุอาหารพืชต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา. *วารสารเกษตร มช*. 22: 95-103.

อรวรรณ วิชัยลักษณ์. 2548. ปทุมมา. กลุ่มส่งเสริมการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ กรมส่งเสริมการเกษตร

**ภาษาอังกฤษ**

Ahmed, S.A. 2008. Optimization of production and extraction parameters of *Bacillus megaterium* levansucrase using solid-state fermentation. *Journal of Applied Sciences Research*. 10: 1199-1204.

Alam, S.I., Bansod, S., Goel, A.K., and Singh, L. 2011. Characterization of an environmental strain of *Bacillus thuringiensis* from a hot spring in western Himalayas. *Current Microbiology*. 62: 547-556.

Amersham Biosciences. 2002. Ion exchange chromatography. Amersham Pharmacia Biotech Bjorkgatan 30, SE-751 84 Uppsala, Sweden.

Aneja, M., Gianfagna, T.J., and Hebbar, P.K. 2005. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 67: 304-307.

Card, S.D., Walter, M., Jasper, A., Sztenberg, A., and Stewart, A. 2009. Targeted selection of antagonistic microorganisms for control of *Botrytis cinerea* of strawbery in New Zealand. *Australian Plant Pathology*. 38: 183-192.

Chaurasia, B., et al. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiological Research*. 160: 75-81.

Cho, K.M., et al. 2009. Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. *Food Control*. 20: 402-406.

Dedej, S., Delaplane, K.S., and Scherm, H. 2004. Effectiveness of honey bees in delivering the biocontrol agent *Bacillus subtilis* to blueberry flowers to suppress mummy berry disease. *Biological Control*. 31: 422-427.

Doolittle, A.K. 1954. The technology of solvent and plastiizers. John Wiley and Sons: New York.

Felse, P.A., and Panda, T. 1999. Studies on application of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*. 20: 505-512.

Gardener, B.B.M. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathogy*. 94: 1252-1258.

Goldner, W.S., et al. 2010. Pesticide use and thyroid disease among women in the agricultural health study. *American Journal of Epidemiology*. 171: 455-464.

Grimault, V., Anais, G., and Prior, P. 1994. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. *Plant Pathology Journal*. 43: 663-668.

Gunarantna, K.R., and Balasubramanian, R. 1994. Partial purification and properties of extracellular chitinase produced by *Acremonium obclavatum*, an antagonist to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10: 342- 345.

Hassan, Y.I., and Bullerman, L.B. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. tolerans isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology*. 121: 112-115.

Hellman, B., and Laryea, D. 1990. Inhibitory effects of benomyl and carbendazim on the [3H]thymidine incorporation in various organs of the mouse -- Evidence for a more pronounced action of benomyl. *Toxicology*. 61: 161-169.

Hennion, M.C., and Scribe, P. 1993. Sample handling strategies for the analysis of organic compounds from environmental water samples. in Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Scientific Publishing Company. pp 26-27.

Huang, C.J., Wang, T.K., Chung, S.C., and Chen, C.Y. 2005. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 82-88.

Karlsson, E., Ryden, L., and Brewer, J. 1997. Ion exchange chromatography. in Protein purification. New York: John Wiley and Sons. p 190.

Katz, E., and Demain, A.L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological Reviews*. 41: 449-474.

Kavitha, S., Senthilkumar, S., Gnanamanickam, S., Inayathullah, M., and Jayakumar, R. 2005. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. *Process Biochemistry*. 40: 3236-3243.

Kim, P.I., and Chung, K.C. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters*. 234: 177-183.

Kumar, A., Saini, P., and Shrivastava, J.N. 2009. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Indian Journal of Experimental Biology*. 47: 57-62.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Larone, D.H. 1995. Medically important fungi - A guide to identification. 3rd ed. ASM Press: Washington, D.C.

Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P., and Phongpaichit, S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of [beta]-1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 990-997.

Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., and Chuenchitt, S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 48: 113-121.

Li, J., et al. 2009. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 10: 264-272.

Liu, D., Cai, J., Xie, C.C., Liu, C., and Chen, Y.H. 2010. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme and Microbial Technology*. 46: 252-256.

Liu, W., Mu, W., Zhu, B., and Liu, F. 2008. Antifungal activities and components of VOCs produced by *Bacillus subtilis* G8. *Current research in bacteriology*. 1: 28-34.

Liu, Y., et al. 2007. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Peptides*. 28: 553-559.

Mannanov, R.N., and Sattarova, R.K. 2001. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. *Chemistry of Natural Compounds*. 37: 117-123.

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., and Drosinos, E.H. 2003. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*. 64: 265-271.

Mejia, L.C., et al. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*. 46: 4-14.

Mellan, I. 1950. Industrial solvents. 2nd ed. Reinhold: New York.

Moita, C., Feio, S.S., Nunes, L., Curto, M.J.M., and Roseiro, J.C. 2005. Optimisation of physical factors on the production of active metabolites by *Bacillus subtilis* 355 against wood surface contaminant fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 55: 261-269.

Nakaho, K., Hibino, H., and Miyagawa, H. 2000. Possible mechanisms limiting movement of *Ralstonia solanacearum* in resistant tomato tissues. *Journal of Phytopathology*. 148: 181-190.

Ogata, K., et al. 1997. Construction of a *Fibrobacter succinogenes* genomic map and demonstration of diversity at the genomic level. *Current Microbiology*. 35: 22-27.

Oppenheim, A.B., and Chett, I. 1992. Cloned chitinase in fungal pathogen control strategies. *Trends in Biotechnology*. 10: 392- 394.

Park, K., et al. 2007. Induced systemic resistance by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 suppressed bacterial wilt in tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Pathology Journal*. 23: 22-25.

Patel, V.J., Tendulkar, S.R., and Chattoo, B.B. 2004. Bioprocess development for the production of an antifungal molecule by *Bacillus licheniformis* BC98. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98: 231-235.

Pliego, C., et al. 2007. Selection for biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. *Research in Microbiology*. 158: 463-470.

Rahman, M.S., Ano, T., and Shoda, M. 2006. Second stage production of iturin A by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14. *Journal of Biotechnology*. 125: 513-515.

Rosenberg, I.M. 2005. Protein analysis and purification. 2nd ed. Birkhauser: Boston.

Ruger, H.J., Fritze, D., and Sproer, C. 2000. New psychrophilic and psychrotolerant *Bacillus marinus* strains from tropical and polar deep-sea sediments and emended description of the species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 1305-1313.

Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Habor Laboratory: Cold Spring Habor.

Scherm, H., Ngugi, H.K., Savelle, A.T., and Edwards, J.R. 2004. Biological control of infection of blueberry flowers caused by *Monilinia vaccinii-corymbosi*. *Biological Control*. 29: 199-206.

St-Germain, G., and Summerbell, R. 1996. Identifying filamentous fungi - A clinical laboratory handbook. ed. Star Publishing Company: Belmont, California.

Sutton, D.A., Fothergill, A.W., and Rinaldi, M.G. 1998. Guide to clinically significant fungi. Williams and Wilkins: Baltimore.

Tatagiba, J.D.S., Maffia, L.A., Barreto, R.W., Alfenas, A.C., and Sutton, J.C. 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica*. 26: 8-19.

Thomashow, L.S., Weler, D.M., Mavrodi, O.V., and D.V., M. 2007. Selecting, monitoring, and enhancing the performance of bacterial biocontrol agents: principles, pitfalls, and progress. in Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management. New York: Springer.

Turnbull, P.C.B. 1996. *Bacillus*. in Medical microbiology. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston.

US EPA. 1998. Pesticidal chemicals classified as known,probable or possible human carcinogens. ed. Office of Pesticide Programs: Washington, D.C.

Wang, S.L., Lin, T.Y., Yen, Y.H., Liao, H.F., and Chen, Y.J. 2006. Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate Research*. 341: 2507-2515.

Williams, J.S. 2003. Characterization of bioactive secondary metabolites from *Pseudomonas aeruginosa* and *Prorocentrum* species. Master's thesis Center for Marine Science University of North Carolina at Wilmington.

Yilmaz, M., Soran, H., and Beyatli, Y. 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological Research*. 161: 127-131.

Yu, G., Guo, Q., Xie, L., Liu, Y., and Wang, X. 2009. Effects of subchronic exposure to carbendazim on spermatogenesis and fertility in male rats. *Toxicology and Industrial Health*. 25: 41-47.

Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L., and Bertagnolli, B.L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Biology and Biochemistry*. 34: 955-963.

Zhang, J., et al. 2010. *Bacillus oceanisediminis* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 2924-2929.

Zhang, L., Wu, G.L., Wang, Y., Dai, J., and Fang, C.X. 2011. *Bacillus deserti* sp. nov., a novel bacterium isolated from the desert of Xinjiang, China. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 99: 221-229.

Zhao, Z., et al. 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology*. 101: 292-297.

Zou, C.S., Mo, M.H., Gu, Y.Q., Zhou, J.P., and Zhang, K.Q. 2007. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 2371-2379.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ก

# สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

**1. อาหารเลี้ยงเชื้อ** Nutrient Broth (NB)

| | | |
|---|---|---|
| แบคโตเปปโตน | 5 | กรัม |
| สารสกัดจากเนื้อ | 3 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**2. อาหารเลี้ยงเชื้อ** Nutrient Agar (NA)

| | | |
|---|---|---|
| แบคโตเปปโตน | 5 | กรัม |
| สารสกัดจากเนื้อ | 3 | กรัม |
| ผงวุ้น | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ผสมสารตามลำดับ (ยกเว้นผงวุ้น) ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ เติมผงวุ้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**3. อาหารเลี้ยงเชื้อ** Potato Dextrose Broth (PDB)

| | | |
|---|---|---|
| มันฝรั่ง | 200 | กรัม |
| Dextrose | 20 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.1$\pm$0.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**4. อาหารเลี้ยงเชื้อ** Potato Dextrose Agar (PDA)

| | | |
|---|---|---|
| มันฝรั่ง | 200 | กรัม |
| Dextrose | 20 | กรัม |
| ผงวุ้น | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ผสมสารตามลำดับ (ยกเว้นผงวุ้น) ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.1±0.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เติมผงวุ้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**5. อาหารเลี้ยงเชื้อ** Luria Bertani Broth (LB Broth)

| | | |
|---|---|---|
| แบคโตเปปโตน | 10 | กรัม |
| สารสกัดจากยีสต์ | 5 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ | 10 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**6. อาหารเลี้ยงเชื้อ** Trypticase Soy Broth (TSB)

| | | |
|---|---|---|
| ทริปโตน | 17 | กรัม |
| ซอยโตน | 3 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ | 5 | กรัม |
| ไดโซเดียมฟอสเฟต | 2.5 | กรัม |
| Dextrose | 2.5 | กรัม |

ผสมสารตามลำดับในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**7. Gelatin Medium**

| | | |
|---|---|---|
| แบคโตเปปโตน | 0.5 | กรัม |
| สารสกัดจากเนื้อ | 0.3 | กรัม |
| เจลาติน | 12 | กรัม |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| | | |
|---|---|---|
| ผงวุ้น | 1.5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร คนให้ละลาย จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

8. MR/VP Medium

| | | |
|---|---|---|
| แบคโตเปปโตน | 7 | กรัม |
| เด็กซ์โทรส | 5 | กรัม |
| ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต | 5 | กรัม |

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.9 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9. Nitrate Broth

| | | |
|---|---|---|
| แบคโตเปปโตน | 5 | กรัม |
| สารสกัดจากเนื้อ | 3 | กรัม |
| โพแทสเซียมไนเตรท | 1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร คนให้ละลาย จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

10. Simmons Citrate Agar

| | | |
|---|---|---|
| โซเดียมซิเตรท | 2 | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ | 5 | กรัม |
| ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต | 1 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต | 0.2 | กรัม |
| แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต | 1 | กรัม |
| บรอมไทมอลบลู | 0.08 | กรัม |

ผงวุ้น 15 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร คนให้ละลาย จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ข

# สารเคมี

1. **กลีเซอรอล 30 เปอร์เซนต์ในบัฟเฟอร์**

นำกลีเซอรอล 87 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 345 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่า pH 7.5 ปริมาตร 655 มิลลิลิตรให้เข้ากัน

2. **คลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

คลอแรมเฟนิคอล 100 มิลลิกรัม

ละลายใน absolute ethanol ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตรและกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตท ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. **ชุดสกัดดีเอ็นเออกจากเจลอะกาโรส** Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

Buffer QG

Buffer PE

Buffer EB

Qiaquick Spin Column

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม absolute ethanol ปริมาตร 24 มิลลิลิตรลงใน Buffer PE

4. **ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย** Qiaprep Spin Minipreo Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

Buffer P1

Buffer P2

Buffer N3

Buffer PB

Buffer PE

RNase A

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Collection tube

Qiaprep Spin Column

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเติม absolute ethanol ปริมาตร 24 มิลลิลิตรลงใน Buffer PE

5. **ไซโคลเฮกซิไมด์ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

| | | |
|---|---|---|
| ไซโคลเฮกซิไมด์ | 100 | มิลลิกรัม |

ละลายในเอธานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. **นิสเตติน ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

| | | |
|---|---|---|
| นิสเตติน | 40 | มิลลิกรัม |

ละลายในสารละลาย dimethylformamideให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตรและกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. **บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)**

| | | |
|---|---|---|
| Trisma Base ($C_4H_{11}NO_3$) | 242 | กรัม |
| กรดอะซิติกเข้มข้น | 57.1 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ | 100 | มิลลิลิตร |

ผสมสารทั้งสามชนิดด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนใช้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

8. **บีโนมิล ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

| | | |
|---|---|---|
| บีโนมิล | 10 | มิลลิกรัม |

ละลายในสารละลาย dimethylformamideให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตรและกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

9. **สารละลายกรดซัลฟานิลิก 0.8 เปอร์เซ็นต์ในกรดอะซิติก 30 เปอร์เซ็นต์**

| | | |
|---|---|---|
| กรดซัลฟานิลิก | 0.8 | กรัม |
| กรดอะซิติก | 30 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 70 | มิลลิลิตร |

ผสมกรดซัลฟานิลิกกับน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อนจนกระทั่งละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปผสมกับกรดอะซิติก เก็บรักษาในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. **สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์**

| | | |
|---|---|---|
| กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ | 84 | มิลลิลิตร |

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชา

11. **สารละลายแกรมไอโอดีน**

| | | |
|---|---|---|
| ผงไอโอดีน | 50 | กรัม |
| โพแทสเซียมไอโอดีน | 100 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแล้วเก็บรักษาในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

12. **สารละลายคริสตัลไวโอเลต**

| | | |
|---|---|---|
| ผงคริสตัลไวโอเลต | 2 | กรัม |
| เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ | 10 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 90 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกัน แล้วเก็บรักษาในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

13. **สารละลายซาฟรานิน**

| | | |
|---|---|---|
| ผงซาฟรานิน | 0.5 | กรัม |
| เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ | 20 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 80 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแล้วเก็บรักษาในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14. **สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซนต์**

| | | |
|---|---|---|
| โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต | 10 | กรัม |

ละลายในน้ำปลอดประจุและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (ปฏิบัติในตู้ดูดควัน)

15. **สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์**

ละลายเกร็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

16. **สารละลายเมทิลเรด**

| | | |
|---|---|---|
| ผงเมทิลเรด | 0.02 | กรัม |
| เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ | 60 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 40 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกัน แล้วเก็บรักษาในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

17. **สารละลายผสมของ 10 มิลลิโมลาร์ dNTPs**

ผสม dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ชนิดละ 10 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

18. **สารละลายโพแทสเซียม 40 เปอร์เซ็นต์**

ละลายเกร็ดโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

19. **สารละลายมาลาไคท์กรีน**

| | | |
|---|---|---|
| ผงมาลาไคท์กรีน | 5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

ละลายผงมาลาไคท์กรีนในน้ำกลั่น จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแล้วเก็บรักษาในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

20. **สารละลายสำหรับล้างสี** (Destaining solution)

| | | |
|---|---|---|
| เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ | 400 | มิลลิลิตร |
| กรดอะซิติกเข้มข้น | 100 | มิลลิลิตร |

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

21. **สารละลายสำหรับย้อมสี** (Staining solution)

| | | |
|---|---|---|
| สีคูแมสซี บริลเลียนท์บลู อาร์ 250 | 2 | กรัม |
| เอธานอล | 400 | มิลลิลิตร |
| กรดอะซิติกเข้มข้น | 100 | มิลลิลิตร |

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน กรองด้วยกระดาษกรอง จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

22. **สารละลายสำหรับชะโปรตีนออกจากโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล**

| | | |
|---|---|---|
| โซเดียมคลอไรด์ | 0.86 | กรัม |
| สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 7.5 | 5 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 8 | 20 | ไมโครลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้ง 3 ชนิดให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

23. **สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

| | | |
|---|---|---|
| เอธิเดียมโบรไมด์ | 1 | มิลลิกรัม |

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรและเก็บในภาชนะปิดสนิทให้พ้นแสง

24. **สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์**

| | | |
|---|---|---|
| แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต | 100 | มิลลิกรัม |
| น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ | 1 | มิลลิลิตร |

ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่ปราศจากเชื้อและละลายจนหมด

25. **สารละลาย IPTG ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์**

| | | |
|---|---|---|
| IPTG | 238 | มิลลิกรัม |

ละลายในน้ำปลอดประจุให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตรและกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตท ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

26. **สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5**

| | | |
|---|---|---|
| NaCl | 58.44 | กรัม |

ละลาย NaCl ในสารละลาย Tris-HClความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

27. **สารละลาย naphthylamine 0.5เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายกรดอะซิติก 30 เปอร์เซ็นต์**

| | | |
|---|---|---|
| N,N-dimethyl-$\alpha$- naphthylamine | 0.5 | กรัม |
| กรดอะซิติก | 30 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 70 | มิลลิลิตร |

ผสมน้ำกลั่นและกรดอะซิติกเข้าด้วยกันจากนั้นเติม N,N-dimethyl-$\alpha$- naphthylamine ลงไป เก็บรักษาในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

28. **สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 8**

| | | |
|---|---|---|
| Trisma Base ($C_4H_{11}NO_3$) | 1.21 | กรัม |

ละลาย Trisma Base ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

29. **สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5**

| | | |
|---|---|---|
| Trisma Base ($C_4H_{11}NO_3$) | 121 | กรัม |

ละลาย Trisma Base ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย

ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้ให้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 มิลลิโมลาร์

30. **สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8**

| | | |
|---|---|---|
| Trisma Base ($C_4H_{11}NO_3$) | 60.57 | กรัม |

ละลาย Trisma Base ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

31. **สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8**

| | | |
|---|---|---|
| Trisma Base ($C_4H_{11}NO_3$) | 181.71 | กรัม |

ละลาย Trisma Base ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

32. **สารละลาย Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์**

| | | |
|---|---|---|
| Tween 80 | 100 | ไมโครลิตร |
| น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

33. **สารละลาย X-gal 4 เปอร์เซ็นต์**

| | | |
|---|---|---|
| X-gal | 400 | มิลลิกรัม |

ละลายในสารละลาย dimethylformamide ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร พันหลอดด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์ และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**34. สารละลาย 10X อิเล็กโทรดบัฟเฟอร์**

| | | |
|---|---|---|
| Trisma Base ($C_4H_{11}NO_3$) | 30 | กรัม |
| ไกลซีน | 145 | กรัม |
| โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต | 10 | กรัม |

แยกละลายสารทั้งสามชนิดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมารวมกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

**35. แอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

| | | |
|---|---|---|
| แอมพิซิลลิน | 100 | มิลลิกรัม |

ละลายในน้ำปลอดประจุให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตรและกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตท ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**36. 5X Laemmli buffer**

| | | |
|---|---|---|
| กลีเซอรอล 87 เปอร์เซ็นต์ | 5.75 | มิลลิลิตร |
| สารละลาย Tris-HCl pH 6.8 | 2.5 | มิลลิลิตร |
| บรอมฟีนอลบลู | 0.05 | กรัม |
| โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต | 1 | กรัม |

ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกันและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ให้ผสมกับ 2-เมอร์แคปโตเอธานอล ในอัตราส่วน สารละลาย 950 ไมโครลิตรต่อ 2-เมอร์แคปโตเอธานอล 50 ไมโครลิตร

**37. α-naphthol solution**

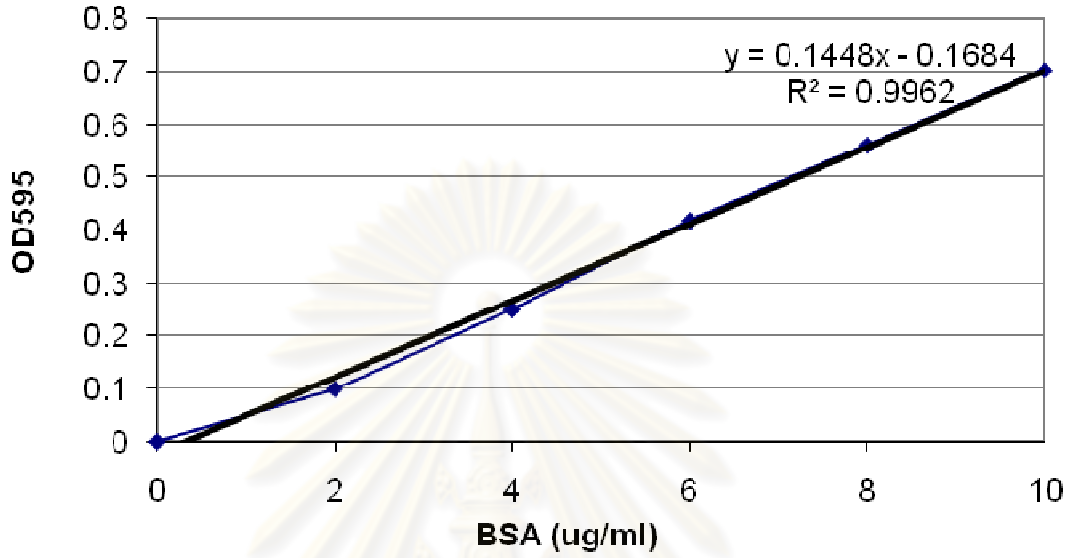
| | | |
|---|---|---|
| ผง α-naphthol | 5 | กรัม |
| เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ | 100 | มิลลิลิตร |

ละลายผงผง α-naphthol ในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

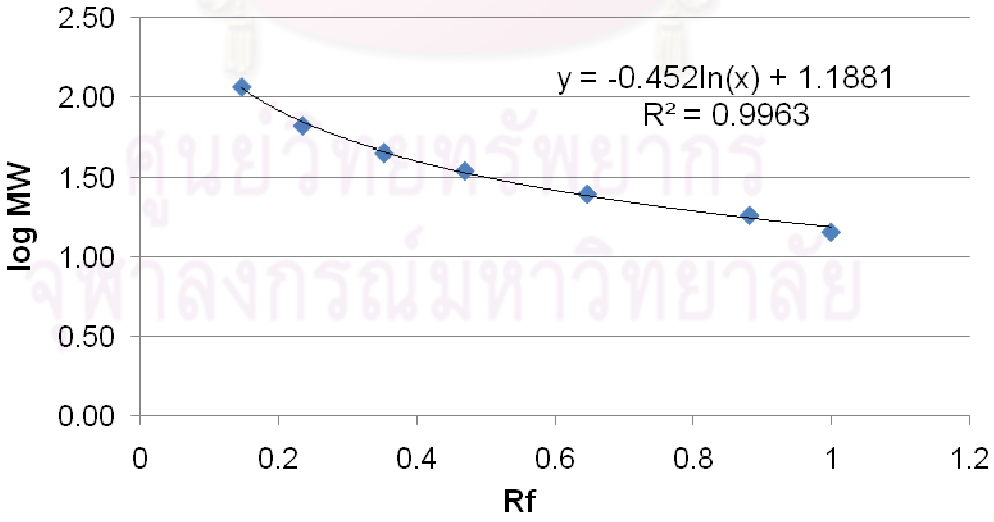
# ภาคผนวก ค

## 1. กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน




n

## 2. กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล




ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ง

## ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย N1 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

gb|FJ189764.1| *Bacillus subtilis* strain MSB10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1607

Score = 1534 bits (1700), Expect = 0.0

Identities = 865/874 (99%), Gaps = 3/874 (0%)

Strand=Plus/Minus

```
Query  1     ATGGCGGCCGCGGGAATTCGATT---GGCTACTTGCTTACGACTTCACCCCAATCATCTG  57
             |||||||||||||||||||||||   ||||||  |  ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1593  ATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTTACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTG  1534

Query  58    TCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACT  117
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1533  TCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACT  1474

Query  118   CTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATCCACCGCGGCATGCTGA  177
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  1473  CTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGA  1414

Query  178   TCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTG  237
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1413  TCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTG  1354

Query  238   AGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATT  297
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1353  AGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATT  1294

Query  298   GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC  357
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1293  GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC  1234

Query  358   CTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATC  417
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1233  CTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATC  1174

Query  418   AAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACC  477
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1173  AAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACC  1114

Query  478   ATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGA  537
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1113  ATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGA  1054

Query  538   TGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTT  597
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1053  TGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTT  994

Query  598   GTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAG  657
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  993   GTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAG  934
```

```
Query  658   TGCCTAATGCGTTAGCTACAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATC  717
              ||| |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  933   TGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATC  874

Query  718   GTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTC  777
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  873   GTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTC  814

Query  778   AGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGC  837
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  813   AGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGC  754

Query  838   ATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTC  871
              |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  753   ATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTC  720
```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก จ

## การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

**1. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้แอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด**

Descriptives

Inhibition

| Media | Hour | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| NB | 9.00 | 1.563 | .51539 | .259 | 1.044 | 2.081 |
| | 12.00 | 3.500 | .40825 | .259 | 2.981 | 4.019 |
| | 15.00 | 3.775 | .65383 | .259 | 3.256 | 4.294 |
| | 18.00 | 2.750 | .45644 | .259 | 2.231 | 3.269 |
| | 21.00 | 2.750 | .45644 | .259 | 2.231 | 3.269 |
| | 24.00 | 1.938 | .31458 | .259 | 1.419 | 2.456 |
| LB | 9.00 | 1.750 | .64550 | .259 | 1.231 | 2.269 |
| | 12.00 | 3.563 | .37500 | .259 | 3.044 | 4.081 |
| | 15.00 | 2.000 | .00000 | .259 | 1.481 | 2.519 |
| | 18.00 | 2.000 | .81650 | .259 | 1.481 | 2.519 |
| | 21.00 | 2.438 | .59073 | .259 | 1.919 | 2.956 |
| | 24.00 | 2.125 | .25000 | .259 | 1.606 | 2.644 |
| TSB | 9.00 | 4.875 | .47871 | .259 | 4.356 | 5.394 |
| | 12.00 | 5.625 | .32275 | .259 | 5.106 | 6.144 |
| | 15.00 | 4.438 | .23936 | .259 | 3.919 | 4.956 |
| | 18.00 | 5.000 | .81650 | .259 | 4.481 | 5.519 |
| | 21.00 | 3.375 | .75000 | .259 | 2.856 | 3.894 |
| | 24.00 | 4.375 | .43301 | .259 | 3.856 | 4.894 |

\

Media Homogeneous Subsets

Duncan[a,, b] Inhibition

| Media | N | Subset 1 | Subset 2 | Subset 3 |
|---|---|---|---|---|
| 2.00 | 24 | 2.3125 | | |
| 1.00 | 24 | | 2.7125 | |
| 3.00 | 24 | | | 4.6146 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Hour Homogeneous Subsets

Duncan[a,,b] Inhibition

| Hour | N | Subset 1 | Subset 2 | Subset 3 | Subset 4 |
|---|---|---|---|---|---|
| 9.00 | 12 | 2.7292 | | | |
| 24.00 | 12 | 2.8125 | 2.8125 | | |
| 21.00 | 12 | 2.8542 | 2.8542 | | |
| 18.00 | 12 | | 3.2500 | 3.2500 | |
| 15.00 | 12 | | | 3.4042 | |
| 12.00 | 12 | | | | 4.2292 |
| Sig. | | .582 | .054 | .469 | 1.000 |

**2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการแปรผันค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้แอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด**

Description

Inhibition

| pH | Hour | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval Lower Bound | 95% Confidence Interval Upper Bound |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | 9.00 | 5.250 | .95743 | .306 | 4.636 | 5.864 |
| | 12.00 | 4.375 | .94648 | .306 | 3.761 | 4.989 |
| | 15.00 | 1.750 | .50000 | .306 | 1.136 | 2.364 |
| | 18.00 | 2.250 | .50000 | .306 | 1.636 | 2.864 |
| | 21.00 | 2.125 | .25000 | .306 | 1.511 | 2.739 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 24.00 | 2.000 | .81650 | .306 | 1.386 | 2.614 |
| 7 | 9.00 | 4.750 | .64550 | .306 | 4.136 | 5.364 |
| | 12.00 | 5.625 | .75000 | .306 | 5.011 | 6.239 |
| | 15.00 | 5.000 | .00000 | .306 | 4.386 | 5.614 |
| | 18.00 | 4.250 | .50000 | .306 | 3.636 | 4.864 |
| | 21.00 | 2.938 | .31458 | .306 | 2.323 | 3.552 |
| | 24.00 | 4.875 | 1.03078 | .306 | 4.261 | 5.489 |
| 8 | 9.00 | 4.500 | 1.00000 | .306 | 3.886 | 5.114 |
| | 12.00 | 3.000 | .00000 | .306 | 2.386 | 3.614 |
| | 15.00 | 2.000 | .00000 | .306 | 1.386 | 2.614 |
| | 18.00 | 1.750 | .28868 | .306 | 1.136 | 2.364 |
| | 21.00 | 1.813 | .23936 | .306 | 1.198 | 2.427 |
| | 24.00 | 1.437 | .42696 | .306 | .823 | 2.052 |

pH Homogeneous Subsets

Duncan[a,,b] Inhibition

| | | Subset | | |
|---|---|---|---|---|
| pH | N | 1 | 2 | 3 |
| 8 | 24 | 2.4167 | | |
| 6 | 24 | | 2.9583 | |
| 7 | 24 | | | 4.5729 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Hour Homogeneous Subsets

Duncan[a,,b] Inhibition

| | | Subset | | |
|---|---|---|---|---|
| Hour | N | 1 | 2 | 3 |
| 21.00 | 12 | 2.2917 | | |
| 18.00 | 12 | 2.7500 | 2.7500 | |
| 24.00 | 12 | 2.7708 | 2.7708 | |
| 15.00 | 12 | | 2.9167 | |
| 12.00 | 12 | | | 4.3333 |
| 9.00 | 12 | | | 4.8333 |
| Sig. | | .075 | .535 | .051 |

**3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ให้แอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ดีที่สุด**

Descriptive

Inhibition

| Temp | Hour | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| 30°C | 9.00 | 6.000 | .81650 | .363 | 5.272 | 6.728 |
| | 12.00 | 5.750 | .50000 | .363 | 5.022 | 6.478 |
| | 15.00 | 5.125 | .47871 | .363 | 4.397 | 5.853 |
| | 18.00 | 2.750 | .28868 | .363 | 2.022 | 3.478 |
| | 21.00 | 2.125 | .25000 | .363 | 1.397 | 2.853 |
| | 24.00 | 2.500 | .00000 | .363 | 1.772 | 3.228 |
| 37°C | 9.00 | 4.000 | .91287 | .363 | 3.272 | 4.728 |
| | 12.00 | 7.000 | .70711 | .363 | 6.272 | 7.728 |
| | 15.00 | 6.000 | .81650 | .363 | 5.272 | 6.728 |
| | 18.00 | 5.375 | .75000 | .363 | 4.647 | 6.103 |
| | 21.00 | 5.500 | 1.08012 | .363 | 4.772 | 6.228 |
| | 24.00 | 4.000 | 1.22474 | .363 | 3.272 | 4.728 |
| 40°C | 9.00 | 5.375 | | .363 | 4.647 | 6.103 |
| | 12.00 | 5.500 | 1.08012 | .363 | 4.772 | 6.228 |
| | 15.00 | 4.000 | .91287 | .363 | 3.272 | 4.728 |
| | 18.00 | 4.000 | .40825 | .363 | 3.272 | 4.728 |
| | 21.00 | 4.000 | .40825 | .363 | 3.272 | 4.728 |
| | 24.00 | 2.750 | .28868 | .363 | 2.022 | 3.478 |

Temp Homogeneous Subsets

Duncan[a,,b] Inhibition

| Temp | N | Subset | |
|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 |
| 30°C | 24 | 4.0417 | |
| 40°C | 24 | 4.2708 | |
| 37°C | 24 | | 5.3125 |
| Sig. | | .279 | 1.000 |

Hour Homogeneous Subsets

Duncan[a,,b] Inhibition

| Hour | N | Subset 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|
| 24.00 | 12 | 3.0833 | | | |
| 21.00 | 12 | | 3.8750 | | |
| 18.00 | 12 | | 4.0417 | | |
| 15.00 | 12 | | | 5.0417 | |
| 9.00 | 12 | | | 5.1250 | |
| 12.00 | 12 | | | | 6.0833 |
| Sig. | | 1.000 | .576 | .780 | 1.000 |

**4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากโปรตีนความเข้มข้นต่าง ๆ ในการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp. จากส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย**

Descriptive

| MICs | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval Lower Bound | Upper Bound |
|---|---|---|---|---|---|
| 350.00 | 4.000 | .81650 | .323 | 3.270 | 4.730 |
| 700.00 | 4.750 | .50000 | .323 | 4.020 | 5.480 |
| 1400.00 | 6.500 | .57735 | .323 | 5.770 | 7.230 |

MICs Homogeneous Subsets

Duncan[a,,b] Inhibition

| MICs | N | Subset 1 | 2 |
|---|---|---|---|
| 350.00 | 4 | 4.0000 | |
| 700.00 | 4 | 4.7500 | |
| 1400.00 | 4 | | 6.5000 |
| Sig. | | .135 | 1.000 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากโปรตีนความเข้มข้นต่างๆ ในการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia* sp.

Descriptive

Inhibition

| MICs | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| 23.43 | 3.125 | .17678 | .424 | 2.146 | 4.104 |
| 46.87 | 5.060 | .08485 | .424 | 4.081 | 6.039 |
| 93.75 | 5.500 | .35355 | .424 | 4.521 | 6.479 |
| 187.50 | 6.125 | .17678 | .424 | 5.146 | 7.104 |
| 375.00 | 7.000 | .00000 | .424 | 6.021 | 7.979 |
| 750.00 | 7.875 | .17678 | .424 | 6.896 | 8.854 |
| 1500.00 | 8.875 | 1.59099 | .424 | 7.896 | 9.854 |
| 3000.00 | 9.750 | .35355 | .424 | 8.771 | 10.729 |

MICs Homogeneous Subsets

Duncan[a,,b]

Inhibition

| MICs | N | Subset | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 23.43 | 2 | 3.1250 | | | | | |
| 46.87 | 2 | | 5.0600 | | | | |
| 93.75 | 2 | | 5.5000 | | | | |
| 187.50 | 2 | | 6.1250 | 6.1250 | | | |
| 375.00 | 2 | | | 7.0000 | 7.0000 | | |
| 750.00 | 2 | | | | 7.8750 | 7.8750 | |
| 1500.00 | 2 | | | | | 8.8750 | 8.8750 |
| 3000.00 | 2 | | | | | | 9.7500 |
| Sig. | | 1.000 | .127 | .183 | .183 | .134 | .183 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกนิฏฐกา แดนราช เกิดเมื่อวันที่ 3 กันยายน พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดสระบุรี ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2549 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 ที่อยู่ปัจจุบัน 2 หมู่ 1 ต.ศาลารีไทย อ.เสาไห้ จ.สระบุรี 18160

ผลงานวิชาการ

กนิฏฐกา แดนราชและปาหนัน เริงสำราญ. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรีย N1 ในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในปทุมมา. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7. 7-8 ธันวาคม 2553. หน้า 830-837.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย