

สารออกฤทธิ์จาก *Bacillus subtilis* N3 และ *Pseudomonas aeruginosa* RS1
ในการยับยั้งราก่อโรคในกล้วยไม้

นางสาวรพีวรรณ โสวรรณปรีชา



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACTIVE COMPOUNDS FROM *Bacillus subtilis* N3 AND *Pseudomonas aeruginosa* RS1
INHIBITING ORCHID-PATHOGENIC FUNGI

Miss Rapeewan Sowanpreecha



A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

สารออกฤทธิ์จาก *Bacillus subtilis* N3 และ *Pseudomonas aeruginosa* RS1 ในการยับยั้งราก่อโรค
ในกล้วยไม้

โดย

นางสาวรพีวรรณ โสวรรณปรีชา

สาขาวิชา

จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ประทีปดีลีน สีหนนพน)

รพีวรรณ โสวรรณปรีชา : สารออกฤทธิ์จาก *Bacillus subtilis* N3 และ *Pseudomonas aeruginosa* RS1 ในการยับยั้งราก่อโรคในกล้วยไม้ (ACTIVE COMPOUNDS FROM *Bacillus subtilis* N3 AND *Pseudomonas aeruginosa* RS1 INHIBITING ORCHID-PATHOGENIC FUNGI) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช, 159 หน้า.

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อหาแบคทีเรียและผลิตภัณฑ์โปรตีนจากแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Curvularia lunata* และ *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นราและราหน้าที่ก่อให้เกิดโรคในกล้วยไม้ตามลำดับ งานวิจัยส่วนแรกศึกษาโดยใช้ *Pseudomonas aeruginosa* RS1 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ซึ่งเป็นราหน้าที่ก่อให้เกิดโรคเน่าดำหรือโรคเน่าเข้าไส้ในกล้วยไม้ ผลการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้ง *P. palmivora* พบว่า ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB pH7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง การตกตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นในช่วง 40-80% แล้วนำไปทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A พบว่า โปรตีนในช่วงลำดับส่วนที่ 9-10 และ 33-34 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* เท่ากับ 75.00% และ 82.35% ตามลำดับ โดยเมื่อนำไปวิเคราะห์หัตถ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และวิเคราะห์หัตถ์ด้วย Q exactive plus hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry ที่ต่อกับ liquid chromatography พบว่าช่วงลำดับส่วนที่ 9-10 มีมวลโมเลกุลของโปรตีนหลายขนาด ได้แก่ 54 kDa, 32 kDa และ 20 kDa โดยโปรตีนเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับคะตะเลส, โปรตีเอส และโปรตีเอส IV ตามลำดับ โปรตีนที่อยู่ในช่วงลำดับส่วนที่ 33-34 มีมวลโมเลกุลของโปรตีนเท่ากับ 40 kDa, 32 kDa และ 29 kDa และมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนซึ่งยึดเกาะไคติน, โปรตีเอส และโปรตีเอส ตามลำดับ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าโปรตีนบริสุทธิ์ส่งผลให้เส้นใยของ *P. palmivora* มีการเจริญผิดปกติ

งานวิจัยอีกส่วนหนึ่งศึกษาโดยใช้ *B. subtilis* N3 ที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของ *C. lunata* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคดอกสนิมในกล้วยไม้ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่ผลิตสารต้านราได้ดีที่สุด แล้วนำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความเข้มข้น 40-80% แล้วทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A พบว่า โปรตีนในช่วงลำดับส่วนที่ 51-60 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ดีที่สุด เมื่อนำโปรตีนไปวิเคราะห์หัตถ์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ ESI-Q-TOF MS/MS พบว่าโปรตีนกิ่งบริสุทธิ์นี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 39.88 kDa โปรตีนกิ่งบริสุทธิ์นี้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนคล้ายแฟลกเจลลินของ *Bacillus subtilis* สูงถึง 69% ของบริเวณที่ครอบคลุมลำดับของโปรตีน จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนที่คาดหมายจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแฟลกเจลลินของ *B. subtilis* N3 พบว่ามีความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของแฟลกเจลลินของ *B. subtilis* มากถึง 100% เมื่อทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* N3 ในการต้านการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า *B. subtilis* N3 มีความสามารถในการยับยั้งราได้หลายชนิด เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจาก *B. subtilis* N3 กับต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจาก *B. subtilis* N3 สามารถป้องกันและรักษากล้วยไม้จากการเกิดโรคโดย *P. palmivora* ได้ดี แบคทีเรียและ/หรือโปรตีนที่ได้จากงานวิจัยนี้ มีสมบัติที่น่าจะสามารถนำไปพัฒนาเชิงพาณิชย์เพื่อใช้ในการเกษตรแบบยั่งยืนได้ต่อไป

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5472845623 : MAJOR MICROBIOLOGY

KEYWORDS: ANTIFUNGAL, BACILLUS, PSEUDOMONAS, CURVULARIA, PHYTOPHTHORA, ORCHID

RAPEEWAN SOWANPREECHA: ACTIVE COMPOUNDS FROM *Bacillus subtilis* N3 AND *Pseudomonas aeruginosa* RS1 INHIBITING ORCHID-PATHOGENIC FUNGI. ADVISOR: ASST. PROF.PANAN RERNGSAMRAN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.POLKIT SANGVANICH, Ph.D., 159 pp.

This research aims to obtain bacteria and their protein products that are able to inhibit the growth of *Curvularia lunata* and *Phytophthora palmivora* which are classified as true fungus and water mold that caused diseases in orchid, respectively. The first part of the research was studied using *Pseudomonas aeruginosa* RS1 which was able to inhibit the growth of the water mold *P. palmivora* that caused black rot diseases in orchid. The optimal conditions for this bacterium to produce bioactive compound against *P. palmivora* were to grow the mold in LB liquid media, pH7 at 37 degree Celsius for 21 hours. 40-80% saturation of ammonium sulfate precipitation of the protein from the supernatant, and further purification by DEAE Bio-gel A anion exchange column chromatography demonstrated that the proteins from fractions 9-10 and 33-34 had inhibition capability against the growth of *P. palmivora* at 75.00% and 82.35% inhibition, respectively. SDS-PAGE and liquid chromatography equipped with Q exactive plus hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry analyses revealed that the fractions 9-10 composed of proteins with different molecular weights of about 54 kDa, 32 kDa and 20 kDa with similarity to catalase, protease, and protease IV, respectively. The proteins in fractions 33-34 contained proteins of 40 kDa, 32 kDa and 29 kDa which were similar to chitin binding protein, protease, and protease, respectively. Morphological study under microscope showed that the purified protein resulted in abnormal growth characteristics of *P. palmivora*'s hyphae.

Another part of the research was studied using *B. subtilis* N3 which was able to inhibit the growth of *C. lunata* that caused flower rusty spot diseases in orchid. When grew the bacteria at the optimal conditions for producing antifungal substance, followed by performed ammonium sulfate precipitation at 40-80% saturation, and purified by DEAE Bio-gel A column chromatography, it was found that proteins from fraction 51-60 retained antifungal activity against *C. lunata*. SDS-PAGE and ESI-Q-TOF MS/MS analyses revealed that the semi-purified protein obtained comprised of the protein with molecular weight of about 39.88 kDa. This protein illustrated the close similarity to flagellin-like protein of *Bacillus subtilis* at the coverage of 69%. Deduced amino acid sequence from the nucleotide sequence of flagellin gene of *B. subtilis* N3 showed high homology to the amino acid sequence of flagellin protein of *B. subtilis* up to 100%. *In vitro* testing on culture medium revealed that *B. subtilis* N3 was able to inhibit the growth of several phytopathogenic fungi. *In vivo* testing on orchid of the genus *Rhynchosytilis* and *Dendrobium* using the culture filtrate from *B. subtilis* N3 revealed that the culture filtrate from *B. subtilis* N3 was able to prevent and protect both genus of orchids from diseases development caused by *P. palmivora*. Bacteria and/or proteins obtained from this research might appropriate for commercial development for using in sustainable agriculture.

Department: Microbiology

Field of Study: Microbiology

Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆตลอดการทำวิจัย พร้อมทั้งเอาใจใส่ดูแลเป็นที่ปรึกษาในเรื่องต่างๆ ตลอดจนการอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจที่ดียิ่งเสมอมา อีกทั้งยังกรุณาแก้ไขตรวจทานและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช ในฐานะอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดการทำวิจัย ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. ประกิตดี สีนสินนท์, รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน, และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และกรุณาช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณทุนโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดี) ที่ให้การสนับสนุนค่าเล่าเรียน ค่าอุปกรณ์การเรียน และค่าใช้จ่ายต่างๆ, ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่ให้การสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย, และทุนสนับสนุนนิสิตระดับปริญญาเอกและโทไปทำวิจัยในต่างประเทศ จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนค่าเดินทาง ค่าที่พัก และค่าใช้จ่ายต่างๆ ในการไปทำวิจัย ณ ประเทศญี่ปุ่น

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์สำหรับงานวิจัย สอนเทคนิควิธีการใช้เครื่องมือ ตลอดจนกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ การอบรมสั่งสอน ซึ่งมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิจัย และขอขอบคุณนายพี สีนเนืองนอง และนางสาวอัญญาพร-อรรรัตน์ แสงแก้ว ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนช่วยเหลือในเรื่องการทำ SDS-PAGE ทำให้งานวิจัยของผู้วิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณนางสาวสุดารัตน์ นุชวงษ์, นางสาวศศิธร พงษ์สำราญกุล และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในห้องวิจัย 1904/15 ทุกท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจที่ดีตลอดการทำวิจัย และเป็นທີ່ปรึกษาในเรื่องต่างๆ รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ระดับปริญญาเอกและโท ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณยาย คุณน้า คุณป้า และพี่ๆ ที่น่ารัก ที่ให้ความรัก ความห่วงใย คอยเป็นที่ปรึกษาอย่างดี คอยสนับสนุน ช่วยเหลือ เป็นแรงใจ และให้กำลังใจตลอดการศึกษา จนทำให้วิทยานิพนธ์ของผู้วิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพ.....	ณ
บทที่ 1.....	1
บทที่ 2.....	9
2.1 กล้วยไม้	9
2.2 ปัญหาการเกิดโรคในกล้วยไม้.....	10
2.2.1 <i>Curvularia lunata</i>	10
2.2.2 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	12
2.2.3 <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium periferatum</i> , <i>Fusarium solani</i> และ <i>Fusarium moniliforme</i>	13
2.2.4 <i>Rhizoctonia solani</i>	14
2.2.5 <i>Phytophthora palmivora</i>	15
2.2.6 <i>Pythium aphanidermatum</i>	17
2.3 การป้องกันและการกำจัดราที่ก่อโรคในกล้วยไม้.....	18
2.4 การใช้วิธีทางชีวภาพ (biological control)	18
2.5 แบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria)	19
2.6 กลไกการทำงานของแบคทีเรียปฏิปักษ์.....	23
2.7 สารต้านราที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i> และแบคทีเรียสกุล <i>Pseudomonas</i>	26
2.8 การทำบริสุทธิ์โปรตีนและการวิเคราะห์โปรตีนบริสุทธิ์	27

2.8.1 การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation)	27
2.8.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของ ประจุสุทธิของสาร (ion-exchange chromatography).....	30
2.8.3 การตรวจสอบและการวิเคราะห์โปรตีนบริสุทธิ์เบื้องต้น	33
2.9 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน.....	34
บทที่ 3.....	36
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	36
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จรูป	39
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเก็บรักษาจุลินทรีย์	41
3.3.1 แบคทีเรีย	41
3.3.2 ราที่ก่อโรคพืช.....	41
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ	42
3.4.1 สำหรับแบคทีเรีย.....	42
3.4.2 สำหรับรา	42
3.5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด.....	42
3.5.1 การเตรียมเซลล์ของแบคทีเรีย.....	42
3.5.2 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย.....	42
3.5.3 การเตรียมราก่อโรคพืช.....	42
3.5.4 การทดสอบเซลล์แบคทีเรียกับราก่อโรคพืช <i>P. palmivora</i> และ <i>P.</i> <i>aphanidermatum</i> โดยวิธี dual culture (Torres และคณะ, 2017)	43
3.5.5 การทดสอบน้ำเลี้ยงแบคทีเรียกับ <i>P. palmivora</i> และ <i>P. aphanidermatum</i> โดยวิธี poison food technique (Sriwati และคณะ, 2015)	43
3.6 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราน้ำ	44
3.6.1 การแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย.....	44

3.6.2 การแปรผันความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย	44
3.6.3 การแปรผันอุณหภูมิสำหรับการบ่มแบคทีเรีย.....	45
3.6.4 การแปรผันระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรีย.....	45
3.7 การทดสอบความเสถียรของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรีย	45
3.7.1 การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบส	45
3.7.2 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ.....	45
3.8 การทำบริสุทธิ์โปรตีนจากแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา.....	46
3.8.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	46
3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีน	46
3.8.3 การทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีน	47
3.8.4 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของ ประจุสุทธิของสาร.....	47
3.8.5 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นของโปรตีนที่ทำ บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE.....	48
3.9 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา	51
3.10 การศึกษายีนแฟลกเจลลินในแบคทีเรีย	51
3.10.1 การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรีย	51
3.10.2 การเพิ่มจำนวนยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาแลงคาชเชอโรส.....	52
3.10.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาแลงคาชเชอโรสด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	53
3.11 การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการเจริญของเส้นใยของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	53
3.12 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราแบบ <i>in vitro</i> และ <i>in vivo</i>	54
3.12.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งร่าอโรคพิซชนิดต่างๆบนจานเลี้ยงเชื้อ (<i>in vitro</i>).....	54

3.12.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราบนกล้วยไม้ (<i>in vivo</i>).....	54
3.12.2.1 กล้วยไม้.....	54
3.12.2.2 การเตรียมรา	54
3.12.2.3 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย	54
3.12.2.4 การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียในการ ยับยั้งการเกิดโรคบนต้นกล้วยไม้	54
3.12.2.5 การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสและของโปรตีนบริสุทธิ์ จากแบคทีเรียในการยับยั้งการเกิดโรคบนดอกกล้วยไม้.....	55
3.13 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย	56
3.14 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	56
บทที่ 4.....	57
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญของราหน้าโดยใช้เซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อของ แบคทีเรียในการทดสอบ.....	57
4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญ ของ <i>P. palmivora</i>	63
4.2.1 การแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1	63
4.2.2 การแปรผันความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1.....	64
4.2.3 การแปรผันอุณหภูมิสำหรับการบ่มแบคทีเรียไอโซเลต RS1	66
4.2.4 การแปรผันระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1	67
4.3 การทดสอบความเสถียรของสารยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลต RS1	69
4.3.1 การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจาก แบคทีเรียไอโซเลต RS1	69
4.3.2 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจากแบคทีเรียไอโซเลต RS1.....	70

4.4 การทำบริสุทธิ์โปรตีนจาก <i>B. subtilis</i> N3 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ <i>C. lunata</i> และ จากแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ <i>P. palmivora</i>	71
4.4.1 การทำบริสุทธิ์โปรตีนจากแบคทีเรียไอโซเลต RS1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ <i>P. palmivora</i>	71
4.4.1.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....	71
4.4.1.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความ แตกต่างของประจุสุทธิของสาร	73
4.4.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีนจาก <i>B. subtilis</i> N3 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ <i>C. lunata</i>	76
4.4.2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....	76
4.4.2.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความ แตกต่างของประจุสุทธิของสาร	77
4.4.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก <i>B. subtilis</i> N3 และ แบคทีเรียไอโซเลต RS1 ด้วยวิธี SDS-PAGE.....	79
4.4.3.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก <i>B. subtilis</i> N3.....	79
4.4.3.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จากแบคทีเรียไอ โซเลต RS1	80
4.5 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา.....	81
4.6 การศึกษาอินแฟลกเจลลินในแบคทีเรีย.....	84
4.7 การศึกษาผลของโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์ต่อการเจริญของเส้นใยของรา.....	85
4.8 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราชนิดต่างๆโดย <i>B. subtilis</i> N3 แบบ <i>in vitro</i> และ <i>in vivo</i>	86
4.8.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราชนิดต่างๆโดย <i>B. subtilis</i> N3 บนจาน เลี้ยงเชื้อ (<i>in vitro</i>)	87

4.8.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชชนิดต่างๆโดย <i>B. subtilis</i> N3 บนกล้วยไม้ (<i>in vivo</i>)	89
4.8.2.1 การทดสอบความสามารถของ <i>B. subtilis</i> N3 ในการยับยั้งการเจริญของ ราก่อโรคพืชทั้ง 9 ชนิดบนต้นกล้วยไม้	89
4.8.2.1.1 ผลการยับยั้ง <i>C. lunata</i> บนต้นกล้วยไม้	89
4.8.2.1.2 ผลการยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> บนต้นกล้วยไม้.....	90
4.8.2.1.3 ผลการยับยั้ง <i>R. solani</i> บนต้นกล้วยไม้.....	91
4.8.2.1.4 ผลการยับยั้ง <i>F. oxysporum</i> บนต้นกล้วยไม้	93
4.8.2.1.5 ผลการยับยั้ง <i>F. periferatum</i> บนต้นกล้วยไม้	94
4.8.2.1.6 ผลการยับยั้ง <i>F. solani</i> บนต้นกล้วยไม้.....	95
4.8.2.1.7 ผลการยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> บนต้นกล้วยไม้	96
4.8.2.1.8 ผลการยับยั้ง <i>P. aphanidermatum</i> บนต้นกล้วยไม้.....	97
4.8.2.1.9 ผลการยับยั้ง <i>P. palmivora</i> บนต้นกล้วยไม้.....	98
4.8.2.2 การทดสอบความสามารถของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก <i>B. subtilis</i> N3 ในการยับยั้งการเจริญของ <i>C. lunata</i> บนดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์สี ขาว (5N) และพันธุ์สีชมพู (ชมพูซากุระ)	102
4.9 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย	104
บทที่ 5.....	107
รายการอ้างอิง	116
ภาคผนวก ก	139
ภาคผนวก ข	141
ภาคผนวก ค	147
ภาคผนวก ง.....	149
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	159

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 รายชื่อผลิตภัณฑ์ต่างๆของแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i> ที่ใช้ในการควบคุมเชื้อ ก่อโรคพืช.....	20
ตารางที่ 2.2 รายชื่อผลิตภัณฑ์ต่างๆของแบคทีเรียสกุล <i>Pseudomonas</i> ที่ใช้ในการ ควบคุมโรคในพืช.....	23
ตารางที่ 2.3 ชนิดและโครงสร้างของหมูฟังกซ์ชันของตัวแลกเปลี่ยนประจุ.....	32
ตารางที่ 2.4 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความ แตกต่างของประจุลบ.....	32
ตารางที่ 2.5 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความ แตกต่างของประจุบวก.....	33
ตารางที่ 4.1 การยับยั้งการเจริญของ <i>P. aphanidermatum</i> และ <i>P. palmivora</i> ด้วย เซลล์แบคทีเรียโดยวิธี dual culture.....	58
ตารางที่ 4.2 การยับยั้งการเจริญของ <i>P. aphanidermatum</i> และ <i>P. palmivora</i> โดย น้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียในอัตราส่วน 1:1 โดยวิธี poison food technique.....	61
ตารางที่ 4.3 การยับยั้งการเจริญของ <i>P. palmivora</i> โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ แบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ.....	63
ตารางที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของ <i>P. palmivora</i> โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ แบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ความเป็นกรด-เบส ต่างๆ.....	65
ตารางที่ 4.5 การยับยั้งการเจริญของ <i>P. palmivora</i> โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ แบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB pH7 ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	67
ตารางที่ 4.6 ความเสถียรของสารยับยั้งการเจริญของ <i>P. palmivora</i> ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่ค่าความเป็นกรด-เบส ต่างๆ.....	69
ตารางที่ 4.7 ความเสถียรของสารยับยั้งการเจริญของ <i>P. palmivora</i> ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	70

ตารางที่ 4.8 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>P. palmivora</i> ด้วยสารละลาย โปรตีนของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียม ซัลเฟตต่างๆ.....	72
ตารางที่ 4.9 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ <i>P. palmivora</i> ด้วยสารละลาย โปรตีนบริสุทธิ์ของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในช่วงลำดับส่วนที่ 9-10 และ 33-34.....	75
ตารางที่ 4.10 ค่าต่างๆหลังจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการ ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่ สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ <i>P. palmivora</i>	76
ตารางที่ 4.11 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีจากน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ <i>B. subtilis</i> N3	77
ตารางที่ 4.12 ลักษณะสมบัติของแถบโปรตีน #1 – #6 หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE Bio-gel A.....	84
ตารางที่ 4.13 การยับยั้งการเจริญของราชนิดต่างๆโดย <i>B. subtilis</i> N3 บนจานเลี้ยงเชื้อ (in vitro).....	87
ตารางที่ 4.14 ผลการทดสอบการยับยั้ง <i>C. lunata</i> บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและ สกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ <i>B. subtilis</i> N3.....	90
ตารางที่ 4.15 ผลการทดสอบการยับยั้ง <i>C. gloeosporioides</i> บนต้นกล้วยไม้สกุลช้าง กระ และสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ <i>B. subtilis</i> N3.....	91
ตารางที่ 4.16 ผลการทดสอบการยับยั้ง <i>R. solani</i> บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุล หวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ <i>B. subtilis</i> N3.....	92
ตารางที่ 4.17 ผลการทดสอบการยับยั้ง <i>F. oxysporum</i> บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระ และสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ <i>B. subtilis</i> N3.....	93
ตารางที่ 4.18 ผลการทดสอบการยับยั้ง <i>F. periferatum</i> บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระ และสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ <i>B. subtilis</i> N3.....	94
ตารางที่ 4.19 ผลการทดสอบการยับยั้ง <i>F. solani</i> บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุล หวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ <i>B. subtilis</i> N3.....	95

ตารางที่ 4.20 ผลการทดสอบการยับยั้ง <i>F. moniliforme</i> บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระ และสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ <i>B. subtilis</i> N3.....	96
ตารางที่ 4.21 ผลการทดสอบการยับยั้ง <i>P. aphanidermatum</i> บนต้นกล้วยไม้สกุล ช้างกระและสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ <i>B. subtilis</i> N3	98
ตารางที่ 4.22 ผลการทดสอบการยับยั้ง <i>P. palmivora</i> บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและ สกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ <i>B. subtilis</i> N3.....	99
ตารางที่ 4.23 สรุปผลการทดสอบการยับยั้งราทั้ง 9 ชนิดบนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระ และสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ <i>B. subtilis</i> N3.....	101
ตารางที่ 4.24 ผลการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสและโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์ของ <i>B. subtilis</i> N3 กับ <i>C. lunata</i> บนดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์สีขาว (5N)	102
ตารางที่ 4.25 ผลการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสและโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์ของ <i>B. subtilis</i> N3 กับ <i>C. lunata</i> บนดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์สีชมพู (ชมพูซากุระ).....	103
ตารางที่ 4.26 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียโอโซเลต RS1	106

สารบัญภาพ

รูปที่ 2.1 ลักษณะเส้นใย (ซ้าย) และสปอร์ (ขวา) ของ <i>C. lunata</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ แข็ง PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	11
รูปที่ 2.2 โรคดอกสนิมหรือจุดสนิม สาเหตุเกิดจาก <i>C. lunata</i>	11
รูปที่ 2.3 ลักษณะเส้นใยของ <i>C. gloeosporioides</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	12
รูปที่ 2.4 โรคแอนแทรคโนสบนใบกล้วยไม้ที่มีสาเหตุเกิดจาก <i>C. gloeosporioides</i>	13
รูปที่ 2.5 ลักษณะเส้นใยของ <i>F. oxysporum</i> (ซ้าย) และ <i>F. periferatum</i> (ขวา) บน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน.....	14
รูปที่ 2.6 ลักษณะเส้นใยของ <i>F. solani</i> (ซ้าย) และ <i>F. moniliforme</i> (ขวา) บนอาหาร เลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน.....	14
รูปที่ 2.7 ลักษณะเส้นใยของ <i>R. solani</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่ 30 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน.....	15
รูปที่ 2.8 ลักษณะเส้นใยของ <i>P. palmivora</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง V8 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	16
รูปที่ 2.9 โรคเน่าดำหรือโรคเน่าเข้าไส้บนกล้วยไม้ที่มีสาเหตุเกิดจาก <i>P. palmivora</i>	17
รูปที่ 2.10 ลักษณะเส้นใยของ <i>P. aphanidermatum</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่ม ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	17
รูปที่ 2.11 ปริมาณกรัมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต่อสารละลายโปรตีน 1 ลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นอิมตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นช่วงต่างๆ ซึ่ง เริ่มต้นที่ 0% ของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จนถึง 100% ของเกลือ แอมโมเนียมซัลเฟต (Spadaro และคณะ, 2003).....	29
รูปที่ 2.12 ลักษณะของตัวแลกเปลี่ยนประจุที่มีประจุลบและประจุล้อมรอบบริเวณตัว แลกเปลี่ยนประจุเป็นประจุบวก เรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (ซ้าย) และ ลักษณะของตัวแลกเปลี่ยนประจุที่มีประจุบวกและประจุล้อมรอบบริเวณตัว	

แลกเปลี่ยนประจุเป็นประจุลบ เรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (Domenech และคณะ, 2012)	31
รูปที่ 3.1 รูปแบบการลงเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรควิธี dual culture.....	43
รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>P. palmivora</i> และการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	68
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ในแต่ละลำดับส่วนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ของแบคทีเรียไอโซเลต RS1	74
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ในแต่ละลำดับส่วนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ของเชื้อ <i>B. subtilis</i> N3.....	78
รูปที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของ <i>C. lunata</i> โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 41-50 (A), 21-30 (B) และ 51-60 (C) ชุดควบคุมคือ นิสทาทีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (D)	78
รูปที่ 4.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนจาก <i>B. subtilis</i> N3 โดยวิธี SDS-PAGE;	79
รูปที่ 4.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนจากแบคทีเรียไอโซเลต RS1 โดยวิธี SDS-PAGE;.....	81
รูปที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์โปรตีนที่ได้จากแถบโปรตีนขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 39.88 kDa ของ <i>B. subtilis</i> N3 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Mascot โดยลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกับโปรตีนคล้ายแฟลกเจลลินแสดงด้วยลำดับกรดอะมิโนที่มีตัวหนาสีแดง	82

รูปที่ 4.8 ผลิตภัณฑ์ขึ้นดีเอ็นเอของ <i>B. subtilis</i> N3 จากการทำปฏิกิริยาลูโกโซพอลิเมอ เรส	85
รูปที่ 4.9 ลักษณะการเจริญของ <i>P. palmivora</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องกราด (SEM) เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์ลำดับส่วนที่ 9-10 (B) และ 33-34 (C) ของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 หลังจากบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีโปรตีน (A)	86
รูปที่ 4.10 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 บนอาหารแข็ง NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (A), ผลการย้อมสีแกรมของแบคทีเรียไอ โซเลต RS1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (1,000x) (B)	105



บทที่ 1

บทนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีความสวยงาม ดังนั้นอุตสาหกรรมการส่งออกกล้วยไม้ของประเทศไทยจึงสามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นจำนวนมาก กล้วยไม้ไทยเป็นสินค้าที่ได้รับความนิยมทั้งในประเทศและต่างประเทศ โดยประเทศไทยครองอันดับการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกเมืองร้อนเป็นอันดับสองรองจากประเทศเนเธอร์แลนด์ และส่งออกต้นกล้วยไม้มากเป็นอันดับสองรองจากไต้หวัน โดยมีปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี (Pornpienpakdee และคณะ, 2010) โดยมีความเป็นไปได้สูงที่กล้วยไม้ไทยจะมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอีก 10-12% ในอนาคตอันใกล้ โดยเน้นที่คุณภาพและการสร้างมูลค่าเพิ่ม (ธานี กุลแพทย์, 2556) กล้วยไม้จัดเป็นพืชที่ดูแลรักษาค่อนข้างยากเพราะบอบบาง อ่อนแอ ไม่ทนทานต่อแมลง แบคทีเรีย ไวรัส และรา ปัญหาที่นักเพาะกล้วยไม้พบเป็นส่วนใหญ่ คือโรคที่เกิดจากเชื้อราและสิ่งมีชีวิตที่คล้ายรา (fungal-like microorganism) การที่กล้วยไม้ถูกทำลายด้วยเชื้อก่อโรสดังกล่าว จะส่งผลทำให้ราคาของกล้วยไม้ตกต่ำลงและไม่สามารถส่งออกจำหน่ายได้

ราและสิ่งมีชีวิตที่คล้ายราที่ก่อโรคในกล้วยไม้มีหลากหลายชนิด ในงานวิจัยนี้สนใจสองชนิดคือ *Curvularia lunata* และ *Phytophthora palmivora* ซึ่งยังสามารถก่อให้เกิดโรคในพืชอื่น ๆ ได้หลายชนิดอีกด้วย อาทิเช่น มะเขือเทศ ทุบทิ้ม มะละกอ และข้าวโพด เป็นต้น (Zhu และคณะ, 2004, Iftikhar และคณะ, 2016, Gao และคณะ, 2017b, Markakis และคณะ, 2017) เมื่อพืชที่ปลูกมีการติดเชื้อมากกว่าจะส่งผลเสียให้แก่เกษตรกร ทั้งสูญเสียผลผลิตและส่งผลไปถึงสูญเสียรายได้ เกษตรกรจึงกำจัดเชื้อเหล่านี้โดยใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อดังกล่าว แต่การใช้สารเคมีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคนั้น ทำให้เกิดสารตกค้างในธรรมชาติ รวมถึงทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และหากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เชื้อดื้อยา และที่ร้ายแรงที่สุดคือ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรเองด้วย (Singh และคณะ, 2011)

โรคดอกสนิมหรือจุดสนิม (flower rusty spot) มีสาเหตุเบื้องต้นจากสภาพพื้นที่ที่อับชื้น ทำให้ *Curvularia* spp. เข้าทำลายได้ง่าย โดยเฉพาะช่วงที่มีฝนตกชุกหลายวัน หรือมีน้ำค้างลงจัด และมักเกิดกับต้นที่ปลูกด้วยกาบมะพร้าว (อุไร จิรมงคลการ, 2548) อาการของโรคจะปรากฏบนกลีบดอก โดยเริ่มแรกจะเป็นจุดสีน้ำตาลอมเหลือง เมื่อจุดขยายใหญ่ขึ้นจะมีสีเข้มคล้ายสีสนิม ลักษณะแผลค่อนข้างกลมมีขนาดตั้งแต่ 0.1-0.3 มิลลิเมตร (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547) อาการบนใบพบน้อยและไม่รุนแรงในระดับที่ก่อให้เกิดความเสียหาย (สมบัติ รักไพบุลย์สมบัติ, 2540) ลักษณะของราจะสร้างเส้นใยสีดำ *Curvularia* spp. มีแหล่งอาศัยทั่วไปในดิน (Brunskole และคณะ, 2009) รา

ชนิดนี้จัดอยู่ในโดเมน Eukaryota อาณาจักร Fungi ซึ่งแต่เดิมจัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycetes หรือ mitosporic fungi ซึ่งเป็นราที่ยังไม่พบการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ แต่ในปัจจุบันจัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ลักษณะของสปอร์มีสีน้ำตาลอ่อน รูปร่างตรงหรือโค้ง ปลายเรียว มีซีเซลล์ โดยเซลล์ตรงกลางมีขนาดใหญ่สุด มีสีเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย (Jing และคณะ, 2013)

โรคเน่าดำหรือโรคเน่าเข้าไส้ (black rot) มีสาเหตุจาก *P. palmivora* ที่สามารถเกิดโรคได้กับกล้วยไม้ทุกสายพันธุ์ โดยเฉพาะพันธุ์แวนด้า (Tsai และคณะ, 2006) โดยมักพบการแพร่ระบาดมากในช่วงฤดูฝน เนื่องจากมีสภาพอากาศที่มีความชื้นสูง และสามารถแพร่กระจายไปกับน้ำที่ใช้รดต้นไม้ อาการของโรคนี้สามารถเกิดได้ทุกส่วนบนกล้วยไม้ โดยเฉพาะหน่อ ยอดอ่อน หรือราก (Orlikowski และ Szkuta, 2006) ถ้ายอดถูกทำลายจะทำให้ยอดเน่าเป็นสีน้ำตาล เมื่อจับจะหลุดติดมือได้ง่าย และถ้าเมื่ออาการรุนแรง มักพบการลุกลามของเชื้อเข้าไปในลำต้น และหากเชื้อเข้าทำลายที่ราก รากจะเน่าแห้ง ซึ่งมีผลทำให้ใบเหลือง ร่วง และตายในที่สุด (Cating และคณะ, 2010, Sakdapetsiri และคณะ, 2016) *Phytophthora* จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่คล้ายรา ที่จัดอยู่ในโดเมน Eukaryota อาณาจักร Stramenopiles ไฟลัม Heterokontophyta คลาส oomycetes เรียกทั่วไปว่า ราน้ำ (water mold) ที่พบได้ทั่วไปทั้งในน้ำและดินที่ชื้น ลักษณะของเส้นใยจะใส ไม่มีสี และแตกกิ่งก้านได้มากมาย และสามารถสร้างสปอร์แรงเจียมได้ (Subhani, 2016)

โรคราในกล้วยไม้เป็นสาเหตุที่สำคัญซึ่งทำให้เกิดความเสียหายกับกล้วยไม้ในประเทศแถบร้อนชื้น ดังนั้นจึงมีการค้นหาวิธีการต่างๆ เพื่อเป็นการป้องกันการก่อโรคในกล้วยไม้ เช่น ปรับสภาพพื้นที่ปลูกให้โปร่งโล่ง ไม่ให้อับชื้น มีอากาศถ่ายเทสะดวก ไม่ปลูกกล้วยไม้แน่นเกินไป ถ้าพบต้นที่แสดงอาการควรทำลายทิ้งด้วยการเผาทำลาย แล้วฉีดพ่นด้วยสารป้องกันกำจัดรา (อุไร จิรมงคลการ, 2548) ผู้ปลูกกล้วยไม้ส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมี เพราะมีความสามารถในการยับยั้งราได้อย่างมีประสิทธิภาพและให้ผลที่รวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีหากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน นอกจากจะทำให้เชื้อดื้อต่อยาแล้ว ยังทำให้เกิดสารตกค้างในธรรมชาติและในผลิตภัณฑ์ และก่อให้เกิดผลเสียกับพืชที่ปลูกและเกิดผลเสียต่อสุขภาพของเกษตรกรอีกด้วย (Singh และคณะ, 2011) นอกจากนี้การตกค้างของสารเคมีในผลิตภัณฑ์ยังส่งผลทำให้เกิดการปฏิเสธผลิตภัณฑ์จากประเทศคู่ค้าได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาหาวิธีทางชีวภาพมาใช้ในการยับยั้งรา เพื่อไม่ให้เกิดสารเคมีตกค้างในธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ รวมทั้งไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพด้วย

วิธีทางชีวภาพที่นิยมใช้กันส่วนมากคือ ใช้จุลินทรีย์ที่สามารถต้านการเจริญของราก่อโรคได้แบบที่เรียกซึ่งจัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งนั้น มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ โดยพบว่าสารที่ผลิตออกมาบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของราได้หลายสายพันธุ์ เช่น *Bacillus vallismortis*

ZZ185 สร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราได้หลายชนิด ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Cryphonectria parasitica* และ *Phytophthora capsici* เป็นต้น (Zhao และคณะ, 2010) หรือ *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus carbonarius* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในองุ่นและสร้างสารพิษ ochratoxin A ที่มีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็ง (Jiang และคณะ, 2014) และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ B068150 ซึ่งคัดแยกได้จากรากต้นแตงกวา สามารถควบคุมการเจริญของ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ซึ่งเป็นราที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในแตงกวาได้ (Li และคณะ, 2012) หรืออีกตัวอย่างหนึ่งพบว่า *Bacillus pumilus* SQR-N43 สามารถยับยั้งการเจริญของ *R. solani* ที่เป็นราที่ก่อโรคเน่าคอดินในต้นแตงกวาได้ ซึ่ง *B. pumilus* SQR-N43 จะรวมตัวเกาะอยู่รอบรากของแตงกวาในลักษณะของไบโอฟิล์ม ทำให้ *R. solani* เข้าก่อโรคได้น้อยลง ส่งผลในการลดการเกิดโรคเน่าคอดินในแตงกวาได้ (Huang และคณะ, 2012) ตัวอย่างเหล่านี้แสดงว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ มีส่วนช่วยในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้เป็นอย่างดี

สารที่สร้างโดยแบคทีเรียอาจมีหลายประเภท ซึ่งมีทั้งประเภทที่เป็นสารระเหย ไลโปโพรตีน โพรตีน หรือเพปไทด์ ซึ่งแต่ละประเภทต่างมีผลในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้ แต่อาจมีกลไกในการยับยั้งการเจริญของราเหมือนหรือต่างกันไป ซึ่งกลไกดังกล่าวอาจขึ้นกับชนิดของสารที่แบคทีเรียผลิตได้ หรือชนิดและโครงสร้างของราที่ก่อโรค ตัวอย่างเช่น กลุ่มของแบคทีเรียซึ่งประกอบไปด้วย *Bacillus* spp. 4 สายพันธุ์ และ *Paenibacillus* spp. ที่แยกได้จากบริเวณดินที่ปลูกแตงกวา สามารถสร้างสารระเหยออกมายับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคได้ โดยทำให้ลักษณะรูปร่างของเส้นใยราผิดปกติ, ลดการสร้างสเคลอโรเทียม (sclerotium) ของ *Sclerotinia sclerotiorum* ในเพลตที่ปิดสนิท และต้านการสร้างเม็ดสีที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของราหลายชนิด ได้แก่ *Ascochyta citrullina*, *Alternaria solani*, และ *Alternaria brassicae* (Wei และคณะ, 2008) หรือ *B. subtilis* สายพันธุ์ 155 สามารถสร้างสารระเหยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Penicillium digitatum* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคผลเน่าของส้ม รวมทั้งยังสามารถชะลอการเกิดโรคในส้มภายหลังการเก็บเกี่ยวได้อีกด้วย (Leelasuphakul และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างของสารออกฤทธิ์ประเภทโพรตีนหรือเพปไทด์ เช่น bacisubin ซึ่งเป็นโพรตีนที่แยกได้จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-916 โดยโพรตีนที่บริสุทธิ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้หลายชนิด ได้แก่ *Magnaporthe grisea*, *S. sclerotiorum*, *R. solani*, *Alternaria oleracea*, *A. brassicae* และ *Botrytis cinerea* (Liu และคณะ, 2007)

การสกัดสารระเหยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชจำเป็นต้องใช้สารเคมีเป็นตัวทำลายเพื่อแยกสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา ซึ่งของเสียที่ได้หลังจากการสกัดสารออกฤทธิ์นั้นยากแก่การกำจัดหรือจำเป็นต้องผ่านกระบวนการกำจัดที่ถูกต้องจึงจะไม่ก่อให้เกิดอันตราย และนอกจากนี้สารเคมีบางชนิดยังจัดอยู่ในประเภทของสารก่อมะเร็งซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค อีกทั้งยังอาจทำให้มีสารตกค้างเกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อมและผลิตภัณฑ์ได้ (Dursun และ Sengul, 2006) ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคประเภทโปรตีนหรือเปปไทด์ เนื่องจากในขั้นตอนการแยกหรือทำบริสุทธิ์ไม่มีการใช้สารใดที่เป็นพิษ และการกำจัดของเสียที่เกิดจากขั้นตอนการแยกสามารถกำจัดได้ง่าย นอกจากนี้โปรตีนหรือเปปไทด์ที่ได้ก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราเช่นเดียวกัน รวมถึงยังไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมและผลิตภัณฑ์เป็นเวลานานอีกด้วย อย่างไรก็ตาม ในการประยุกต์ใช้ในบางกรณีก็จำเป็นต้องมีการค้นหาโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคและยังสามารถทนความร้อนได้ด้วย ตัวอย่างเช่น *Bacillus polymyxa* VLB16 สามารถสร้างโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Pyricularia grisea* และ *R. solani* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคไหม้และโรคกาบใบแห้งในข้าว โดยโปรตีนชนิดนี้สามารถทนความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Kavitha และคณะ, 2005) เป็นต้น

แบคทีเรียชนิดหนึ่งสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้หลายชนิด ซึ่งการสร้างสารชนิดใดมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย ปัจจัยดังกล่าวมีมากมาย เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ, การให้อากาศ, และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (Moita และคณะ, 2005) ทั้งนี้เพื่อให้แบคทีเรียสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคได้มากที่สุด จึงจำเป็นต้องมีการแปรผันปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ ตัวอย่างเช่น *B. subtilis* RB14 สามารถผลิตสาร iturin A ได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดย iturin A เป็นสารไลโปเปปไทด์ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืช เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น เช่น 30, 37, 42 และ 48 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณของ iturin A ลดน้อยลง ขณะที่เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าสามารถผลิตสาร surfactin ได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 37, 42, 30 และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส แบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถผลิตได้ทั้ง iturin A และ surfactin ซึ่งหน้าที่ของ surfactin จะทำให้เซลล์เมมเบรนของราอ่อนแอ ส่งผลให้ iturin A เข้าเกาะได้ง่ายขึ้น ทำให้ไปส่งเสริมการทำงานของ iturin A ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น (Ohno และคณะ, 1995) อีกตัวอย่างหนึ่งของ Moita และคณะ (2005) ได้ศึกษาการแปรผันความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิในการบ่ม และการให้อากาศ ที่มีต่อการเจริญ, การสร้างสปอร์ และการสร้างสารเมแทบอลิต์ ของ *B. subtilis*

355 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราหลายชนิดที่ก่อโรคในพืช เช่น *B. cinerea*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma* sp, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii* และ *Trichoderma virgatum* โดยเลี้ยง *B. subtilis* 355 ในอาหารเหลว Yeast Extract Glucose ในภาวะความเป็นกรด-เบสที่ 6, 7 และ 8, อุณหภูมิในการบ่มที่ 23, 30 และ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบการกวนให้อากาศที่ 0, 60 และ 120 รอบต่อนาที ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของ *B. subtilis* 355 คือที่ความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6, อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส, และความเร็วรอบการกวนให้อากาศที่ 60 รอบต่อนาที ส่วนภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้างสปอร์ของ *B. subtilis* 355 คือ ความเป็นกรด-เบสที่ 8, อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส, และความเร็วรอบการกวนให้อากาศที่ 60 รอบต่อนาที ขณะที่ภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้างเมแทบอลิต์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งการเจริญของรา คือ ความเป็นกรด-เบสที่ 8, อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส, และความเร็วรอบการกวนให้อากาศที่ 0 รอบต่อนาที ซึ่งในภาวะอื่นๆ แบคทีเรียยังสามารถเจริญ, สร้างสปอร์ และสร้างเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราได้ แต่มีประสิทธิภาพไม่ดี ซึ่งจะเห็นได้ว่าภาวะของการเจริญของแบคทีเรีย การสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย และการสร้างสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรียนั้นไม่มีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งสำหรับการผลิตสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในปริมาณมากที่สุด

การทำสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรียให้บริสุทธิ์นั้นมีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีที่เลือกใช้จะขึ้นอยู่กับประเภทของสารออกฤทธิ์นั้นๆ ตัวอย่างเช่น ถ้าสารที่ออกฤทธิ์เป็นสารจำพวกมิซัว ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์จะใช้ตัวทำละลายในการสกัดสาร โดยสารที่นิยมใช้ในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืช คือ เมทานอล, คลอโรฟอร์ม, เฮกเซน, เอทานอล, และบิวทานอล เป็นต้น (Schmourlo และคณะ, 2005, Zhao และคณะ, 2010, Caldeira และคณะ, 2011, Ye และคณะ, 2012) ถ้าสารที่ออกฤทธิ์เป็นสารจำพวกโปรตีน ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์จะใช้วิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเกลือของแอมโมเนียมซัลเฟตจะไปจับกับน้ำที่อยู่บริเวณรอบๆ โปรตีน ทำให้โปรตีนรวมกลุ่มกันเป็นก้อนและตกตะกอนลงมา จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยใช้วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร (ion exchange chromatography) โดยจะใช้หลักการของการคัดแยกสารตามความแรงของประจุบนโปรตีนนั้นๆ ถ้าโปรตีนใดมีความแรงของประจุน้อยจะเคลื่อนที่ออกมาก่อน และโปรตีนที่มีความแรงของประจุมากกว่าจะค่อยๆ เคลื่อนที่ออกมาตามลำดับ จากนั้นจะทำให้โปรตีนนั้นมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของขนาดมวลและรูปร่างของโปรตีน (gel filtration chromatography) โดย

อาศัยหลักการของการคัดแยกตามขนาดของโปรตีน โดยโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าจะเคลื่อนที่ออกมา ก่อน ส่วนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะค่อยๆเคลื่อนที่ออกมาตามลำดับ

ในงานวิจัยนี้สนใจการแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชซึ่งเป็นสารประเภทโปรตีนด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งยังคงนิยมใช้กันมากในงานวิจัย ตัวอย่างเช่น *B. vallismortis* BH072 สามารถผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชหลายชนิด เช่น *Aspergillus niger*, *Pythium* sp., และ *B. cinerea* ได้ โดยการตกตะกอนที่ความเข้มข้น 30–40% ของแอมโมเนียมซัลเฟต และทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธี gel filtration และ ion exchange chromatography แล้ว พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เพปไทด์ที่มีขนาดประมาณ 36 kDa (Zhao และคณะ, 2013b) อีกตัวอย่างหนึ่งของสารประเภทโปรตีนจากแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืช คือ เอนไซม์ไคตินเนส ซึ่งจากการทดลองของ Liu และคณะ (2011) พบว่า *B. subtilis* SL-13 สามารถผลิตไคตินเนสเพื่อยับยั้งการเจริญของ *R. solani* ซึ่งก่อให้เกิดโรคผลเน่าในมะเขือเทศ โดยโปรตีนนี้สามารถตกตะกอนได้ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และทำให้บริสุทธิ์ด้วย ion exchange chromatography (DEAE-Sepharose) และ gel filtration chromatography (Sephadex G-75) โดยไคตินเนสที่ได้จากการผลิตของ *B. subtilis* SL-13 สามารถทนความเป็นกรด-เบสได้ตั้งแต่ 5-9 และทนอุณหภูมิได้ตั้งแต่ 40-60 องศาเซลเซียส และเมื่อบ่มเอนไซม์นี้ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่าเอนไซม์นี้ยังคงมีแอกทิวิตีเหลือ 70% จากแอกทิวิตีเริ่มต้น (Liu และคณะ, 2011) อีกตัวอย่างหนึ่งพบว่า *Bacillus cereus* QQ308 สามารถสร้างกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic enzymes) ซึ่งประกอบไปด้วยไคตินเนส, ไคโตแซเนส และโปรตีเอส โดยเอนไซม์เหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้ เช่น *F. oxysporum*, *Fusarium solani*, และ *Pythium ultimum* โดยไปยับยั้งการงอกของสปอร์และการงอกของเส้นใยของราได้ นอกจากนี้ยังพบว่า *B. cereus* QQ308 ยังช่วยส่งเสริมทำให้ต้นผักกาดขาวเจริญได้ดีขึ้นอีกด้วย (Chang และคณะ, 2007) จากตัวอย่างข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารที่ผลิตได้จากแบคทีเรียมีหลากหลายชนิด และจำเป็นต้องเลือกวิธีทำให้บริสุทธิ์ตามความเหมาะสมเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ที่สามารถนำไปศึกษาต่อว่าเป็นสารชนิดใด

การจัดจำแนกชนิดของโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่น เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี (mass spectrometry, MS) และการหาลำดับ N-terminal ของโปรตีน (N-terminal sequencing) เป็นต้น (Chang และคณะ, 2016, Gibb และ Strimmer, 2017) วิธีที่นิยม คือ การใช้เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ส่วนประกอบของธาตุในสารประกอบตัวอย่าง เพื่อแสดงให้เห็นโครงสร้างการเรียงตัวของโมเลกุลนั้นๆ โดยเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพสูงทำให้สามารถวิเคราะห์สาร

ตัวอย่างในปริมาณเพียงเล็กน้อยได้ และยังสามารถวิเคราะห์โปรตีนได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน เมื่อวิเคราะห์แล้วจะนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (database) ต่างๆต่อไป (McLafferty, 1981) โปรแกรมที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลของโปรตีนมีอยู่หลากหลาย เช่น โปรแกรม XI TANDEM Spectrum Modeler (<http://www.thegpm.org>) ซึ่งเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐานของ GPMDB (Global Proteome Machine database) หรือโปรแกรมวิเคราะห์โปรตีน Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) ซึ่งเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐานของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) หรือโปรแกรม BioJava-ModFinder ซึ่งเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐานของ Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) หรือโปรแกรม ExPASy Server ซึ่งเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐานของ Swiss-Prot database เป็นต้น โดยการใช้โปรแกรมในการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนจะมีการกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนที่ศึกษา (Cottrell และ London, 1999, Gasteiger และคณะ, 2005, Gao และคณะ, 2017a)

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แยกแบคทีเรียจากดินที่อุดมสมบูรณ์ในจังหวัดกาญจนบุรี และพบว่าแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ได้แก่ M10, M15, M22, M23, M25, M26, M27, N1, N3, N9 และ RS1 สามารถยับยั้งราหลายชนิดที่เป็นราซึ่งก่อโรคในพืชได้ (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) ซึ่งต่อมาได้มีการนำราเหล่านี้ไปศึกษาเพิ่มเติมในด้านการควบคุมทางชีวภาพเพื่อควบคุมราที่ก่อโรคในพืชเศรษฐกิจมากมาย (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549, ประภาศรี ศรีคง, 2552, กนิษฐกา แคนราช, 2553, ทิพย์ศิรา ทองพิลา, 2553, พรทิพา ทัพไทย, 2553, รพีวรรณ โสวรรณปรีชา, 2553, ธนพัฒน์ อธิกิจ, 2556, สุदारัตน์ นุชวงษ์, 2556, ฌัตตญา คุณชัยประเสริฐ, 2557) รพีวรรณ โสวรรณปรีชา (2553) ได้ศึกษาและพบว่า *B. subtilis* N3 สามารถยับยั้ง *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. lunata* ที่ก่อโรคในกล้วยไม้ได้ดี จึงได้หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งรา รวมทั้งลักษณะสมบัติของสารออกฤทธิ์ดังกล่าว ในงานวิจัยนี้ส่วนแรกจึงจะทำบริสุทธิ์โปรตีนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งราจาก *B. subtilis* N3 แล้วนำมาวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนที่ได้ งานวิจัยอีกส่วนหนึ่งสนใจหาแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของพวงรำน้ำที่ก่อโรคในกล้วยไม้ ซึ่งได้แก่ *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora* จึงนำแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นและแบคทีเรียไอโซเลตใหม่เพิ่มเติมมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา และเมื่อได้แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดแล้ว จึงได้นำมาแปรผันปัจจัยต่างๆสำหรับการเจริญและการผลิตสาร ซึ่งได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญของเชื้อ, และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งทดสอบความเสถียรของสารออกฤทธิ์ในภาวะต่างๆ จากนั้นเลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ผลิตสารออกฤทธิ์ในปริมาณมาก แล้ว

ตกตะกอนสารออกฤทธิ์ประเภทโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี ion exchange chromatography และนำไปวิเคราะห์ชนิดของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *P. aphanidermatum* หรือ *P. palmivora*
2. หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียที่คัดเลือกในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราน้ำ
3. แยกและทำบริสุทธิ์โปรตีนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา และจำแนกสารออกฤทธิ์ที่ได้



บทที่ 2

ปรีทรรศน์วรรณกรรม

2.1 กล้วยไม้

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกกล้วยไม้เขตเมืองร้อนเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก ซึ่งสามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นจำนวนมาก โดยกล้วยไม้สามารถส่งขายได้ทุกส่วน ไม่ว่าจะเป็นการตัดดอกหรือการส่งออกต้น ซึ่งตลาดที่รับซื้อมีหลายประเทศ อาทิเช่น สหภาพยุโรป อเมริกา ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ เยอรมัน และจีน เป็นต้น (Chia และคณะ, 2001, Xia และคณะ, 2006, Maketon และคณะ, 2015) กล้วยไม้เขตเมืองร้อน โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุลหวาย สามารถเพาะปลูกได้ดีที่ อุณหภูมิ 25-33 องศาเซลเซียส ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 75-80% และต้องการแสงแดดที่พอเหมาะ (Riva และคณะ, 2017) ซึ่งจังหวัดที่มีการเพาะปลูกกล้วยไม้ที่สำคัญของประเทศไทย คือ กรุงเทพมหานคร นนทบุรี นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี พระนครศรีอยุธยา และปทุมธานี เป็นต้น และพันธุ์กล้วยไม้ที่นิยมปลูกมากคือ สกุลหวาย อะแรนด้า มือคคาร่า ออนซีเดียม และแวนด้า (Seidenfaden และ Smitinand, 1959, Chia และคณะ, 2001, Thammasiri, 2007, Pedersen และ Ormerod, 2009)

กล้วยไม้ (Orchid) เป็นพืชวงศ์ใหญ่ที่มีดอกสวยงาม มีความหลากหลายทั้งสี สันลวดลาย ขนาด รูปทรง และกลิ่น กล้วยไม้จัดว่าเป็นกลุ่มพืชที่มีวิวัฒนาการมาก และเป็นไม้ตัดดอกที่มีปริมาณมากที่สุดในบรรดาพืชดอกทั้งหมด รวมทั้งมีความหลากหลายเป็นอย่างมาก เนื่องจากกล้วยไม้ประกอบไปด้วยสายพันธุ์มากมายถึง 30,000-35,000 สายพันธุ์ และมีถึง 600-800 สกุล (Aktar และคณะ, 2007) กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) จัดเป็นกล้วยไม้สกุลที่ใหญ่ที่สุด เมื่อเทียบกับวงศ์กล้วยไม้ทั้งหมด (Da Silva และคณะ, 2014) ซึ่งกล้วยไม้สกุลหวายประกอบไปด้วยสกุลทั้งหมดมากกว่า 1,200 สกุล และสามารถนำไปประดับตกแต่ง อีกทั้งยังใช้เป็นสมุนไพรได้ด้วย (Yu และ Goh, 2001)

กล้วยไม้ทำรายได้ให้กับประเทศไทยได้เป็นจำนวนมาก เนื่องจากกล้วยไม้จัดเป็นไม้ดอกเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยประเทศไทยมีการปลูกกล้วยไม้เพื่อการส่งออกมาเป็นเวลานานตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และประเทศไทยก็เป็นประเทศหลักอันดับต้นๆที่มีการส่งออกกล้วยไม้ไปยังตลาดทั่วโลก (Hughes, 1995, Runkle และคณะ, 2005) กล้วยไม้สายพันธุ์หวายเป็นสายพันธุ์ที่ประเทศไทยมีการปลูกเพื่อการส่งออกมากที่สุด โดยประเทศไทยได้ปลูกกล้วยไม้สายพันธุ์นี้ เพื่อการส่งออก

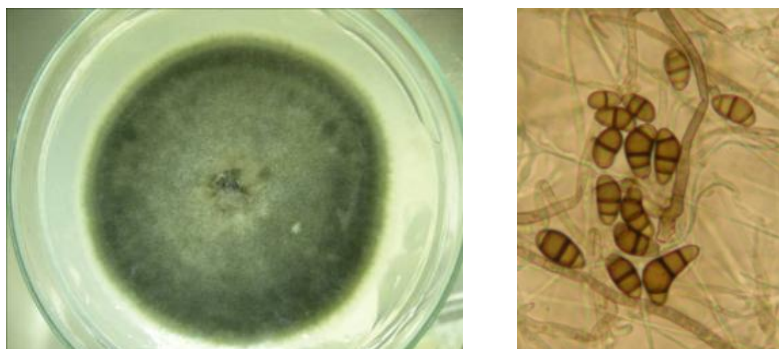
มากกว่า 80% ของตลาดกล้วยไม้โลก (Chia และคณะ, 2001) ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกมากกว่า 100 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Hew, 1994)

2.2 ปัญหาการเกิดโรคในกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นดอกไม้ประดับที่มีความสวยงามและกล้วยไม้ไทยเป็นสินค้าที่ได้รับความนิยมทั้งในประเทศและต่างประเทศ เนื่องจากกล้วยไม้จัดเป็นพืชที่ดูแลค่อนข้างยากเพราะบอบบาง อ่อนแอ ไม่ทนทานต่อแมลง แบคทีเรีย ไวรัส และรา นักเพาะกล้วยไม้ส่วนใหญ่จึงมักพบปัญหาการเกิดโรคกับกล้วยไม้ โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากราและสิ่งมีชีวิตที่คล้ายรา ซึ่งในที่นี่จะเรียกโดยรวมว่า “รา” การที่กล้วยไม้ถูกทำลายด้วยรา ทำให้ดอกกล้วยไม้หรือต้นกล้วยไม้เกิดความเสียหายไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ผลผลิตด้อยคุณภาพ ไม่สามารถส่งออกไปจำหน่ายได้ และสร้างปัญหาแก่เกษตรกรผู้ผลิตกล้วยไม้ตัดดอกส่งออกเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีผลกระทบต่อราคาของกล้วยไม้ ทำให้ราคากกล้วยไม้ตกต่ำลง ซึ่งราที่ก่อให้เกิดโรคในกล้วยไม้มีด้วยกันหลายชนิด เช่น *Curvularia lunata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium periferatum*, *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*, *Pythium aphanidermatum* และ *Phytophthora palmivora* ซึ่งราทั้งหมดเหล่านี้ยังเป็นราที่ก่อโรคในพืชได้หลายชนิดอีกด้วย

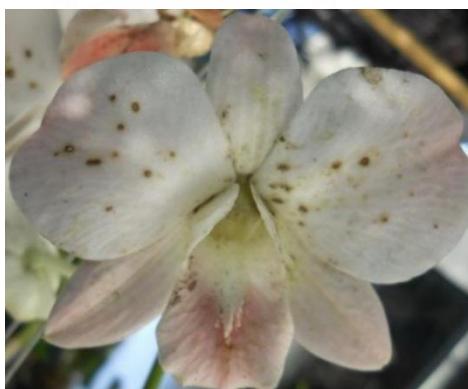
2.2.1 *Curvularia lunata*

C. lunata เป็นราดำ (dark mold หรือ dematiaceous mold) ซึ่งลักษณะของราจะมีเส้นใยและสปอร์สีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ แหล่งอาศัยทั่วไปมักพบในดินบริเวณแถบร้อนชื้น (Brunskole และคณะ, 2009, Ram และคณะ, 2017) ราชนิดนี้จัดอยู่ในโดเมน Eukaryota อาณาจักร Fungi ซึ่งแต่เดิมจัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycetes หรือ mitosporic fungi ซึ่งเป็นกลุ่มราที่ยังไม่พบการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ แต่ในปัจจุบันจัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota, คลาส Euascomycetes, อันดับ Pleosporales, แฟมิลี Pleosporaceae ลักษณะของราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง potato dextrose agar (PDA) จะมีเส้นใยสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ (รูปที่ 2.1 (ซ้าย)) ลักษณะของโคนิเดีย (conidia) หรือสปอร์มีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีดำ รูปร่างตรงหรือโค้ง ปลายเรียว มีเซลล์ตั้งแต่ 2-4 เซลล์ โดยเซลล์ตรงกลางมีขนาดใหญ่ที่สุดและมีสีเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย (Jing และคณะ, 2013) (รูปที่ 2.1 (ขวา)) ราชนิดนี้สามารถก่อโรคในพืชหลายชนิดได้โดยการแพร่กระจายไปในดินและอากาศ (Ram และคณะ, 2017) เช่น โรคใบจุดในใบข้าว (Tann และ Soyong, 2017), โรคใบจุดในข้าวฟ่าง (Akram และคณะ, 2016), โรคใบจุดในดอกบัว (Cui และ Sun, 2016), โรคเน่าในมะเขือเทศ (Iftikhar และคณะ, 2016) และโรคใบจุดในหญ้าปศุนาม (Zhang และคณะ, 2017b) เป็นต้น



รูปที่ 2.1 ลักษณะเส้นใย (ซ้าย) และสปอร์ (ขวา) ของ *C. lunata* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ป่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

Curvularia spp. ก่อให้เกิดโรคดอกสนิมหรือจุดสนิม (flower rusty spot) ในกล้วยไม้สกุลหวาย ซึ่งอาการเริ่มต้นของโรคจะมีจุดสีส้มอมเหลืองอ่อนที่บริเวณกลีบดอก จากนั้นเมื่อผ่านไปประมาณ 2-3 วัน จุดจะขยายใหญ่ขึ้นและมีสีเข้มขึ้นเป็นสีน้ำตาลคล้ายสีสนิม ลักษณะของโรคจะเห็นเป็นแผลขนาดประมาณ 0.1-0.3 มิลลิเมตร ตรงกลางจะมีสีน้ำตาลแดง (Streda และคณะ, 2013) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 การแพร่ระบาดของโรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมโดยราชนิดนี้ มักเกิดในบริเวณที่มีสภาพแวดล้อมที่ร้อน อับชื้น (Shrivastava และคณะ, 2017) ทำให้ราเข้าทำลายกล้วยไม้ได้ง่าย โดยเฉพาะช่วงที่มีฝนตกชุกติดต่อกันเป็นเวลานาน หรือมีน้ำค้างลงจัด โรคนี้มักเกิดกับกล้วยไม้ที่ใช้กาบมะพร้าวปลูก ส่งผลให้การแพร่ระบาดของโรคเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วทั่วทั้งสวนกล้วยไม้และบริเวณใกล้เคียง (อุไร จิรมงคลการ, 2548)



รูปที่ 2.2 โรคดอกสนิมหรือจุดสนิม สาเหตุเกิดจาก *C. lunata*
ที่มา: (Maketon และคณะ, 2015)

2.2.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

C. gloeosporioides เป็นราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ในพืชเมืองร้อนหลายชนิด เช่น กล้าย, อะโวคาโด, มะละกอ, กาแฟ, เสาวรส และมะม่วง เป็นต้น (Nelson, 2008) ราชนิดนี้มีกระบวนการเข้าทำลายพืช โดยราจะยึดเกาะกับพื้นผิวของพืช และใช้ germ tube เจาะเข้าไปในพืชด้วยแรงกลของรา โดยมีเอนไซม์ช่วยในการทำลายผนังเซลล์ของพืช เพื่อให้ราสามารถเจริญเข้าไปในพืชได้ (Bechinger และคณะ, 1999) ราชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดโรคได้หลายโรค เช่น โรคลำต้นเน่า, ต้นอ่อนแห้งเหี่ยว และโรคแอนแทรคโนส เป็นต้น (Munoz และคณะ, 2009) *C. gloeosporioides* จัดอยู่ในโดเมน Eukaryota, อาณาจักร Fungi, ไฟลัม Ascomycota, คลาส Sordariomycetes, อันดับ Phyllachorales, แฟมิลี Phyllachoraceae เมื่อเลี้ยงรานี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA เส้นใยจะมีลักษณะฟู สีขาว ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ซึ่งราชนิดนี้สามารถสร้างคอนิเดียที่มีรูปทรงกระบอกหรือพระจันทร์เสี้ยว มี 1 เซลล์ ไม่มีสี ผนังเรียบและสปอร์มีผนังกันสามารถสร้าง appressorium ที่มีสีน้ำตาล เพื่อช่วยในการเข้าสู่เซลล์พืชและก่อโรคต่อไปได้ (Baxter และคณะ, 1983, Weir และคณะ, 2012)



รูปที่ 2.3 ลักษณะเส้นใยของ *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

รูปที่ 2.4 แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจาก *C. gloeosporioides* ซึ่งจะเกิดเป็นแผลรูปร่างรีหรือรูปร่างกลม มีสีน้ำตาลไหม้หรือสีน้ำตาลอมแดง สามารถขยายวงออกไปเป็นแผลใหญ่เห็นเป็นวงเรียงซ้อนๆกันหลายชั้น บริเวณที่เป็นแผลจะเป็นรอยบุ๋มลงไปต่ำกว่าระดับผิวใบเล็กน้อย ทำให้เห็นขอบแผลได้ชัดเจน ถ้าเป็นแผลบริเวณกลางใบจะมีแผลที่ค่อนข้างกลม ถ้าเป็นแผลที่บริเวณปลายใบแผลจะลามมาที่บริเวณโคนใบ (Chowdappa และคณะ, 2012) กล้ายไม้บางชนิดที่ขอบแผลจะมีเนื้อเยื่อสีเหลืองล้อมรอบแผล บางชนิดขอบแผลสีน้ำตาลเข้มกว่าแผลภายในและไม่มีขอบแผลสีเหลือง เมื่อเกิดอาการเป็นเวลานาน เนื้อเยื่อแผลจะบางและแห้งผิดปกติ ขนาดของแผลจะ

แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในการเกิดโรค โดยโรคนี้นักเกิดบนใบที่ถูกแดดจัด โดยเฉพาะกับกล้วยไม้สกุลหวาย และอาจลุกลามไปยังดอกกล้วยไม้ ทำให้เป็นจุดสีน้ำตาลเล็กๆ แล้วแผ่ขยายใหญ่เป็นสีเข้มขึ้น ถ้ามีอาการมากจะทำให้กลีบดอกกล้วยไม้เน่า และถ้าเข้าทำลายบริเวณเกสรจะทำให้เกิดเป็นแผลเน่าดำที่เกสรกล้วยไม้ได้ (Chowdappa และคณะ, 2012)

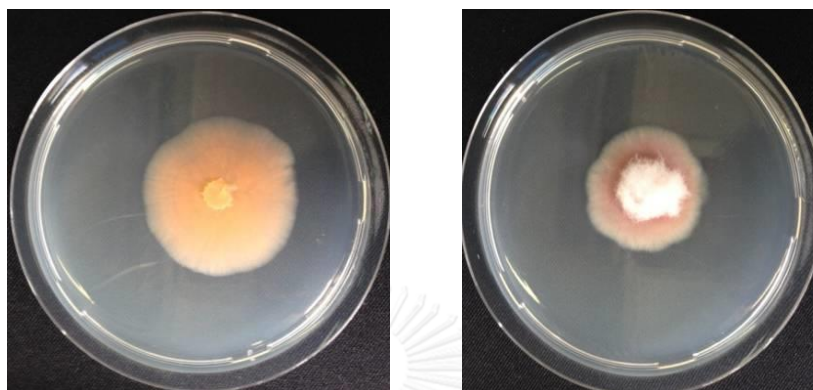


รูปที่ 2.4 โรคแอนแทรคโนสบนใบกล้วยไม้ที่มีสาเหตุเกิดจาก *C. gloeosporioides*
ที่มา: (Prapagdee และคณะ, 2008)

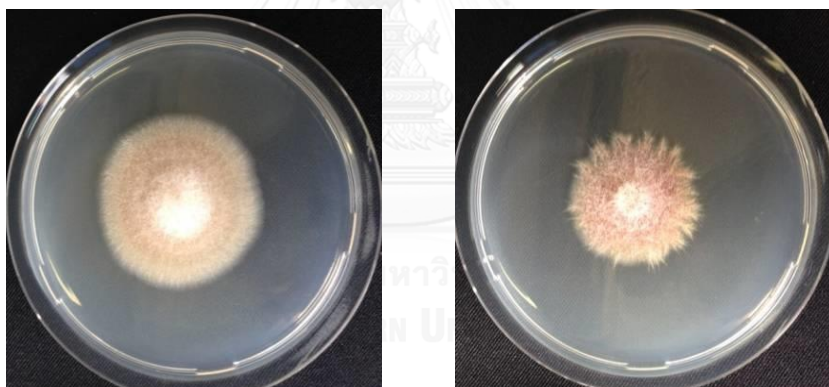
2.2.3 *Fusarium oxysporum*, *Fusarium periferatum*, *Fusarium solani* และ *Fusarium moniliforme*

Fusarium spp. เป็นราก่อโรคเน่าแห้งหรือเหี่ยว (*Fusarium wilt*) ที่สามารถแยกได้จากกล้วยไม้หลายสายพันธุ์ที่เป็นโรค และ *Fusarium* spp. ที่ก่อโรคในกล้วยไม้ก็พบว่ามีหลายสายพันธุ์ด้วยเช่นกัน ได้แก่ *F. moniliforme*, *F. periferatum*, *F. solani* และ *F. oxysporum* (Benyon และคณะ, 1996, Han และคณะ, 2017, Zhao และคณะ, 2017) เมื่อเชื้อเข้าทำลายกล้วยไม้บริเวณรากหรือตาหน้าตรงโคนต้นของกล้วยไม้ จะค่อยๆลุกลามไปสู่ยอดกล้วยไม้ บริเวณโคนต้นเกิดอาการโคนต้นเน่า แล้วรากของกล้วยไม้จะค่อยๆแห้งเหี่ยวไป โดยที่ต้นไม่ตาย แต่ต้นกล้วยไม้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทрудโทรมลง ถ้าเชื้อเข้าทำลายกล้วยไม้ที่ยังอายุน้อย (กล้วยไม้ที่ย้ายออกจากขวดมาปลูกในกระถาง) จะพบว่ามีอาการใบเหลือง เหี่ยวจากใบล่างขึ้นไปสู่ยอด รากและลำต้นจะเริ่มแห้งตายในที่สุด เมื่อตัดตามขวางของกล้วยไม้ จะเห็นอาการเน่าเป็นรอยวงแหวนสีม่วงหรือสีน้ำตาล อยู่รอบบริเวณท่อลำเลียงน้ำ และท่อลำเลียงอาหาร (Kim และคณะ, 2002, Laurence และคณะ, 2016) ราชชนิดนี้จัดอยู่ในโดเมน Eukaryota, อาณาจักร Fungi, ไฟลัม Ascomycota, คลาส Sordariomycetes, อันดับ Hypocreales, แฟมิลี Nectriaceae ลักษณะของ *Fusarium* spp. เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีขาวอมส้ม สีขาวอมม่วง หรือชมพูอมม่วง ดังแสดงในรูปที่ 2.5 และ 2.6 ราชชนิดนี้สามารถสร้างคอนิเดียได้ 3 ลักษณะ คือ 1) ไมโครคอนิเดีย (microconidia) ที่มีขนาดเล็ก มีลักษณะรูปไข่ มีเซลล์เดียว ไม่มีสี มักพบบ่อยในพืชที่เป็นโรค 2) มาโครคอนิเดีย

(macroconidia) ที่มีขนาดใหญ่กว่าไมโครคอนิเดีย มีผนังกันแบ่งออกเป็น 3-4 เซลล์ มีลักษณะเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว มักพบทั่วไปบริเวณผิวของพืชที่เป็นโรค และ 3) คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) เป็นสปอร์ที่สร้างบริเวณปลายเส้นใยของราที่มีอายุมาก มีผนังหนา (Ohara และ Tsuge, 2004)



รูปที่ 2.5 ลักษณะเส้นใยของ *F. oxysporum* (ซ้าย) และ *F. periferatum* (ขวา) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

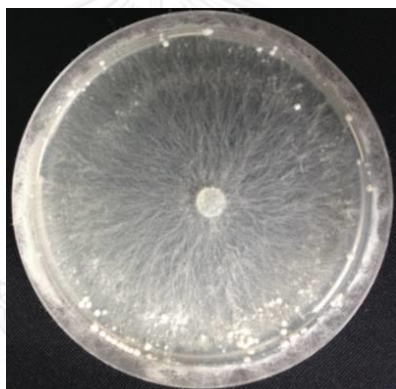


รูปที่ 2.6 ลักษณะเส้นใยของ *F. solani* (ซ้าย) และ *F. moniliforme* (ขวา) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

2.2.4 *Rhizoctonia solani*

R. solani เป็นราที่ก่อโรคในพืชหลากหลายชนิดและสามารถพบการแพร่กระจายได้ทุกที่ทั่วโลก โดยราชนิดนี้เป็นราที่พบได้ทั่วไปในดิน ซึ่งเป็นที่รู้จักกันอย่างดีเนื่องจากก่อให้เกิดโรคต่างๆ ดังนี้ โรคหัวเน่า (collar rot), โรครากเน่า (root rot), โรคเน่าคอดิน (damping off) และโรคโคนเน่า (wire stem) ราชนิดนี้ยังมีทั้งที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้และไม่ได้อีกด้วย (Ogoshi, 1987) ตัวอย่างของพืชที่ราชนิดนี้เข้าทำลายได้ เช่น ข้าว (Kamboj และคณะ, 2017), มันฝรั่ง (Bjorsell และคณะ, 2017), ฝ้าย (Zhang และคณะ, 2017a) และต้นบีท (sugar beet) (Khan และคณะ, 2017)

เป็นต้น สำหรับกล้วยไม้ นั้น *R. solani* สามารถก่อให้เกิดโรครากเน่าได้ โดยจะเริ่มแสดงอาการของโรคบริเวณกล้วยไม้ที่สัมผัสกับอากาศ จากนั้นใบจะเป็นสีเหลือง เหี่ยวแห้ง บิดเบี้ยว มีลักษณะขาดน้ำ อาการคล้ายกับการติดเชื้อจาก *Fusarium* sp. จากนั้นจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล ทำให้กล้วยไม้ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ จะมีขนาดเล็ก ลีบ และตายในที่สุด และโรคจากราชนิดนี้สามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคสามารถทำได้โดยตัดส่วนที่เป็นโรคทิ้งก่อนที่จะมีการแพร่ระบาด และปรับเรือนกล้วยไม้ให้สะอาด ปลอดภัยอยู่เสมอ (Bottom, 2017a, Bottom, 2017b, Hark, 2017) จากรูปที่ 2.7 แสดงลักษณะเส้นใยของ *R. solani* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ซึ่งเส้นใยจะมีลักษณะเป็นสีขาว และเมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน จะมีการสร้างเม็ดสีน้ำตาลเกิดขึ้นเรียกว่า สเคลอโรเตียม (*sclerotium*) *R. solani* จัดอยู่ในโดเมน Eukaryota, อาณาจักร Fungi, ไฟลัม Basidiomycota, คลาส Agaricomycetes, อันดับ Cantharellales และแฟมิลี Ceratobasidiaceae

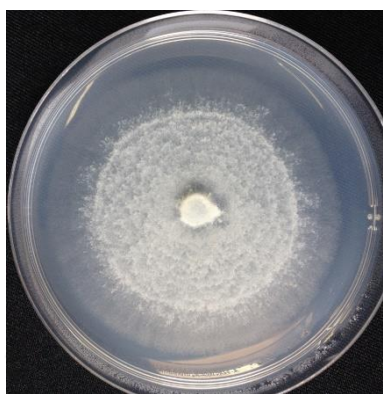


รูปที่ 2.7 ลักษณะเส้นใยของ *R. solani* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

2.2.5 *Phytophthora palmivora*

P. palmivora จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่คล้ายราที่จัดอยู่ในโดเมน Eukaryota, อาณาจักร Stramenopiles, ไฟลัม Heterokontophyta, คลาส oomycetes, อันดับ Peronosporales, และแฟมิลี Pythiaceae เรียกโดยทั่วไปว่าเป็นกลุ่มของราน้ำ (water mold) ซึ่งราพวกนี้จำเป็นที่จะต้องดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำเพื่อช่วยในการเคลื่อนที่แพร่ระบาดจากพืชต้นหนึ่งไปสู่พืชอีกต้นหนึ่ง ราชนิดนี้เป็นราที่ก่อโรคในพืชได้หลากหลายชนิดในบริเวณเขตร้อนชื้น (Zentmyer และคณะ, 1973, Chee, 1974) ส่วนใหญ่แล้ว ราชนิดนี้มักก่อให้เกิดโรครากเน่าดำหรือโรครากเน่าเข้าไส้ (black rot หรือ *Phytophthora* rot) ในกล้วยไม้หลากหลายสายพันธุ์ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*), กล้วยไม้สกุลเอสโคเซนดา (*Ascocenda*), กล้วยไม้สกุลบรัสซาโวลา (*Brassavola*), กล้วยไม้สกุล

หวาย (*Dendrobium*), กล้วยไม้สกุลกอนโกกรา (*Gongora*), กล้วยไม้สกุลเอื้อง (*Maxillaria*), กล้วยไม้สกุลออนซิเดียม (*Oncidium*), กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*), กล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส (*Phalaenopsis*), กล้วยไม้สกุลซ้าง (*Rhynchostylis*), กล้วยไม้สกุลชอมบูเกีย (*Schomburgkia*) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกล้วยไม้สกุลแคทลียา (*Cattleya*) และพวกลูกผสมต่างๆ (Orlikowski และ Szkuta, 2006) เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง V8 ลักษณะของ *P. palmivora* จะมีเส้นใยสีขาว ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 ลักษณะเส้นใยของ *P. palmivora* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง V8 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

P. palmivora ก่อให้เกิดโรคในกล้วยไม้ โดยสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของกล้วยไม้ โดยเฉพาะหน่อ ยอดอ่อน หรือราก ถ้าเชื้อเข้าทำลายส่วนยอดจะแสดงอาการเน่าดำฉ่ำน้ำ ทำให้ยอดเน่าเป็นสีน้ำตาล เมื่อจับจะหลุดติดมือได้ง่าย ถ้ามีอาการรุนแรงมากขึ้นเชื้อจะลุกลามเข้าไปในลำต้น และทำลายเนื้อเยื่อของต้น โดยจะสังเกตได้จากใบล่างเริ่มหลุดร่วงทีละใบ ลักษณะใบเริ่มเหี่ยวเฉา ไม่เต่งตึง และเมื่อผ่าดูจะพบว่าเป็นสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มตามแนวยาวของลำต้น ทำให้เกิดอาการเน่า เรียกว่า ระบายเน่าเข้าไส้ จากนั้นจะเกิดการแห้งตายไปทั้งต้น แต่ถ้าเชื้อเข้าทำลายที่ราก รากจะเน่าแห้ง ทำให้มีอาการใบเหลือง ร่วงและตายในที่สุด (Uchida, 1994, Cating และคณะ, 2010) ดังแสดงในรูปที่ 2.9 ราชชนิดนี้จะแพร่ระบาดได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นในอากาศสูง เช่น ในฤดูฝน

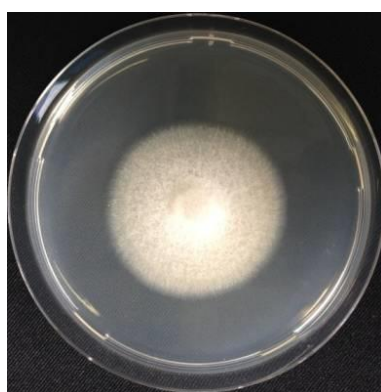


รูปที่ 2.9 โรคเน่าดำหรือโรคเน่าเข้าไส้บนกล้วยไม้ที่มีสาเหตุเกิดจาก *P. palmivora*

ที่มา: (Cating และคณะ, 2010)

2.2.6 *Pythium aphanidermatum*

P. aphanidermatum เป็นสิ่งมีชีวิตที่คล้ายราพวกราน้ำเช่นเดียวกับ *Phytophthora* spp. พบอาศัยทั่วไปในดินซึ่งมีน้ำขัง เป็นสาเหตุของโรครากเน่า โรคเน่าคอดิน หรือโรคเน่าระดับคอดิน (damping-off) ในต้นกล้าพืชสำคัญหลายชนิด เช่น แตงกวา (Morris และคณะ, 2016), พริกหยวก (De Cara-Garcia และคณะ, 2017), มะเขือเทศ (Fukuta และคณะ, 2013) และหญ้าหวาน (Koehler และคณะ, 2017) เป็นต้น ในต้นกล้วยไม้นั้น ราสายพันธุ์นี้จะเข้าทำลายส่วนโคนต้น ทำให้ต้นกล้าล้มตาย และเกิดรากเน่า (Xing และคณะ, 2015) การแพร่ระบาดของรานี้ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ ถ้ามีความร้อนชื้นที่เหมาะสมจะมีการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว (Lodhi และคณะ, 2013) *P. aphanidermatum* จัดอยู่ในโดเมน Eukaryota, อาณาจักร Stramenopiles, ไฟลัม Heterokonta, คลาส Oomycetes, อันดับ Peronosporales, แฟมิลี Pythiaceae ลักษณะของรา จะเห็นเป็นเส้นใยฟู สีขาว ดังรูปที่ 2.10 ผนังเซลล์ของรานี้นี้จะเป็นเซลล์ลูโลสเป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งแตกต่างจากราแท้ทั่วไปที่จะประกอบด้วยไคตินเป็นหลัก



รูปที่ 2.10 ลักษณะเส้นใยของ *P. aphanidermatum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

2.3 การป้องกันและการกำจัดราที่ก่อโรคในกล้วยไม้

จากข้อมูลข้างต้นพบว่ากล้วยไม้เมืองร้อนสามารถถูกรากหลายสายพันธุ์เข้าทำลายได้ และยังสามารถก่อให้เกิดโรคในกล้วยไม้ได้หลายชนิด ดังนั้นผู้ปลูกกล้วยไม้จึงจำเป็นที่จะต้องป้องกันไม่ให้เกิดการเข้าทำลายจากรา โดยเบื้องต้น ควรคัดเลือกกล้วยไม้ที่จะนำไปปลูกให้แน่ใจว่าปราศจากเชื้อรา, ปรับสภาพพื้นที่ที่ใช้สำหรับปลูกกล้วยไม้ให้มีความปลอดโปร่ง โล่ง ไม้มีความอับชื้น มีอากาศที่ถ่ายเทได้สะดวก และไม่ปลูกกล้วยไม้จนแน่นเกินไป นอกจากนี้ควรมีการพรางแสงให้เหมาะสมกับกล้วยไม้ เพื่อป้องกันไม่ให้กล้วยไม้ได้รับแสงแดดจัดมากเกินไป จนทำให้เกิดอาการใบไหม้ เพราะจะทำให้ราเข้าทำลายกล้วยไม้ได้ง่ายขึ้น หรือถ้ากล้วยไม้นั้นถูกรากหลายแล้ว ผู้ปลูกกล้วยไม้จำเป็นต้องกำจัดราด้วยวิธีต่างๆ เช่น ควรทำลายกล้วยไม้ที่เป็นโรคทั้งหมดทิ้งด้วยการเผาทำลาย จากนั้นฉีดพ่นด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อรา เพื่อไม่ให้ราแพร่ระบาดต่อไป (อุไร จิรมงคลการ, 2548)

ผู้ปลูกกล้วยไม้ส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมีเพื่อกำจัดรา เพราะสามารถยับยั้งราได้อย่างมีประสิทธิภาพและให้ผลอย่างรวดเร็ว แต่หากมีการใช้สารเคมีติดต่อกันเป็นเวลานาน นอกจากจะทำให้เชื้อราดื้อต่อยาแล้ว ยังทำให้สารเคมีเกิดการตกค้างในธรรมชาติและในผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังก่อให้เกิดผลเสียกับพืชที่ปลูก และที่ร้ายแรงที่สุดคือ ส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้ปลูกเองด้วย (Basha และ Ulaganathan, 2002, Singh และคณะ, 2011) นอกจากนี้การตกค้างของสารเคมีในกล้วยไม้ยังส่งผลให้เกิดการปฏิเสธกล้วยไม้นั้นๆจากประเทศคู่ค้าได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการทางชีวภาพมาช่วยสำหรับการยับยั้งรา เพื่อไม่ให้มีสารเคมีตกค้างในธรรมชาติและกล้วยไม้ รวมถึงไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้ปลูกกล้วยไม้อีกด้วย

2.4 การใช้วิธีทางชีวภาพ (biological control)

วิธีทางชีวภาพ คือ การใช้สิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพสูงและเป็นปฏิปักษ์ต่อศัตรูพืช เพื่อควบคุมหรือลดความหนาแน่นของประชากรสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูของพืช ให้อยู่ในระดับที่ไม่สามารถส่งผลเสียหายต่อพืชได้ โดยอาศัยหลักการการทำงานของสิ่งมีชีวิตหรือผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิตและให้ธรรมชาติช่วยในการจัดการ (Eilenberg และคณะ, 2001) และวิธีนี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับการจัดการกับโรคที่เกิดกับพืชเป็นอย่างมาก เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคในพืชจะช่วยทำลายและยับยั้งการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคพืช และยังมีประโยชน์ต่างๆมากมาย เช่น ลดการใช้สารเคมีสำหรับการควบคุมโรคพืช, ช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร, ช่วยรักษาระบบนิเวศน์ และยังสามารถที่เป็นประโยชน์ต่อระบบเศรษฐกิจอีกด้วย (Pal และ Gardener, 2006, Bardas และคณะ, 2009)

2.5 แบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria)

การป้องกันและกำจัดเชื้อก่อโรคโดยแบคทีเรียนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria) ที่มีประสิทธิภาพดีในการต่อต้านหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืช หรือชักนำให้พืชสามารถสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจะต้องไม่ทำให้พืชเป็นโรคเสียเองและต้องไม่ทำให้สภาพแวดล้อมเสียหาย ซึ่งปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ที่สามารถควบคุมโรคพืชได้ และพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่พบได้ทั่วไป ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Bacillus* และแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas*

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus*

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ส่วนใหญ่จะต่อกันเป็นสายยาว สามารถสร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore forming) โดยมี 1 สปอร์ต่อ 1 เซลล์ และสปอร์ส่วนใหญ่จะมีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยสปอร์สามารถทนต่อภาวะที่มีความเป็นกรด-เบสได้สูง ทนต่ออุณหภูมิสูง และภาวะออสโมติก (osmotic) สูงได้ ซึ่งบางสายพันธุ์ต้องการออกซิเจนในการหายใจ แต่บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) โดยมักพบได้ทั่วไปในดิน ส่วนใหญ่ไม่ก่อให้เกิดโรค และมีประโยชน์ต่างๆมากมาย และมีหลากหลายสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชได้ (Leifert และคณะ, 1995, Basha และ Ulaganathan, 2002, Caldeira และคณะ, 2006)

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ทำหน้าที่เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้เนื่องจากสามารถผลิตสารหลายชนิดที่ยับยั้งราได้ เช่น surfactin, iturin และ fengycin ซึ่งเป็นสารจำพวกลิโปเปปไทด์ (lipopeptide) นอกจากนี้ *Bacillus* ยังมีรายงานว่าทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้พืชมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากเชื้อก่อโรคได้อีกด้วย (Ongena และ Jacques, 2008) *Bacillus velezensis* M75 ซึ่งคัดแยกได้จากเศษฝ้ายที่ใช้สำหรับปลูกเห็ดในเกาหลี พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชได้หลายชนิด (Kim และคณะ, 2017) *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 สามารถต้านทานต่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวในผลไม้หลายชนิด เช่น ส้ม แอปเปิ้ล องุ่น และพีช เป็นต้น และเมื่อศึกษาสมบัติการเจริญของ *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 ที่อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมแล้วพบว่า *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้หลายชนิด ได้แก่ *B. cinerea*, *Monilinia fructicola*, *M. laxa*, *P. digitatum*, *P. expansum* และ *P. italicum* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *M. laxa* ได้ดีที่สุด และ *P. italicum* ได้น้อยที่สุด และเมื่อทดสอบบนผลไม้โดยใช้เซลล์ น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส และเอนโดสปอร์ของ *B. amyloliquefaciens*

BUZ-14 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. Digitatum* และ *P. italicum* ในสั้ม, ลดการเกิดโรคจาก *P. expansum* ในแอปเปิ้ล และยังสามารถควบคุมโรคเน่าในพืชเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำได้ ดังนั้น *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 จึงเหมาะที่จะเป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะ เพื่อที่จะนำไปใช้ในการเก็บรักษาผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวก่อนนำสู่ตลาดได้ (Calvo และคณะ, 2017) เป็นต้น

ปัจจุบัน *Bacillus* spp. ที่ใช้ในการควบคุมและกำจัดเชื้อก่อโรคพืชมีหลากหลายสายพันธุ์ เช่น *B. subtilis*, *B. pumilus* และ *B. licheniformis* ซึ่งมีการผลิตจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ภายใต้ชื่อทางการค้าต่าง ๆ มากมายในต่างประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 รายชื่อผลิตภัณฑ์ต่างๆของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่ใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืช

ผลิตภัณฑ์	แบคทีเรีย	กลไก	เชื้อก่อโรคพืช	พืช	บริษัท, ประเทศ
Avogreen®	<i>B. subtilis</i>	การสร้างสารปฏิชีวนะ	<i>C. gloeosporioides</i> และ <i>Cercospora</i>	อะโวคาโด	Ocean Agriculture, South Africa
Nacillus®	<i>Bacillus</i> spp. และ <i>Brevibacillus brevis</i>	การสร้างสารปฏิชีวนะ	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Xanthomonas</i> และ <i>Clavibacter</i>	พืชหลายชนิด	Bio Insumos Nativa Ltda., Chile
Nacillus Pro 3.01®	<i>Bacillus</i> spp. และ <i>Brevibacillus parabrevis</i>	การสร้างสารปฏิชีวนะ	<i>Phytophthora infestans</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Erwinia</i> และ <i>Clavibacter</i>	พืชหลายชนิด	Bio Insumos Nativa Ltda., Chile
Ballad®	<i>B. pumilus</i>	การสร้างสารปฏิชีวนะ, การแข่งขัน, การส่งเสริมการเสริม และการชักนำความต้านทาน	<i>Rhizoctonia oryzae</i> , <i>Puccinia</i> spp., <i>Uromyces betae</i> , <i>Puccinia sorghi</i> , <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Peronospora manshurica</i> , <i>Erysiphe graminis</i> , <i>Erysiphe betae</i> , <i>Erysiphe polygoni</i> , <i>Cercospora</i>	ธัญพืช, พืชน้ำมัน, หัวบีท	AgraQuest Inc., USA

			<i>beticola</i> <i>Entyloma</i> , <i>Dreschlera</i> , <i>Exserohilum</i> <i>turcicum</i> , <i>Helminthosporium</i> , <i>Bipolaris maydis</i> , <i>Cochliobolus</i> <i>heterostrophus</i> , <i>Cochliobolus</i> , <i>Ceratobasidium</i> , <i>Ramularia</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Phakopsora</i> <i>pachyrhizi</i> , <i>Septoria glycines</i> , <i>S. sclerotiorum</i>		
EcoGuard™ Biofungicide	<i>B. licheniformis</i>	การสร้างสาร ปฏิชีวนะ, การ สร้างเอนไซม์	<i>Colletotrichum</i> <i>graminicola</i> , <i>Sclerotinia</i> <i>homeocarpa</i>	สนามกอล์ฟ, สนามหญ้า, ฟาร์มหญ้า และสวน พฤกษชาติ	Novozymes A/S, Denmark. Novozymes Biologicals, USA
Kodiak®	<i>B. subtilis</i>	การสร้างสาร ปฏิชีวนะ, การ แข่งขัน, การ ส่งเสริมการเจริญ, การชักนำความ ต้านทาน	<i>Rhizoctonia</i> และ <i>Fusarium</i>	ฝ้าย	Gustafson Inc., USA

ที่มา : (Cawoy และคณะ, 2011, Donoso และคณะ, 2015)

แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas*

Pseudomonas spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) รูปร่างเป็นท่อนสั้น (short rod shape) อาจมีท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) มีแฟลกเจลลา (flagella) แบบเส้นเดี่ยวหรือหลายเส้นเพื่อใช้สำหรับการเคลื่อนที่ แบคทีเรียสกุลนี้ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจน และบางชนิดสามารถสร้างเม็ดสี (pigment) ได้ อีกทั้งยังสามารถก่อให้เกิดโรคทั้งในคน สัตว์และพืชได้ อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียชนิดนี้ก็ยังมีประโยชน์ต่างๆมากมาย เช่น เป็นผู้ย่อยสลายที่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การย่อยสารอินทรีย์สังเคราะห์ (Sharma และคณะ, 2017) และสามารถพบได้ใน

ดินและในธรรมชาติทั่วไป นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการเกิดโรคด้วยวิธีชีวภาพ อาทิเช่น *P. aeruginosa* สามารถทนต่อสารกำจัดราบางชนิดได้จึงนำแบคทีเรียนี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรค (Dowling และ O'Gara, 1994, Chemeltorit และคณะ, 2017) กลุ่มของแบคทีเรีย *Pseudomonas* สายพันธุ์ที่เรืองแสง (fluorescent pseudomonad species) ประกอบไปด้วย *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. putida* และ *P. pyrocinia* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชได้ โดยมีศักยภาพในการเป็นปฏิปักษ์ที่แตกต่างกันไป (De Weger และคณะ, 1986, Kumar และคณะ, 2005)

ตัวอย่างของแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* spp. ที่ทำหน้าที่เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น *P. aeruginosa* DR1 สามารถใช้น้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดมะม่วงซึ่งเป็นของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมร่วมกับกลูโคส เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตแรมโนลิพิด (rhamnolipid) โดยน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *P. aeruginosa* DR1 ที่มีส่วนประกอบของแรมโนลิพิด สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, ทนค่าความเป็นกรด-เบส ได้สูงถึง pH12 และทนความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ได้ถึง 20% ซึ่งแรมโนลิพิดที่ผลิตได้จาก *P. aeruginosa* DR1 สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชได้หลายชนิด (Sathi Reddy และคณะ, 2016) *P. aeruginosa* KUCd1 สามารถลดการเกิดโรคที่เกิดจาก *Phytophthora nicotianae* ในมะเขือเปราะได้ โดย *P. aeruginosa* KUCd1 จะเจริญอยู่ที่รากของต้นมะเขือเปราะ และไปกระตุ้นการสร้างระบบการต้านการเกิดโรคจาก *P. nicotianae* ในต้นมะเขือเปราะ โดยกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันพืชไม่ให้ติดเชื้อ เช่น แคทาเลส, ฟินิลอะลานินแอมโมเนียไลเอส, เพอร์ออกซิเดส, และพอลิฟีนอลออกซิเดส ซึ่งมีฤทธิ์ในการป้องกันการติดเชื้อจาก *P. nicotianae* ในต้นมะเขือเปราะได้ (Suchismita และคณะ, 2016) อีกตัวอย่างเช่น *P. fluorescens* EK007-RG4 ที่คัดแยกได้จากผิวของต้นแพร์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Erwinia amylovora* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไหม้ไฟ (fire blight) และยังสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรคชนิดอื่นๆได้อีกหลายชนิด (Habibi และคณะ, 2017) เป็นต้น

แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* ถูกนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ในการควบคุมโรคพืชภายใต้ชื่อทางการค้าต่างๆมากมาย ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 รายชื่อผลิตภัณฑ์ต่างๆของแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* ที่ใช้ในการควบคุมโรคในพืช

ผลิตภัณฑ์	แบคทีเรีย	ราก่อโรคพืช	พืช	บริษัท, ประเทศ
Bio-save® 10/11	<i>P. syringae</i>	ราสีฟ้า (blue mold) (<i>P. expansum</i>), ราสีเขียว (<i>P. digitatum</i>), ราสีเทา (<i>B. cinerea</i>), เน่าจาก <i>Mucor</i> (<i>Mucor piriformis</i>), เน่าแห้ง จาก <i>Fusarium</i> (<i>Fusarium</i> <i>sambucinum</i>), เอลมินโทสปอ รีโอซิส (helminthosporiosis) (<i>Helminthosporium</i> spp.)	แอปเปิ้ล, แพร์, ส้ม, เบอร์รี่, มัน หวาน, มัน ฝรั่ง	Jet Harvest Solutions, USA
Cedomon®	<i>P. chlororaphis</i>	โรคที่เกิดกับเมล็ด	บาร์เลย์, โอ๊ต	Lantmannen BioAgri AB, Sweden
Cerall®	<i>P. chlororaphis</i>	<i>Tilletia caries</i> , <i>Septoria</i> <i>nodorum</i> และ <i>Fusarium</i> spp.	ข้าวสาลี, ไรน์, ทริทิ เคล	Lantmannen BioAgri AB, Sweden
Spot-Less Biofungici de®	<i>P. aureofaciens</i>	แอนแทรคโนส (<i>C.</i> <i>graminicola</i>), รากเน่า (<i>P.</i> <i>aphanidermatum</i>) และ ดอลลาร์สปอต (<i>S. homeocarpa</i>)	หญ้า	Turf Science Laboratories, USA

ที่มา : (Cawoy และคณะ, 2011)

2.6 กลไกการทำงานของแบคทีเรียปฏิปักษ์

กลไกการทำงานของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* และแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* มีกลไกการทำงานที่เหมือนกันทั้ง 4 ลักษณะ ได้แก่ 1. การแข่งขัน (competition) 2. การเป็นปรสิต (parasitism) 3. การสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ (antibiosis and enzyme) 4. การชักนำให้เกิด

ความต้านทานโรค (induced disease resistance) โดยจะยกตัวอย่างกลไกการทำงานของแบคทีเรียทั้งสองสกุลที่สามารถไปทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค ดังนี้

1. การแข่งขัน (competition)

จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรคจะเข้าแย่งชิงถิ่นที่อยู่อาศัย อาหาร และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ทำให้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรคมีจำนวนมากขึ้น ส่งผลให้ราก่อโรคขาดสารอาหาร เจริญเติบโตช้าลงหรือไม่สามารถเจริญเติบโต และยังช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของราก่อโรคได้ (Lugtenberg และ Kamilova, 2009) สารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของราก่อโรคมีอยู่หลากหลายชนิด และธาตุเหล็กเป็นสารอาหารหลักอย่างหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งเชื้อปฏิปักษ์จะสร้างไซเดอโรฟอร์ (siderophore) เพื่อไปแย่งจับธาตุเหล็ก ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญต่อไปได้ แต่เชื้อปฏิปักษ์จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแทน (Liu และคณะ, 2017) โดยไม่มีผลกระทบต่อพืชที่ปลูก เนื่องจากพืชสามารถรับธาตุเหล็กจากไซเดอโรฟอร์ของแบคทีเรียได้ (Orlando และ Neilands, 1982, Powell และคณะ, 1982)

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชด้วยกลไกการแข่งขัน เช่น *Bacillus* sp. มีกลไกในการควบคุมโรคเหี่ยวหรือโรคใบเหลืองที่เกิดจาก *Fusarium* sp. ได้โดยมีการแย่งอาหารและสร้างไซเดอโรฟอร์เพื่อเข้าแย่งจับธาตุเหล็ก ทำให้ไปรบกวนการงอกและการเจริญของ *Fusarium* sp. ดังนั้นจึงช่วยลดการก่อโรคเหี่ยวหรือโรคใบเหลืองที่เกิดจาก *Fusarium* sp. ได้ (Gajera และคณะ, 2016) อีกตัวอย่างหนึ่งพบว่า *P. aeruginosa* FP6 สามารถผลิตไซเดอโรฟอร์ในภาวะที่มีธาตุเหล็กต่ำ เพื่อเป็นการจับธาตุเหล็กที่มีไว้ใช้ในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเอง ส่งผลให้สามารถยับยั้งการเจริญของ *R. solani* ซึ่งเป็นราก่อโรคในพืชได้ (Sasirekha และ Srividya, 2016) ดังนั้นการแย่งธาตุเหล็กสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรคจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง (Saravanakumar และคณะ, 2008)

2. การเป็นปรสิต (parasitism)

จุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นปรสิตสามารถควบคุมโรคพืชได้ โดยจุลินทรีย์จะเข้าไปเจริญและทำลายราก่อโรค เพื่อแย่งชิงอาหารและสารอาหารที่มีประโยชน์จากราก่อโรค ทำให้ราก่อโรคไม่สามารถแพร่กระจายต่อไปได้

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชด้วยกลไกการเป็นปรสิต เช่น *Trichoderma virens* NBAII Tvs 12 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคลำต้นเน่า (stem rot) ในถั่วลิสง หลังจากสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เส้นใยของ

T. virens NBAll Tvs 12 สามารถเจริญเข้าไปใน *S. rolfsii* ได้ ทำให้ *S. rolfsii* ถูกยับยั้งและไม่สามารถเจริญต่อไปได้ (Hirpara และคณะ, 2016) ไส้เดือนฝอย (*Meloidogyne* spp.) ก่อให้เกิดโรครากปม (root-knot) และเป็นศัตรูพืชในพืชเศรษฐกิจหลากหลายชนิด จากงานวิจัยพบว่า *Pasteuria penetrans* เป็นปรสิตกับไส้เดือนฝอย และสามารถยับยั้งการเกิดโรคจากไส้เดือนฝอยได้ (Davies, 2009)

3. การสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ (antibiosis and enzyme)

จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อก่อโรคจะสร้างสารพิษที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อก่อโรค หรือสร้างเอนไซม์ไปทำลายเส้นใย ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรค เพื่อควบคุมไม่ให้เชื้อก่อโรคเกิดโรคพืชได้ โดยพบว่าแบคทีเรียทั้งสกุล *Bacillus* (Stein, 2005) และสกุล *Pseudomonas* แต่ละสกุลสามารถสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ได้หลากหลายชนิด มีรายงานว่าแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* สามารถสร้างออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้มากมาย หลากหลายชนิด เช่น pyocyanin, 2-acetamidophenol, pyrrolnitrin, pyoluteorin, 2,4-diacetylphloroglucinol, viscosinamide, viscosinamide และ tensin เป็นต้น (Kumar และคณะ, 2005, Imperiali และคณะ, 2017)

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชด้วยกลไกการสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ เช่น Cyclo(d-Pro-L-Val) ซึ่งมีรายงานว่า เป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สร้างมาจาก *B. amyloliquefaciens* Y1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. graminearum* ซึ่งก่อให้เกิดโรคเมล็ดเน่า (head blight) ในเมล็ดข้าวสาลีได้ และเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า *F. graminearum* มีรูปร่างผิดปกติ เซลล์แตกสลาย และถูกทำลายหลังจากถูกยับยั้งด้วย Cyclo(d-Pro-L-Val) และถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ความเข้มข้นของ Cyclo(d-Pro-L-Val) เท่ากับ 1000 ppm เป็นเวลา 10 วัน (Jamal และคณะ, 2017) *Pseudomonas* spp. พวกที่เรืองแสง สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ phenazine-1-carboxylic acid (PCA) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *R. solani* และ *R. oryzae* ซึ่งเป็นราก่อให้เกิดโรครากเน่าในข้าวสาลีได้ (Mohd และคณะ, 2017)

4. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance)

การใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกระตุ้นให้พืชป้องกันตัวเองจากรา จะส่งผลทำให้พืชไม่เป็นโรค โดยระบบภูมิคุ้มกันของพืชที่เกิดขึ้นจะสามารถทำให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้ดี และยังส่งผลให้พืชมีการส่งเสริมการเจริญของพืชเองด้วย (Salomon และคณะ, 2017)

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชด้วยกลไกการชักนำให้เกิดความต้านทานโรค เช่น *S. rolfsii* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคลำต้นเน่าในต้นถั่วลิสง ถูกยับยั้งการเจริญด้วยกลไกการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในต้นพืช โดย *Bacillus* sp. CHEP5 และ *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 ที่สามารถทำให้ต้นถั่วสร้างปมราก ส่งผลทำให้ต้นถั่วมีระบบภูมิคุ้มกันที่สร้างความต้านทานต่อการเจริญของ *S. rolfsii* ได้ และนอกจากนี้ยังส่งเสริมให้เมล็ดถั่วลิสงมีขนาดใหญ่ขึ้นอีกด้วย (Figueredo และคณะ, 2017) *Pseudomonas* sp. CMR12a สามารถสร้างสาร phenazine เพื่อไปกระตุ้นระบบความต้านทานต่อ *Magnaporthe oryzae* ซึ่งก่อโรคไหม้ในต้นข้าวและ *R. solani* AG2-2 ซึ่งก่อโรคกาบใบแห้งในต้นถั่วได้ (Ma และคณะ, 2016)

2.7 สารต้านราที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* และแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas*

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของราได้หลายชนิด ซึ่งมีความสามารถในการออกฤทธิ์แตกต่างกันออกไป (Sumi และคณะ, 2014) ดังเช่น *B. subtilis* CMB32 ที่คัดแยกได้จากดิน สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวจำพวก lipopeptide ได้แก่ IturinA, fengycin, และ surfactin A ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในพืชได้ (Kim และคณะ, 2010) *B. amyloliquefaciens* LBM 5006 สามารถยับยั้งการเจริญของราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., และ *Bipolaris sorokiniana* หลังจากทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีน คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร และการสกัดด้วยตัวทำละลายพบว่า สารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา ได้แก่ iturin และ surfactin (Benitez และคณะ, 2010) *B. subtilis* B29 สามารถสร้างสารที่เรียกว่า B29I ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ โดยสารนี้ได้จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* B29 มาทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสารและแบบอาศัยความแตกต่างของขนาดมวลและรูปร่างของโปรตีน พบว่าโปรตีนบริสุทธิ์ B29I ที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของราหลายชนิด ได้แก่ *F. oxysporum*, *R. solani*, *F. moniliforme*, และ *S. sclerotiorum* (Li และคณะ, 2009) เป็นต้น

แบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* ผลิตสารต้านราได้หลายชนิด โดยสารแต่ละชนิดมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันออกไป (Rai และคณะ, 2017) ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas* sp. DSS73 ที่คัดแยกได้จากบริเวณพื้นผิวของหัวบีท สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. ultimum* และ *R. solani* ได้โดยสร้างสารจำพวก cyclic lipopeptide ได้แก่ amphisin (Andersen และคณะ, 2003) *Pseudomonas* sp. F113 ที่คัดแยกได้จากหัวบีทสามารถสร้างสาร 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Pythium* sp. โดยการสร้างสารนี้จะผลิตได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยง

Pseudomonas sp. F113 ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส และยังพบว่าแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลให้มีการผลิต DAPG ได้สูงคือ ซูโครส, ฟรุคโตส, และแมนนิทอล โดยที่ความเข้มข้นของเหล็ก, ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณออกซิเจนไม่มีผลต่อการผลิตสารนี้ (Shanahan และคณะ, 1992) *P. aureofaciens* Tx-1 (ATCC 55670) สามารถสร้างสาร phenazine-1 carboxylic acid (PCA) ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. homeocarpa* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคในหญ้าปูสนามได้ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* (Powell และคณะ, 2000) เป็นต้น

2.8 การทำบริสุทธิ์โปรตีนและการวิเคราะห์โปรตีนบริสุทธิ์

การทำให้โปรตีนจากจุลินทรีย์บริสุทธิ์มีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสมบัติของโปรตีนนั้นๆ อาทิเช่น ขนาด ประจุ สมบัติการละลาย และสมบัติการจับ (binding) เป็นต้น (Berg และคณะ, 2002) ส่วนใหญ่แล้ว ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์สารประเภทโปรตีนมักประกอบด้วย การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation), การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography), และการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) (Stein, 2005, Wang และ Zhang, 2017) ซึ่งในแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

2.8.1 การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation)

การตกตะกอนโปรตีนสามารถใช้เกลือได้หลากหลายชนิดในการตกตะกอนโปรตีน ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต โพแทสเซียมซัลเฟต หรือโซเดียมซัลเฟต เป็นต้น (Deutscher, 1990) การตกตะกอนด้วยวิธีนี้เป็นการใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง (salting out) เติมลงไปในการละลายของโปรตีนผสม เพื่อเพิ่มความแรงไอออน (ionic strength) ของสารละลายให้สูงขึ้น โดยเกลือที่เข้าไปผสมกับสารละลายโปรตีนจะเข้าไปแย่งจับโมเลกุลของน้ำที่อยู่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีน ส่งผลให้โมเลกุลของโปรตีนในส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือไม่สามารถละลายน้ำของโปรตีนแต่ละตัวเคลื่อนที่มาอยู่ใกล้กัน จากนั้นจะมารวมตัวกันเกิดเป็นกลุ่มก้อนโปรตีนขนาดใหญ่ มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นแล้วจึงตกตะกอนโปรตีนลงมา (Roe, 2001, Wingfield, 2001, Scopes, 2013) เกลือที่นิยมใช้สำหรับการตกตะกอนโปรตีนมากที่สุด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ เนื่องจากมีค่าการละลายน้ำสูงมากและมีค่าสัมประสิทธิ์อุณหภูมิของการละลายค่อนข้างต่ำ (temperature coefficient of solubility) ในช่วงอุณหภูมิ 0-30 องศาเซลเซียส ทำให้การตกตะกอนโปรตีนสามารถทำได้ที่อุณหภูมิต่ำ โดยไม่ก่อให้เกิดการสลายตัวของโครงสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ ทำให้โปรตีนที่ได้ไม่เสียสภาพ (Deutscher, 1990, Scopes, 2013) และในกรณีที่มีโปรตีนผสมกันอยู่หลายชนิด สามารถแยก

ตะกอนโปรตีนออกเป็นกลุ่มย่อยได้ โดยการใช้ความเข้มข้นของเกลือที่อิมิตัวที่แตกต่างกันเป็นช่วงๆ (salt fractionation) (Wingfield, 2001, Scopes, 2013)

ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เริ่มจากการหาช่วงความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิมิตัวที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรตีน โดยมีปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้เลือกใช้ตามรูปที่ 2.11 การตกตะกอนโปรตีนจะทำในภาวะที่มีอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันไม่ให้โปรตีนที่ตกตะกอนลงมาเสียสภาพและสูญเสียแอกทิวิตีของโปรตีน และขณะตกตะกอนโปรตีนนั้น ความเข้มข้นของเกลือในสารละลายจำเป็นต้องเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นจึงควรกวนสารละลายโปรตีนอย่างต่อเนื่องตลอดการตกตะกอนและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณน้อยๆเพื่อให้เกิดความเข้มข้นที่สม่ำเสมอทุกตำแหน่ง และหลังเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในแต่ละครั้งควรรอให้แอมโมเนียมซัลเฟตละลายให้หมดก่อนที่จะเติมครั้งต่อไป เพื่อการกระจายตัวที่ดีของเกลือแอมโมเนียมในสารละลายโปรตีน หลังจากเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจนได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการแล้ว ควรกวนสารละลายโปรตีนไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ช่วงหนึ่ง เพื่อให้โปรตีนตกตะกอนออกมาได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายโปรตีนไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนโปรตีนในแต่ละช่วงความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำตะกอนโปรตีนที่ได้ในแต่ละช่วงนั้นไปวัดปริมาณโปรตีนและวัดแอกทิวิตีของโปรตีน (Cutler, 2004)



Initial concentration of ammonium sulphate, (% saturation)	Final concentration of ammonium sulphate																
	% saturation																
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
	Grams solid ammonium sulphate to be added to 1 L. of solution																
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
50										33	66	101	137	176	214	302	392
55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314
65													34	70	107	190	275
70														35	72	153	237
75															36	115	198
80																77	157
90																	79

รูปที่ 2.11 ปริมาณกรัมของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต่อสารละลายโปรตีน 1 ลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นอ้อมตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นช่วงต่างๆ ซึ่งเริ่มต้นที่ 0% ของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จนถึง 100% ของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Spadaro และคณะ, 2003)

หลังจากที่ได้โปรตีนที่ตกตะกอนในแต่ละช่วงความเข้มข้นแล้ว ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการดึงเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส (dialysis) โดยหลักการในการแยกเกลือออกจากโปรตีน คือ การแพร่ของสารผ่านเยื่อเลือกผ่าน (semi-permeable membrane) เช่น เยื่อเลือกผ่านชนิดเซลลูโลส (cellulose membrane) ซึ่งเกลือจากบริเวณที่มีความเข้มข้นมากกว่าจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า ซึ่งเกลือภายในถุงไดอะไลซิสจะมีความเข้มข้นมากกว่าภายนอกถุงไดอะไลซิส ดังนั้นเกลือจากภายในถุงไดอะไลซิสจะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อเลือกผ่านออกมาสู่ภายนอกถุงไดอะไลซิส จนกระทั่งความเข้มข้นภายในและภายนอกถุงเท่ากัน ส่วนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่ารูของถุงไดอะไลซิสจะไม่สามารถแพร่ออกมาได้ การไดอะไลซิสจะปฏิบัติที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีการกวนตลอดเวลา เพื่อให้สารละลายบัฟเฟอร์มีความเข้มข้นของเกลือเท่ากันทั้งภาชนะ โดยจะเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 5 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 ครั้ง เมื่อเกลือแพร่ผ่านถุงไดอะไลซิสออกมาในสารละลาย จะส่งผลให้โปรตีนที่อยู่ในถุงไดอะไลซิสไม่มีเกลือเหลืออยู่ (Berg และคณะ, 2002)

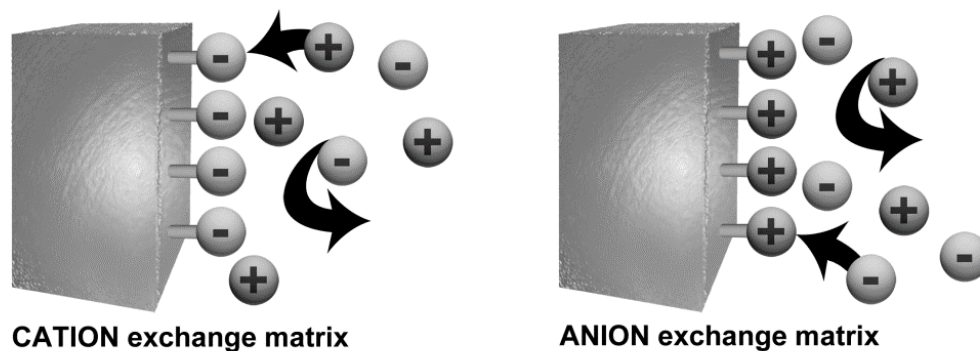
2.8.2 การทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร (ion-exchange chromatography)

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีเป็นวิธีทั่วไปที่มีประโยชน์หลายอย่าง มีความละเอียด และสามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตโปรตีนบริสุทธิ์ในระดับอุตสาหกรรม โดยอาศัยการใช้เทคนิคความแตกต่างของประจุไฟฟ้าของสาร เพื่อแยกสารจำพวกโปรตีน กรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิกออกจากกัน (Jungbauer และ Hahn, 2009) วิธีโครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร (ion-exchange chromatography) เป็นกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เป็นของเหลว (บัฟเฟอร์และตัวอย่างโปรตีน) กับเฟสคงที่ (stationary phase) โดยเฟสคงที่เป็นของแข็งที่ไม่ละลายในตัวทำละลาย ซึ่งเรียกว่า เมทริกซ์ (matrix) มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ (polymer) ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์และถูกเหนี่ยวนำให้ประกอบไปด้วยส่วนที่มีประจุ ดังนั้นจึงเรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchanger) ซึ่งจะมีประจุล้อมรอบบริเวณตัวแลกเปลี่ยนประจุ (counter ion) เพื่อเอาไว้ใช้ในการแลกเปลี่ยนประจุกับโปรตีนตัวอย่าง ซึ่งมีประจุที่ตรงกันข้าม (Bollag, 1994, Berg และคณะ, 2002, Selkirk, 2004)

การแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร จะใช้หลักการการแลกเปลี่ยนไอออนโดยกระบวนการดูดซับบนพื้นผิวแบบย้อนกลับ (reversible ion exchange) ในภาวะสมดุล (equilibrated) เพื่อแลกเปลี่ยนประจุด้วยสารที่เป็นส่วนประกอบในบัฟเฟอร์กับตัวแลกเปลี่ยนประจุ หลังจากเติมโปรตีนที่ต้องการทำบริสุทธิ์ลงในคอลัมน์จะเกิดกระบวนการขึ้นสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเป็นกระบวนการดูดซับสารตัวอย่างบนพื้นผิวของตัวแลกเปลี่ยนประจุ ส่วนสารที่ไม่ถูกดูดซับจะถูกชะออกด้วยบัฟเฟอร์ และขั้นตอนที่สองนั้น โมเลกุลของสารที่ยึดเกาะกับตัวแลกเปลี่ยนประจุจะถูกชะออกจากคอลัมน์ ด้วยอัตราเร็วในการชะที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความแรงของการยึดเหนี่ยวกับประจุของสารแต่ละชนิดกับตัวแลกเปลี่ยนประจุหรือความจำเพาะทางไฟฟ้า เนื่องจากการมีประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงความจำเพาะดังกล่าวได้โดยการเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ซึ่งความแรงของไอออน (ionic strength) ของสารละลายในระบบจะส่งผลให้โปรตีนที่ต้องการถูกแยกออกจากสารละลายโปรตีนผสมได้แม้มีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย (Williams และ Frasca, 2001, Selkirk, 2004, Jungbauer และ Hahn, 2009)

ตัวแลกเปลี่ยนประจุประกอบไปด้วยส่วนสำคัญสองส่วน ได้แก่ ส่วนที่เป็นโครงสร้างที่ทำจากของแข็งที่ไม่ละลายในตัวทำละลาย เป็นพอลิเมอร์ที่มีกลุ่มประจุเชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งเรียกว่า เมทริกซ์ (matrix) และส่วนที่สองเป็นกลุ่มประจุที่ถูกเหนี่ยวนำให้ไปล้อมรอบเมทริกซ์ โดยไป

ทำปฏิกิริยาทางเคมีทำให้บริเวณผิวของเมทริกซ์ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการใช้สำหรับแลกเปลี่ยนประจุ ซึ่งตัวแลกเปลี่ยนประจุ (counter ion) มี 2 ประเภท คือ ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchanger) ที่ใช้สำหรับการทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีประจุบวก และตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger) ที่ใช้สำหรับการทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีประจุลบ (Selkirk, 2004) ดังแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 ลักษณะของตัวแลกเปลี่ยนประจุที่มีประจุลบและประจุล้อมรอบบริเวณตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นประจุบวก เรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (ซ่าย) และลักษณะของตัวแลกเปลี่ยนประจุที่มีประจุบวกและประจุล้อมรอบบริเวณตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นประจุลบ เรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (ขวา) (Domenech และคณะ, 2012)

การเลือกหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ซึ่งจะอยู่ที่บริเวณผิวของตัวแลกเปลี่ยนประจุ จำเป็นที่จะต้องสอดคล้องตามประจุสุทธิของโปรตีนที่ต้องการแยก โดยหมู่ฟังก์ชันที่จะทำให้เกิดความแรงในการจับและแลกเปลี่ยนประจุน้อยนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของหมู่ฟังก์ชัน โดยแบ่งหมู่ฟังก์ชันออกเป็น 2 ประจุ ได้แก่ ตัวแลกเปลี่ยนประจุอย่างแรง (strong ion exchanger) และตัวแลกเปลี่ยนประจุอย่างอ่อน (weak ion exchanger) โดยมีตัวอย่างของหมู่ฟังก์ชันของตัวแลกเปลี่ยนประจุต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีนนั้น ต้องมีความเหมาะสมกับชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุและประจุสุทธิของโปรตีนที่ต้องการทำบริสุทธิ์ โดยตัวอย่างของสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุลบ แสดงไว้ในตารางที่ 2.4 และตัวอย่างของสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุบวกแสดงไว้ในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.3 ชนิดและโครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันของตัวแลกเปลี่ยนประจุ

ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ	หมู่ฟังก์ชัน
Diethylaminoethyl (DEAE), weak	$-OCH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Quaternary ammonium (Q), strong	$-CH_2N^+(CH_3)_3$
Quaternary aminoethyl (QAE), strong	$-OCH_2CH_2N^+(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3$
ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก	หมู่ฟังก์ชัน
Carboxymethyl (CM), weak	$-OCH_2COO^-$
Sulfopropyl (SP), strong	$-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$
Methylsulfonate (S), strong	$-CH_2SO_3^-$

ที่มา : (Amersham, 2002, Selkirk, 2004)

ตารางที่ 2.4 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุลบ

สารละลายบัฟเฟอร์	ประจุลบ	ช่วงค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม
N-methyl piperazine	Cl^-	4.5–5.0
Piperazine	Cl^-	5.0–6.0
L-Histidine	Cl^-	5.5–6.5
Bis-Tris	Cl^-	5.8–6.8
Bis-Tris propane	Cl^-	6.4–7.3
Triethanolamine	Cl^-	7.3–8.2
Tris Cl	Cl^-	7.5–8.0
Diethanolamine	Cl^-	8.4–9.4

ที่มา : (Selkirk, 2004)

ตารางที่ 2.5 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุบวก

สารละลายบัฟเฟอร์	ประจุบวก	ช่วงค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม
Maleic acid	Na ⁺	1.5–2.5
Formic acid	Na ⁺	3.3–4.3
Citric acid	Na ⁺	2.6–6.0
Lactic acid	Na ⁺	3.6–4.3
Acetic acid	Na ⁺	4.3–5.3
MES/NaOH	Na ⁺	5.5–6.7
Phosphate	Na ⁺	6.7–7.7
MOPS	Na ⁺	6.5–7.5
HEPES	Na ⁺	7.5–8.2

ที่มา : (Selkirk, 2004)

2.8.3 การตรวจสอบและการวิเคราะห์โปรตีนบริสุทธิ์เบื้องต้น

การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคการแยกสารและวิเคราะห์โมเลกุลของสารโดยอาศัยหลักการการเคลื่อนที่ผ่านเจลที่มีกระแสไฟฟ้า สารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วตรงข้ามด้วยอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ที่ขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสาร รูปร่าง และขนาดของโมเลกุลของสารนั้น และรวมถึงกระแสไฟฟ้าที่ใช้ โดยจะทราบขนาดโมเลกุลของโปรตีนบริสุทธิ์ที่สนใจเมื่อเปรียบเทียบขนาดโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานที่อยู่ในเจลเดียวกัน (Laemmli, 1970) โปรตีนที่ใช้วิธีนี้ในการตรวจสอบขนาดโมเลกุลจะเสียสภาพเนื่องจากการทำลายโปรตีนด้วยสารโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) ซึ่งเป็นสารที่มีประจุลบ (anionic detergent) โดยจะจับกับโครงสร้างของโปรตีน ทำให้โปรตีนเสียสภาพ เมื่อเติม mercaptoethanol (2-thioethanol) หรือ dithiothreitol ลงไปด้วย จะไปทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่สามารถจับกันเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์ แต่โครงสร้างจะเป็นเส้นตรงเนื่องจากพันธะไดซัลไฟด์ถูกทำลายไป โปรตีนที่ถูกทำให้เสียสภาพเหล่านี้เมื่อนำไปแยกด้วย

กระแสไฟฟ้าแล้ว จะตรวจสอบโดยการนำเจลไปย้อมเพื่อให้ปรากฏแถบสีของโปรตีนด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต หรือการย้อมด้วยสีย้อมคูมมาสซี-บลู (coomassie blue)

2.9 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน

การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนเป็นการใช้เทคนิคจำเพาะในการแยกโปรตีนชนิดต่างๆออกจากรัน โดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน ที่ทำให้ทราบชนิดของโปรตีนเบื้องต้นได้ วิธีการวิเคราะห์มีด้วยกันหลายวิธี เช่น การหาลำดับของกรดอะมิโนด้วยเทคนิค N-terminal sequencing โดยจะวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณปลายด้าน N ของโปรตีนนั้นๆ จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนที่เป็นไปได้โดยเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกันในฐานข้อมูล (Reim และ Speicher, 2001) หรือวิธีที่นิยมคือ การหาลายพิมพ์ของโปรตีน (protein fingerprint) โดยอาศัยการหาขนาดมวลของโปรตีนด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometry, MS) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง ใช้สารในปริมาณน้อยมากในการวิเคราะห์ โดยเครื่องมือชนิดนี้จะมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับหลักการและอุปกรณ์ประกอบ ตัวอย่างเช่น electrospray ionization (ESI), laser desorption/ionization (MALDI), hybrid quadrupole time-of-flight (Q-Q-ToF) และ tandem time-of-flight (ToF-ToF) เป็นต้น (Domon และ Aebersold, 2006, Gibb และ Strimmer, 2017) หลังจากได้ผลการวิเคราะห์แล้วจะนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของโปรตีนต่อไป (McLafferty, 1981)

ในการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยอาศัยแมสสเปกโตรเมทรีนั้น จะนำโปรตีนที่บริสุทธิ์ไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ก่อน เพื่อตัดโปรตีนให้เป็นส่วนเล็กๆก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง จากนั้นจะได้รูปแบบลายพิมพ์เพื่อไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของโปรตีน (Berg และคณะ, 2002) เช่น ฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), ฐานข้อมูล GPMD (Global Proteome Machine database; <http://gpmdb.thegpm.org/>), ฐานข้อมูลมาตรฐานของ Swiss-Prot database (<http://www.uniprot.org/>) หรือฐานข้อมูลมาตรฐานของ Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/>) เป็นต้น ตัวอย่างของโปรแกรมที่ใช้เพื่อวิเคราะห์ข้อมูล เช่น Mascot (<http://www.matrixscience.com/>), X! TANDEM Spectrum Modeler (<http://www.thegpm.org/>), ExPASy Server หรือ BioJava-ModFinder เป็นต้น โดยแต่ละโปรแกรมที่ใช้เพื่อระบุชนิดของโปรตีนที่ต้องการนั้น จำเป็นที่จะต้องกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆในโปรแกรมตามชนิดของโปรตีนที่ต้องการศึกษา (Cottrell และ London, 1999, Gasteiger และคณะ, 2005, Gao และคณะ, 2017a)

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้อรรณ โสวรรณปรีชา (2553) ได้คัดเลือกแบคทีเรียจากทั้งหมด 10 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในกล้วยไม้ 2 ชนิด คือ *C. lunata* และ *C. gloeosporioides* โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ถูกจัดจำแนกได้เป็น *B. subtilis* N3 จากนั้นได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ *B. subtilis* N3 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราทั้ง 2 ชนิดได้ในปริมาณมาก และนำน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* N3 ไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและทำบริสุทธิ์โปรตีน เพื่อหาโปรตีนที่ยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในกล้วยไม้ได้ โดยพบว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้สามารถยับยั้งได้เพียงราชนิดเดียวเท่านั้น คือ *C. lunata* ดังนั้นเพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนดังกล่าว ในงานวิจัยนี้จึงได้ขยายขนาดการผลิตแบคทีเรียเพื่อให้ได้น้ำเลี้ยงเชื้อในปริมาณมาก แล้วนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและทำบริสุทธิ์โปรตีน จากนั้นนำไปศึกษาเพื่อหาชนิดของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* (ต้นและดอกกล้วยไม้) ต่อไป งานวิจัยอีกส่วนหนึ่งได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของพวงรำน้ำที่ก่อโรคในกล้วยไม้ แล้วแปรผันปัจจัยต่างๆสำหรับการเจริญและการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรำน้ำ จากนั้นผลิตสารออกฤทธิ์ในปริมาณมาก แล้วตกตะกอนสารออกฤทธิ์ประเภทโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี ion exchange chromatography และนำไปวิเคราะห์ชนิดของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรำน้ำต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ของบริษัท Whatman International CO., Ltd., England
2. กระจกชนิดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิเมตร และ 5 มิลลิเมตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
3. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (microscope) รุ่น JSM-6610LV ของบริษัท Kyowa, Tokyo, Japan
4. เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA
5. เครื่องแก้วของบริษัท Pyrex, USA
6. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง (sonicator) รุ่น SONOREX RX 100 ของบริษัท Bandelin Electronic, Germany
7. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
8. เครื่องโครมาโทกราฟี รุ่น Bio-Rad Biologic LP และ Bio-Rad model 2110 fraction collector ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
9. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A 200s ของบริษัท Forma Scientific, USA
10. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-G ของบริษัท Metter Toledo, Switzerland
11. เครื่องนาโนดรอป 2000 (Nanodrop 2000 spectrophotometer) ของบริษัท Thermo Scientific, USA
12. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko, Japan
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 200H ของบริษัท Hattich Zentrifugen, Germany
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan

15. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น Allegra 25R ของบริษัท Beckman, Germany
16. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie2) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries instruments, USA
17. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
18. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 ของบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore
19. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic , USA และ รุ่น Perkin Elmer instruments Lambda 25 UV/VIS Spectrometer ของบริษัท Perkin Elmer instruments, USA
20. จานเพาะเลี้ยง (petri dish) ขนาด 90X15 มิลลิเมตร ของบริษัท Hycon plastic, USA ขนาด 65X15 มิลลิเมตร ของบริษัท Bioplast, Austria
21. ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore, USA
22. ชุดอุปกรณ์ทำ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) รุ่น MiniPROTEAN tetra cell, 2-gel system และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น PAC 300 ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
23. ชุดอุปกรณ์ทำอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส ได้แก่ ภาชนะเจล กล่องใส่สารละลาย แผ่นหีและ แหล่งจ่ายไฟ ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan
24. ชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ (gel documentation) และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA
25. ตู้แช่แข็ง (deep freeze) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของบริษัท Sanyo Electronic Co., Japan
26. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น J2-21 ของบริษัท ISSCO, USA
27. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany
28. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert, Germany

29. ถุงไดอะไลซิส SnakeSkin® ขนาดรู 3500 MWCO รุ่น JE123986 ของบริษัท Thermo Scientific, USA
30. ผ้าขาวบางปลอดเชื้อ
31. ไมโครปิเปตต์และทิปรุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 มิลลิลิตร ของบริษัท Nichiryo, Japan
32. หลอดคิวเวตต์ (cuvette) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, USA
33. อุปกรณ์นับเซลล์ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ของบริษัท Schott Duran, Germany
34. Steel Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร



3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จรูป

1. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท Merck, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
3. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Merck, Germany
4. ไกลซีน (glycine) ของบริษัท Amersham Biosciences, Sweden
5. ชุดวัดปริมาณโปรตีน Bio-Rad Protein Assay ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
6. ชุดโปรตีนมาตรฐาน Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder ของบริษัท Thermofisher Scientific, USA
7. ซาฟรานิน โอ (safranin O) ของบริษัท Carlo Erba Reagents, USA
8. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
9. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3$) ของบริษัท Nacalai Tesque, Japan
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
11. ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (DEAE Bio-gel A) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
12. ทริปโตเนน (tryptone) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
13. ทุ-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol) ของบริษัท Sigma, USA
14. นิสทาทีน (nystatin) ของบริษัท Sigma, USA
15. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ของบริษัท Sigma, USA
16. เปปโทน (peptone) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
17. ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
18. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
19. ผงสกัดจากมันฝรั่ง (potato dextrose) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
20. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Productora the Agar SA, Chili
21. ผงบลานอส ซีเอ็มซี (Blanose CMC) ของบริษัท Bronson and Jacobs International, ประเทศไทย

22. สารละลาย Acry/Bis 37.5/1 (30:0.8), 40% (w/v) ของบริษัท Amresco, USA
23. สีย้อมสตีบิลเลียนท์บลู จี-250 (coomassie brilliant blue G-250) ของบริษัท Fluka, Switzerland
24. สีสบอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) ของบริษัท Fluka, Switzerland
25. อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth) ของบริษัท HiMedia Laboratories, India
26. อาหารสำเร็จรูป TSB (Tryptic Soy Broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
27. เอทานอล (ethanol) ของบริษัท J.T. Baker, USA
28. เอทาลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) ของบริษัท Bio Basic, Canada
29. เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium Bromide) ของบริษัท Sigma, USA
30. อะซีโตน (acetone) ของบริษัท Merck, Germany
31. แอมพิซิลลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai Tesque, Japan
32. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ของบริษัท BDH, England
33. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) ของบริษัท Sigma, USA
34. ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2)
35. 1 kb DNA ladder ของบริษัท Fermentas, USA
36. Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1, Saturated with 10mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA ของบริษัท Merck, Germany
37. Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
38. SeaKem[®] LE Agarose For gel electrophoresis ของบริษัท Bio Science Rockland, USA
39. TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) ของบริษัท USB Corporation, UK
40. Trichloroacetic acid (TCA) ของบริษัท Merck, Germany
41. Trizma base (Tris[hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA
42. Tween 20 ของบริษัท Merck, Germany

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยและการเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่พบจากการปนเปื้อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากดินที่จังหวัดกาญจนบุรีโดยคงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549) ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้หลายชนิด ได้แก่ ไอโซเลต M10, M22, M23, M25, M26, M27, N1, N3 และ N9 ถูกเลี้ยงบนอาหารแข็งแข็ง Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วยกลีเซอรอล 15% (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.2 ราที่ก่อโรคพืช

Curvularia lunata ได้มาจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ล้างสปอร์ของราด้วย 0.1% Tween 20 (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น เพื่อแยกเส้นใยออก จากนั้นนับจำนวนสปอร์ของราด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40X และเจือจางสปอร์ของราให้มีจำนวน 2×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสมกับกลีเซอรอล 15% และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Phytophthora palmivora ที่ได้รับมาจากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ถูกเลี้ยงบนอาหารแข็ง V8 (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเททับด้วยกลีเซอรอล 15% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Colletotrichum gloeosporioides, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. periferatum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *Pythium aphanidermatum* ได้มาจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ถูกเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเททับด้วยกลีเซอรอล 15% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 สำหรับแบคทีเรีย

อาหารแข็ง Nutrient Agar (NA), อาหารเหลว Nutrient Broth (NB), อาหารเหลว Luria Bertani Broth (LB) และอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ)

3.4.2 สำหรับรา

อาหารแข็ง PDA และอาหารแข็ง V8

3.5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด

3.5.1 การเตรียมเซลล์ของแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปเขี่ยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต 1 ลูป ถ่ายลงในอาหารเหลว NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และปรับค่าความทึบแสง (optical density, OD) ที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 เพื่อใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายเชื้อจาก 1% ของหัวเชื้อลงในอาหารเหลว NB โดยบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วของการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดสอบ

3.5.2 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย

นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ด้วยชุดกรอง Milipore filter ที่ปราศจากเชื้อ เพื่อเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.3 การเตรียมราก่อโรคพืช

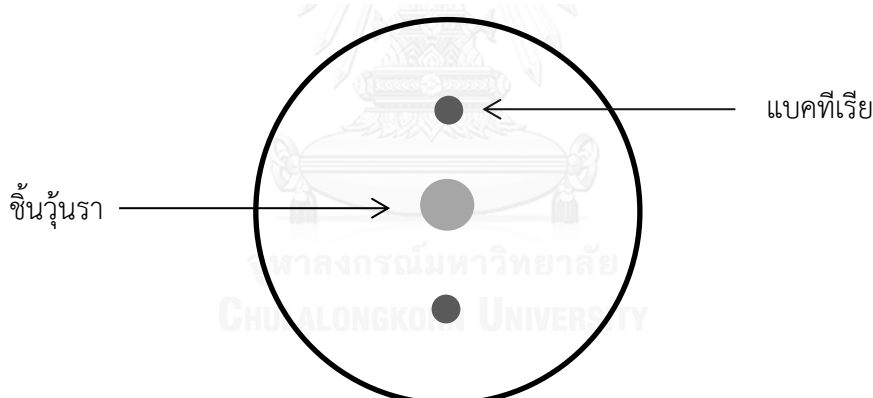
เลี้ยง *P. palmivora* บนอาหารแข็ง V8 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และเลี้ยง *P. aphanidermatum* บนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

3.5.4 การทดสอบเซลล์แบคทีเรียกับราก่อโรคพืช *P. palmivora* และ *P. aphanidermatum* โดยวิธี dual culture (Torres และคณะ, 2017)

นำแบคทีเรียจากข้อ 3.5.1 ปริมาตรเชื้อละ 20 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จำนวนสองตำแหน่ง โดยวาง *P. palmivora* และ *P. aphanidermatum* ที่เลี้ยงตามข้อ 3.5.3 ซึ่งเจาะด้วย steel cork borer เบอร์ 3 ขนาด 8 มิลลิเมตร ที่ปราศจากเชื้อ ไว้ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 และ PDA ตามลำดับ ตามรูปที่ 3.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน วัดการเจริญของราก่อโรคพืชโดยวัดความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางของราที่เจริญ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งไม่มีการลงเชื้อแบคทีเรียบนเพลต โดยทำการทดลองทั้งหมดอย่างน้อย 3 ซ้ำ จากนั้นเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

สูตรคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา (Verma และ Kharwar, 2006):

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา} = \left(1 - \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่เจริญในชุดทดสอบ}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของราที่เจริญในชุดควบคุม}} \right) \times 100$$



รูปที่ 3.1 รูปแบบการลงเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรควิธี dual culture

3.5.5 การทดสอบน้ำเลี้ยงแบคทีเรียกับ *P. palmivora* และ *P. aphanidermatum* โดยวิธี poison food technique (Sriwati และคณะ, 2015)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 สำหรับ *P. palmivora* และ PDA สำหรับ *P. aphanidermatum* ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แช่ไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 55-60 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้อาหารแข็ง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดที่เตรียมตามวิธีข้อ 3.5.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน (อัตราส่วน 1:1) แล้วเทเพลต โดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็ง นำราทั้งสองชนิดที่เตรียมตามข้อ 3.5.3 ที่เจาะด้วย steel cork borer เบอร์ 3 ที่ปราศจากเชื้อ วางไว้ตรงกลางเพลต บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ส่วน

ชุดควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB แทนน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรีย วัดการเจริญของราทั้งสองชนิด โดยวัดความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของรา และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของรา โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยทำการทดลองทั้งหมดอย่างน้อย 3 ซ้ำ

3.6 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราน้ำ

ปัจจัยที่แปรผันเพื่อหาภาวะการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ผลิตสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชมี 4 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิสำหรับการบ่มเชื้อ และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่ให้สารยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด โดยจะใช้น้ำเลี้ยงเชื้อผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยอัตราส่วน 1:9 เพื่อทดสอบในทุกปัจจัยการแปรผัน

3.6.1 การแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อในอาหารเหลว NB โดยมีค่าความทึบแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 จากนั้นใช้ 1% ของหัวเชื้อใส่ลงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ได้แก่ อาหารเหลว Nutrient Broth (NB), อาหารเหลว Luria Bertani Broth (LB) และอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วของการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อของแต่ละอาหารไว้สำหรับทดสอบ โดยนำเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงและกรองแยกเซลล์แบคทีเรียออก นำส่วนน้ำใสไปใช้ในการทดสอบเพื่อหาอาหารที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมของแต่ละอาหารที่ไม่มีแบคทีเรีย ตามวิธีข้อ 3.5.5

3.6.2 การแปรผันความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียเลี้ยงในชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสม เพื่อเลี้ยงเป็นหัวเชื้อ และนำ 1% ของหัวเชื้อใส่ลงในอาหารชนิดเดียวกันที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่างๆ ได้แก่ ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 6, 7, 8 และ 9 บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่ค่าความเป็นกรด-เบส ต่างๆไปปั่นเหวี่ยงและกรองแยกเซลล์แบคทีเรียออก นำส่วนน้ำใสไปใช้ในการทดสอบเพื่อหาค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารยับยั้งการเจริญของรา โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีค่าความเป็นกรด-เบสต่างๆตามวิธีข้อ 3.5.5

3.6.3 การแปรผันอุณหภูมิสำหรับการบ่มแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม เพื่อนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ และนำ 1% ของหัวเชื้อใส่ลงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม เพื่อการแปรผันหาอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งจะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยบ่มแบบเขย่า เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและกรองแยกเซลล์แบคทีเรียออก นำส่วนน้ำใสไปใช้ในการทดสอบเพื่อทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของรา โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ตามวิธีข้อ 3.5.5

3.6.4 การแปรผันระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม และบ่มในอุณหภูมิที่ดีที่สุด โดยบ่มแบบเขย่า เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างไปวัดค่าความทึบแสงที่ 660 นาโนเมตร เพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรีย และนำไปปั่นเหวี่ยงและกรองแยกเซลล์แบคทีเรียออก นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปใช้ในการทดสอบเพื่อหาเวลาที่เชื้อสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ตามวิธีข้อ 3.5.5

3.7 การทดสอบความเสถียรของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรีย

3.7.1 การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบส

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในภาวะที่เหมาะสม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงและกรองแยกเซลล์แบคทีเรียออก นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใสไปปรับค่าความเป็นกรด-เบส ต่างๆ ได้แก่ 2, 4, 6, 8 และ 10 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับค่าความเป็นกรด-เบสกลับมาที่ค่าเริ่มต้น และนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ตามวิธีข้อ 3.5.5

3.7.2 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในภาวะที่เหมาะสม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงและกรองแยกเซลล์แบคทีเรียออก นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใสไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 20, 40, 60, 80, 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นตั้งไว้ให้เย็นเท่ากับอุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ตามวิธีข้อ 3.5.5

3.8 การทำบริสุทธิ์โปรตีนจากแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา

3.8.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ช่วงของความเข้มข้นต่างๆ ทั้งหมด 3 ช่วง คือ 0-40%, 40-80% และ 80-100% โดยมีปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตตามตาราง nomogram (Cutler, 2004) ขณะตกตะกอนจะใส่แอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยๆ พร้อมทั้งกวนเบาๆ เพื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟตละลายได้ดี และจับตัวกับโปรตีนจนเกิดเป็นตะกอนที่สมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นแยกตะกอนโปรตีนที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยปริมาตรน้อยที่สุดของสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5 (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) ส่วนน้ำใสจะนำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงต่อไป ทำเช่นเดียวกันนี้จนครบทุกช่วงของแอมโมเนียมซัลเฟต และสารละลายตะกอนโปรตีนที่ได้จะนำไปจัดเกลือออก โดยนำสารละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ใส่ในถุงไดอะไลซิส (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) แล้วแช่ถุงไดอะไลซินั้นในสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5 ปริมาตร 1 ลิตร โดยมีการกวนเบาๆตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ทุก 5 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง และการจัดเกลือในครั้งที่ 4 จะไดอะไลซิสด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มี 30% กลีเซอรอล (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) ผสมอยู่ เป็นระยะเวลา 4-ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาณของโปรตีนจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องนาโนทรอป แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืช โดยเทคนิค poison food technique ตามวิธีข้อ 3.5.5 โดยใช้อัตราส่วนของสารละลายโปรตีนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 1 ต่อ 19 หรือโดยเทคนิค agar diffusion (Lewinstein และคณะ, 2005) โดยเกลี่ยสปอร์ของราบนอาหารแข็ง (PDA) แล้วเจาะหลุมบนอาหารแข็งด้วย steel cork borer ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร หยดสารละลายโปรตีนหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทั้งหมด 4 หลุม และมีอีก 1 หลุมตรงกลาง เพลตที่ใส่สารเคมีกำจัดรา นิสทาติน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตผลการทดลอง โดยวัดความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยชุดสอบวิเคราะห์สำเร็จรูป Bio-Rad Protein Assay (Bio-rad laboratories, USA) โดยเตรียม dye reagent ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับน้ำปราศจากไอออน

ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ dye reagent ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของโบรินซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ที่ช่วงความเข้มข้น 0.2-1.0 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

3.8.3 การทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีน

การทดสอบแอกทิวิตีของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้นั้น ปฏิบัติตามวิธีที่ปรับปรุงจากวิธีของ Mataragas (Mataragas และคณะ, 2003) โดยนำโปรตีนตัวอย่างมาวัดปริมาณโปรตีนและปรับความเข้มข้นโปรตีนให้เท่ากัน หลังจากนั้นเจือจางความเข้มข้นของโปรตีนแบบลำดับส่วนที่ละสองเท่า และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา ตามวิธีข้อ 3.5.5 ประสิทธิภาพในการยับยั้งราของโปรตีนจะเทียบเป็นค่า Arbitrary Unit (AU) ซึ่ง AU หมายถึง ส่วนกลับของค่าความเจือจางที่สูงที่สุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราต่อโรคพืช แล้วนำค่า AU ที่ได้ไปคำนวณเป็นค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (specific activity) ของโปรตีนเปรียบเทียบกับความเข้มข้นโปรตีน (AU/มิลลิกรัมของโปรตีน) ต่อไป (Barefoot และ Klaenhammer, 1983, Mataragas และคณะ, 2003)

3.8.4 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร

นำโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนในข้อ 3.8.1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร โดยนำเจล DEAE ที่แช่อยู่ใน 20% แอลกอฮอล์ มาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนโดยใช้แท่งแก้วคนเบาๆ แล้วปล่อยให้เจลตกตะกอนเอง เทน้ำส่วนใสและเจลที่ลอยอยู่ด้านบนทิ้ง เนื่องจากเป็นเจลที่เสื่อมสภาพ ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนหลายๆครั้ง จนกระทั่งหมดกลิ่นแอลกอฮอล์ จากนั้นแช่เจลใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5 พร้อมทั้งใช้คลื่นความถี่สูง (sonication) เพื่อกำจัดฟองอากาศออกจากเจล เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วค่อยๆบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร ตั้งคอลัมน์ไว้ข้ามคืน นำสารละลายทั้งหมดที่ใช้สำหรับการทำบริสุทธิ์โปรตีน ซึ่งประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5, 1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5 (ภาคผนวก ข หมายเลข 9), 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำปราศจากไอออน ที่ใช้เพื่อปรับให้เจลและคอลัมน์มีค่าเป็นกลาง ไปกำจัดฟองอากาศออกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ภายใต้ภาวะสุญญากาศ เป็นเวลาประมาณ 45 นาที หรือจนกว่าฟองอากาศจะหมด หลังจากนั้นปรับคอลัมน์ที่มีเจลบรรจุอยู่ให้อยู่ในภาวะสมดุล (equilibrate) โดยผ่าน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5 ปริมาตร 3

เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการใช้ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที่ นำโปรตีนที่ได้จากข้อ 3.8.1 ที่มีแอกทิวิตีในการยับยั้งรา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมลงบนผิวเจล แล้วชะโปรตีนที่ไม่จับกับเจล (unbound fraction) ออก ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5 จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจล (bound fraction) ออกด้วย linear gradient ของ 0-1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5 ตามด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อใช้ล้างเจลไม่ให้เหลือโปรตีนเกาะอยู่อีก และสุดท้ายชะคอลัมน์ด้วยน้ำปราศจากไอออน โปรตีนที่ออกจากคอลัมน์จะถูกเก็บตัวอย่างเป็นลำดับส่วน ส่วนละ 2 มิลลิลิตร และติดตามความเข้มข้นของโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และรวมลำดับส่วนทั้งสองลำดับส่วน ใส่ในถุงไดอะไลซิสขนาด cutoff ที่ 3,500 MW แล้วทำสารละลายโปรตีนให้มีความเข้มข้นมากขึ้นด้วยวิธี aquasorb โดยใช้ผงบลาโนส ซีเอ็มซี เพื่อดึงน้ำออก จากนั้นรวบรวมทุกช่วงของโปรตีนไปขจัดเกลือออกโดยนำถุงไดอะไลซิสที่มีสารละลายโปรตีนแช่ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5 ปริมาตร 1 ลิตร พร้อมทั้งกวนเบาๆตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 5 ชั่วโมง ทั้งหมด 3 ครั้ง ในครั้งที่ 4 ซึ่งเป็นครั้งสุดท้ายจะแช่ถุงไดอะไลซิสใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5 ที่มี 30% กลีเซอรอลผสมอยู่ กวนเบาๆที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนนี้ไปวัดปริมาณโปรตีน ตามวิธีในข้อ 3.8.2 และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา ตามวิธีข้อ 3.5.5 และนำโปรตีนที่อยู่ในช่วงที่มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคในพืชมาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นด้วยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีข้อ 3.8.5

3.8.5 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE

นำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3.8.4 มาหาน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นด้วยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยเริ่มจากการทำความสะอาดแผ่นแก้วขนาด 8.2X10.2 เซนติเมตร และขนาด 7.4X10.2 เซนติเมตร ด้วย 70% แอลกอฮอล์ แล้วนำมาประกบกัน โดยมีช่องว่างระหว่างแผ่นแก้ว 1.5 มิลลิเมตร โดยมีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร แทรกอยู่ระหว่างขอบสองด้านของแผ่นแก้ว จากนั้นประกอบแผ่นแก้วนี้เข้ากับชุดหล่อเจล MiniPROTEAN tetra cell (Bio-Rad Laboratories, USA) แล้วเทสารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12.5% ซึ่งเตรียมตามส่วนประกอบดังนี้

การเตรียมสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล ที่ความเข้มข้น 12.5% โดยส่วนผสมของสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

Acry/Bis 37.5/1 (30:0.8), 40% (w/v) solution	2.400	มิลลิลิตร
1.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH8.8 (ภาคผนวก ข หมายเลข 10)	2.000	มิลลิลิตร
10% SDS (ภาคผนวก ข หมายเลข 11)	0.080	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (ภาคผนวก ข หมายเลข 12)	0.080	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	3.436	มิลลิลิตร

ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกัน อย่าให้เกิดฟอง จากนั้นเติม TEMED 4 ไมโครลิตร เป็นสารสุดท้าย เนื่องจาก TEMED และแอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้เจลแข็งตัวเร็ว ดังนั้นจึงต้องรีบบรรจุสารละลายผสมของเซพาเรติงเจลลงในช่องระหว่างแผ่นแก้วทันที ให้มีความสูงของสารละลายห่างจากปลายช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ประมาณ 5 มิลลิเมตร หลังจากนั้นเติมแอบโซลูทเอทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงบนผิวหน้าเจล เพื่อให้ผิวเจลเรียบและไม่มีฟองอากาศ ตั้งเจลไว้ประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าเจลจะแข็งตัว เทเอทานอลออก แล้วเทสารละลายผสมของสแต็กกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้น 5% ซึ่งเตรียมส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้

Acry/Bis 37.5/1 (30:0.8), 40% (w/v) solution	0.250	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH6.8 (ภาคผนวก ข หมายเลข 13)	1.008	มิลลิลิตร
10% SDS	20	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	20	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออน	0.700	มิลลิลิตร

เติม TEMED 2 ไมโครลิตร เป็นสารสุดท้าย แล้วผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกัน อย่าให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นบรรจุสารละลายผสมของสแต็กกิงเจลลงในช่องว่างที่เหลือระหว่างแผ่นแก้ว วางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่างลงระหว่างแผ่นแก้ว ตั้งไว้ประมาณ 15 นาที หรือจนกระทั่งเจลแข็งตัว นำเจลที่เตรียมแล้วประกอบเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส เติมน้ำสารละลายรันนิ่งบัฟเฟอร์ (running buffer) (ภาคผนวก ข หมายเลข 14) ลงในช่องว่างด้านในจนเต็มและด้านนอกให้มีความสูงตามกำหนด ตั้งแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่างออก เพื่อเตรียมบรรจุโปรตีนตัวอย่าง

การเตรียมโปรตีนสำหรับ SDS-PAGE

1. การเตรียมตัวอย่างโปรตีนมาตรฐาน

ผสมโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง (Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder: Cat. No. 26616, Lithuania) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ 1X SDS sample buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 16) ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร

2. การเตรียมตัวอย่างโปรตีนบริสุทธิ์

นำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3.8.4 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร มาตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย 10% Trichloroacetic acid (TCA) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีน ด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตน นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีน ด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปฏิบัติเช่นนี้เพื่อล้างตะกอนโปรตีน 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ด้วยสารละลายต่างๆดังนี้

4X SDS sample buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 15)	12.5	ไมโครลิตร
β -mercaptoethanol	5.0	ไมโครลิตร
0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์	32.5	ไมโครลิตร

จากนั้นนำสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่เตรียมไว้ทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปบรรจุลงในช่องใส่ตัวอย่างแต่ละช่องของเจลที่เตรียมไว้ ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 200 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 90 นาที เมื่อสีของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนลงมาใกล้ถึงปลายแผ่นเจล นำแผ่นเจลออกจากแผ่นแก้ว แล้วย้อมสีโปรตีนด้วยสีคูมัสซีบลู โดยนำเจลไปแช่ในสารละลายสีย้อมคูมัสซีบลู (Coomassie blue staining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 17) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าเบาๆตลอดเวลา หลังจากนั้นล้างสีย้อมออกด้วยสารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 18) โดยมีการเขย่าเบาๆตลอดเวลา จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ซึ่งครั้งสุดท้ายที่ล้างสีย้อมออกใช้สารละลายสำหรับการตรึง (fix solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 19) แทนสารละลายสำหรับล้างสี จากนั้นประมาณค่าน้ำหนัก

โมเลกุลของโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จากการพิจารณาการเคลื่อนที่ของโปรตีนเปรียบเทียบกับเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

3.9 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา

เมื่อนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชไปผ่านการทำให้ SDS-PAGE เรียบร้อยแล้ว ตัดแถบโปรตีนที่ปรากฏบนเจลใส่งในหลอดไมโครพิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้เจลแห้ง จากนั้นสำหรับโปรตีนบริสุทธิ์ของ *B. subtilis* N3 ส่งวิเคราะห์ด้วยเครื่องแบบ Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry (ESI-Q-TOF MS/MS) และผลที่ได้จากเครื่องนี้จะนำไปวิเคราะห์ลำดับของเพปไทด์และชนิดของโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐานของโปรตีนจาก uniprot ด้วยโปรแกรม Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) ส่วนโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ส่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Q exactive plus hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry ที่ต่อกับ liquid chromatography ผลที่ได้จากเครื่องนี้จะนำไปวิเคราะห์ลำดับของเพปไทด์และชนิดของโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐานของโปรตีนจาก uniprot ด้วยโปรแกรม XI TANDEM Spectrum Modeler (<http://www.thegpm.org>) ซึ่งการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดใช้บริการเครื่องมือที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนจะใช้เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) เพื่อตัดโปรตีนให้มีขนาดสั้นลง และมีค่าพารามิเตอร์ต่างๆดังนี้: carbamidomethyl cysteine สำหรับเป็น fixed modification และ oxidation of methionine เป็น variable modification ส่วน peptide tolerance และ mass tolerances คือ 1.2 Da และ 0.6 Da ตามลำดับ โดยมีเกณฑ์สำคัญในการเลือกคือต้องมีค่านัยสำคัญต่ำกว่า 0.05 ($P < 0.05$) จากนั้นจึงสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้

3.10 การศึกษาอินแฟลกเจลลินในแบคทีเรีย

3.10.1 การสกัดเอ็นเอจากแบคทีเรีย

สกัดเอ็นเอจากแบคทีเรียโดยวิธีของ LMU-Munich (LMU-Munich Team, 2012) โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์มาแขวนลอยในสารละลาย TEN (ภาคผนวก ข หมายเลข 23) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วย้ายสารละลายที่ได้ไปใส่ในหลอดไมโครเซนติพิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมนิวคลีเอซม์ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 24) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และเติม RNase A (ภาคผนวก ข หมายเลข 25) ความเข้มข้น 20

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร, proteinase K ปริมาณเล็กน้อย และสารละลาย TEN* (ภาคผนวก ข หมายเลข 26) ปริมาตร 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติมสารละลาย phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำส่วนน้ำใสย้ายไปใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้นที่เย็น ปริมาตรสองเท่า แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TEN* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรส

3.10.2 การเพิ่มจำนวนยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส

เพิ่มจำนวนยีนแฟลกเจลลินด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ทำนายจากลำดับของยีนนี้ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งประกอบไปด้วยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (5'-gggtattgatccatgagaattaaccacc-3') และรีเวิร์สไพรเมอร์ (-aagggtatccttgcggctgttggtt-3') โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) และเตรียมส่วนประกอบต่างๆที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส ดังนี้

5X Q5 Reaction Buffer	5	ไมโครลิตร
10 μ M forward primer	1.25	ไมโครลิตร
10 μ M reverse primer	1.25	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTPs	2	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้	1	ไมโครลิตร
Q5 [®] High-Fidelity DNA Polymerase	0.25	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากไอออนและปลอดเชื้อ	14.25	ไมโครลิตร

ผสมสารให้เข้ากันเบาๆโดยใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลง และระวังไม่ให้มีฟองอากาศ และสารละลายจะต้องอยู่บนน้ำแข็ง จากนั้นนำหลอดไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ปรับตามโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที	} 30 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 วินาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที	
Extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1.5 นาที	
Final extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 2 นาที	

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ไปตรวจสอบตามข้อ 3.10.3

3.10.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียมเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% โดยซังอะกาโรส แล้วละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข หมายเลข 27) นำเจลที่เตรียมเสร็จแล้วใส่บนเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส (Mupid-2 Advance, Japan) และโหลดดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.10.2 ที่ผสมกับ 6X loading dye และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานเป็น 1 kb ladder (Fermentas, USA) โดยใช้กระแสไฟฟ้าเท่ากับ 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นย้อมเจลที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 28) เป็นเวลา 10 นาที นำเจลที่ได้ไปแช่ในน้ำปราศจากไอออน เพื่อชะเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออก แล้วถ่ายรูปด้วยเจลด้วยโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 (Bio-Rad Laboratories, USA) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้วิธี blastx เพื่อศึกษาความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปลงเป็นลำดับกรดอะมิโนในจุลินทรีย์ต่างๆในฐานข้อมูล

3.11 การศึกษาผลของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการเจริญของเส้นใยของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3.8.4 มาทดสอบกับ *P. palmivora* ตามวิธีในข้อ 3.5.5 โดยใช้อัตราส่วนของโปรตีนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1:19 จากนั้นบ่มเพลตเป็นเวลา 2 วัน นำไปสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) โดยใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมโปรตีน

3.12 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราแบบ *in vitro* และ *in vivo*

3.12.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งรากล่อโรคพืชชนิดต่างๆบนจานเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*)

ก่อนนำแบคทีเรียไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคบนกล้วยไม้ ได้ทดสอบยืนยันความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของราชนิดต่างๆ ทั้งหมด 9 ชนิดอีกครั้งบนจานเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่ผลิตสารยับยั้งราได้ดีที่สุด จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งราโดยเทคนิค poison food technique ตามวิธีข้อ 3.5.5

3.12.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราบนกล้วยไม้ (*in vivo*)

3.12.2.1 กล้วยไม้

ต้นกล้วยไม้ในงานวิจัยนี้จัดซื้อมาจากแหล่งเพาะพันธุ์กล้วยไม้ผ่านกระบวนเพาะงอกแบบปลอดเชื้อ ซึ่งมีกล้วยไม้ 2 สกุล ได้แก่ สกุลช้างกระ (*Rhynchostylis*) และสกุลหวาย (*Dendrobium*) โดยจะนำมาแยกปลูกลงในกระถางขนาด 1 นิ้ว ที่มียมะพร้าวเป็นวัสดุปลูก และเลี้ยงกล้วยไม้ไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้กล้วยไม้ปรับตัวก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

สำหรับดอกกล้วยไม้จัดซื้อจากแหล่งที่มีจำหน่ายทั่วไป ในการทดลองนี้ใช้ดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ซึ่งประกอบด้วยสองพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์สีขาว (5N) และพันธุ์สีชมพู (ซากุระ)

3.12.2.2 การเตรียมรา

เลี้ยงราแต่ละชนิดบนอาหารแข็งที่เหมาะสม เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจะใช้ steel cork borer ขนาด 0.8 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบการเจริญของรา จากนั้นนำส่วนวุ้นที่ติดมาออก นำราครึ่งหนึ่งไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.12.2.3 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวในภาวะที่ผลิตสารยับยั้งราได้ดีที่สุด จากนั้นเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสเช่นเดียวกับข้อ 3.5.2 เพื่อใช้ในการทดสอบ

3.12.2.4 การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียในการยับยั้งการเกิดโรคบนต้นกล้วยไม้

การทดสอบในขั้นนี้นำกล้วยไม้มาทดสอบ ซึ่งแต่ละชุดการทดลองมีจำนวนชำของกล้วยไม้จำนวน 3 กระถาง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ดังนี้

1. ใส่น้ำปลอดเชื้อ เพื่อเป็นชุดควบคุมผลลบ
2. ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย เพื่อทดสอบผลของน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่มีต่อต้นกล้วยไม้
3. ใส่วุ้นแต่ละชนิด (*C. lunata*, *C. gloeosporioides*, *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. periferatum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora*) เพื่อทดสอบการเกิดโรคบนกล้วยไม้โดยราเหล่านี้
4. ใส่วุ้นแต่ละชนิด + น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย โดยจะใส่วุ้นแต่ละชนิดลงบนต้นกล้วยไม้ก่อนเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย เพื่อทดสอบความสามารถในการรักษาโรค (curative)
5. ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย + วัคซีนแต่ละชนิด โดยจะใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสก่อนเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงใส่วุ้นแต่ละชนิด เพื่อทดสอบความสามารถในการป้องกันการเกิดโรค (protective)

จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยไม้ เป็นเวลา 14 วัน และกำหนดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคดังนี้

ดัชนีความรุนแรงในการเกิดโรค:

(2) = กล้วยไม้เจริญปกติ

(1) = กล้วยไม้มีอาการเหี่ยว/ใบมีสีเหลือง

(0) = กล้วยไม้ตาย

3.12.2.5 การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสและของโปรตีนบริสุทธิ์จากแบคทีเรียในการยับยั้งการเกิดโรคบนดอกกล้วยไม้

นำช่อดอกกล้วยไม้มาทำความสะอาดด้วย 70% แอลกอฮอล์ เพื่อไม่ให้มีเชื้ออื่นปนเปื้อน แล้วทำให้ดอกกล้วยไม้เป็นแผลด้วยการใช้เข็ม (needle) สุกิดเบาๆ จากนั้นพ่นสารละลายต่างๆตามชุดการทดลองที่มีทั้งหมด 7 ชุดการทดลอง ได้แก่

1. พ่นด้วยน้ำปลอดเชื้อ เพื่อเป็นชุดควบคุมผลลบ
2. พ่นด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย เพื่อทดสอบผลของน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่มีต่อดอกกล้วยไม้

3. พ่นด้วยสปอร์ของ *C. lunata* จำนวน 2×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อทดสอบการเกิดโรคบนดอกกล้วยไม้โดยรา

4. พ่นด้วยสปอร์ของ *C. lunata* + น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย โดยจะพ่นราลงบนดอกกล้วยไม้ก่อนเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงพ่นด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย เพื่อทดสอบความสามารถในการรักษาโรคโดยน้ำเลี้ยงเชื้อ

5. พ่นด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย + *C. lunata* โดยจะพ่นน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสก่อนเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงพ่นด้วยรา เพื่อทดสอบความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคโดยน้ำเลี้ยงเชื้อ

6. พ่นด้วยสปอร์ของ *C. lunata* + โปรตีนบริสุทธี 20 ไมโครลิตร โดยจะพ่นราลงบนดอกกล้วยไม้ก่อนเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงพ่นด้วยโปรตีนบริสุทธีของแบคทีเรีย เพื่อทดสอบความสามารถในการรักษาโรคโดยโปรตีนบริสุทธี

7. พ่นด้วยโปรตีนบริสุทธี 20 ไมโครลิตร + สปอร์ของ *C. lunata* โดยจะพ่นโปรตีนบริสุทธีของแบคทีเรียก่อนเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงพ่นด้วยรา เพื่อทดสอบความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคโดยโปรตีนบริสุทธี

จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์สีขาว (5N) และพันธุ์สีชมพู (ซากุระ) เป็นเวลา 6 วัน

3.13 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียจากลักษณะโคโลนี, การย้อมสี Gram, รูปร่างของแบคทีเรีย, และการวิเคราะห์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยโปรแกรม Blastn

3.14 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ตัวอย่างเช่น การคำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการทดลองแต่ละขั้นตอน

บทที่ 4

ผลการทดลอง


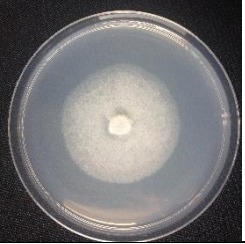
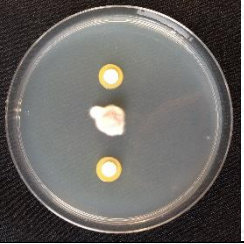
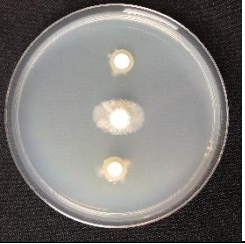




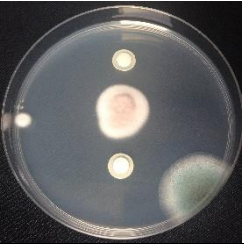
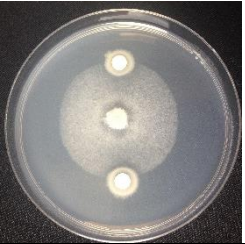
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญของราน้ำโดยใช้เซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียในการทดสอบ


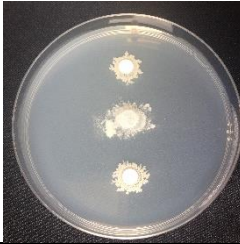


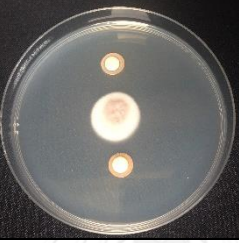
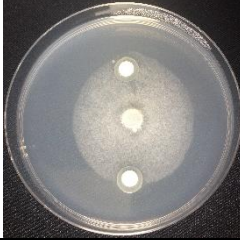






งานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า *Bacillus subtilis* N3 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Curvularia lunata* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในกล้วยไม้ โดยรานี้จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota (รพีวรรณ โสวรรณปรีชา , 2553) สำหรับในงานวิจัยนี้จะหาแบคทีเรียเพิ่มเติมที่สามารถยับยั้งกลุ่มของราน้ำในไฟลัม Heterokontophyta ซึ่งได้แก่ *Phytophthora palmivora* และ *Pythium aphanidermatum* ซึ่งก่อโรคในกล้วยไม้อย่างกว้างขวางเช่นกัน

เพื่อให้ได้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราน้ำ *P. palmivora* และ *P. aphanidermatum* ซึ่งก่อโรคในกล้วยไม้นั้น งานวิจัยนี้ได้นำแบคทีเรีย 10 ชนิดที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้ (คงยุทธ เลิศมงคลธรรม, 2549) มาทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี dual culture เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นการเจริญของราน้ำโดยไม่มีแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า เซลล์แบคทีเรียไอโซเลต M10, M25 และ M27 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. aphanidermatum* ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 57.08% เท่ากันทั้งสามไอโซเลต และเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต N1 และ M26 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. aphanidermatum* เท่ากับ 47.95% เท่ากันทั้งสองไอโซเลต ส่วนเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต M22, N3, RS1, M23 และ N9 มีค่าการยับยั้งการเจริญของ *P. aphanidermatum* เท่ากับ 45.66%, 43.38%, 34.25%, 6.85% และ 0.00% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

สำหรับการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* โดยเซลล์แบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต M10, M22, M27, M25, RS1, N9 และ M23 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ที่ 78.06%, 77.00, 74.89%, 72.78%, 49.58%, 2.11% และ 0.00% ตามลำดับ ส่วนของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต N1, N3 และ M26 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* เท่ากับ 67.51% เท่ากันทั้งสามไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การยับยั้งการเจริญของ *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora* ด้วยเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี dual culture

	<i>P. aphanidermatum</i>			<i>P. palmivora</i>		
	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)	% การยับยั้ง	เฟลตแสดงการยับยั้ง	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)	% การยับยั้ง	เฟลตแสดงการยับยั้ง
ชุดควบคุม	21.9 ± 0.04	0.00		47.4 ± 0.11	0.00	
RS1	14.4 ± 0.04	34.25		23.9 ± 0.11	49.58	
N1	11.4 ± 0.04	47.95		15.4 ± 0.04	67.51	
N3	12.4 ± 0.04	43.38		15.4 ± 0.11	67.51	
N9	21.9 ± 0.06	0.00		46.4 ± 0.04	2.11	




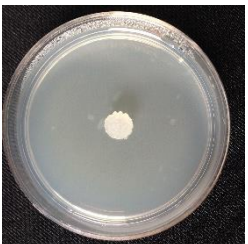



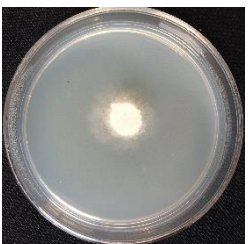
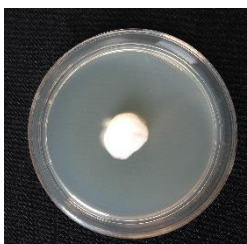
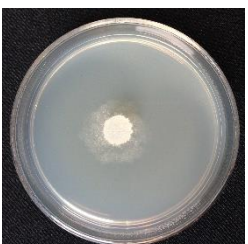
M10	9.4 ± 0.09	57.08		10.4 ± 0.07	78.06	
M22	11.9 ± 0.12	45.66		10.9 ± 0.04	77.00	
M23	20.4 ± 0.08	6.85		47.4 ± 0.07	0.00	
M25	9.4 ± 0.04	57.08		12.9 ± 0.07	72.78	
M26	11.4 ± 0.08	47.95		15.4 ± 0.07	67.51	
M27	9.4 ± 0.04	57.08		11.9 ± 0.07	74.89	


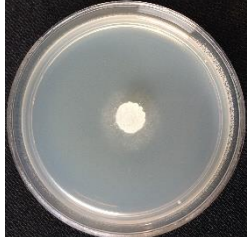
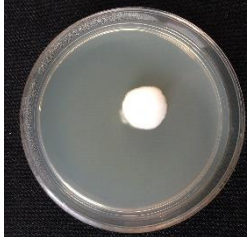
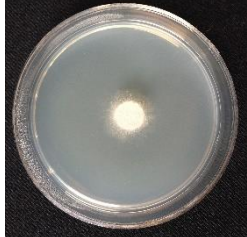



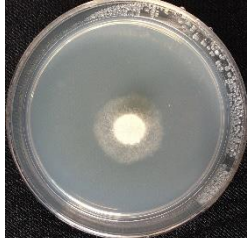

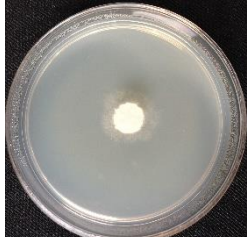

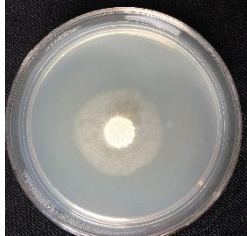
เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจากแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลตไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยวิธี poison food technique โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำเลี้ยงเชื้อส่วน

ใส่ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 1:1 ผลการทดลองพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจากแบคทีเรียไอโซเลต RS1, M10, M23, M25, M26 และ M27 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aphanidermatum* ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเท่ากับ 0.00% ทุกไอโซเลต แต่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจากแบคทีเรียไอโซเลต N3, M22, N1 และ N9 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *P. aphanidermatum* เท่ากับ 30.77%, 23.08%, 15.23% และ 7.69% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4.2

สำหรับการนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจากแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลตไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *P. palmivora* โดยวิธี poison food technique โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 1:1 ผลการทดลองพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจากแบคทีเรียไอโซเลต RS1, M25, M10, M22, M26, N3, N1, N9, M27 และ M23 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ 100%, 68.42%, 52.63%, 52.63%, 47.37%, 44.74%, 42.11%, 23.68% และ 0.00% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จากผลการทดลองนี้ ได้คัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลต RS1 เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป เนื่องจากเป็นแบคทีเรียเพียงไอโซเลตเดียวที่แสดงผลการยับยั้งได้ถึง 100% ต่อ *P. palmivora* ส่วน *P. aphanidermatum* นั้น ยังไม่มีแบคทีเรียไอโซเลตใดที่ให้ผลการยับยั้งที่สูงเพียงพอ จึงยังไม่ได้นำมาศึกษาต่อในงานวิจัยนี้

ตารางที่ 4.2 การยับยั้งการเจริญของ *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียในอัตราส่วน 1:1 โดยวิธี poison food technique

	<i>P. aphanidermatum</i>			<i>P. palmivora</i>		
	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)	% การยับยั้ง	เพลตแสดงการยับยั้ง	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)	% การยับยั้ง	เพลตแสดงการยับยั้ง
ชุดควบคุม*	0.65 ± 0.04	0.00		1.90 ± 0.11	0.00	
RS1	0.65 ± 0.07	0.00		0.00 ± 0.00	100.00	
N1	0.55 ± 0.04	15.38		1.10 ± 0.04	42.11	
N3	0.45 ± 0.07	30.77		1.05 ± 0.07	44.74	
N9	0.60 ± 0.11	7.69		1.10 ± 0.04	42.11	

M10	0.65 ± 0.07	0.00		0.90 ± 0.07	52.63	
M22	0.50 ± 0.04	23.08		0.90 ± 0.04	52.63	
M23	0.65 ± 0.04	0.00		1.90 ± 0.07	0.00	
M25	0.65 ± 0.07	0.00		0.60 ± 0.04	68.42	
M26	0.65 ± 0.04	0.00		1.00 ± 0.04	47.37	
M27	0.65 ± 0.04	0.00		1.45 ± 0.04	23.68	

* ชุดควบคุมคือ อาหารที่ไม่ได้ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย

4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora*



เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* นั้น ได้แปรผันปัจจัยที่สำคัญ 4 ปัจจัย ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ, ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ และระยะเวลาที่เชื้อสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด

4.2.1 การแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่เจริญในอาหารแต่ละชนิด ซึ่งได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ NB, LB และ TSB มาผสมกับอาหารแข็ง V8 ด้วยอัตราส่วน 1:9 แล้วทดสอบต่อการเจริญของ *P. palmivora* ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียไอโซเลต RS1 สามารถเจริญได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB, LB และ TSB โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียไอโซเลต RS1 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากที่สุด ได้แก่ อาหารเหลว LB (53.33%) รองลงมา ได้แก่ อาหารเหลว NB (29.03%) และแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยที่สุด ได้แก่ อาหารเหลว TSB (13.33%) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้อาหารเหลวแต่ละชนิดแทนน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ดังนั้นจึงเลือกเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในอาหารเหลว LB เพื่อใช้ในการทดลองแปรผันปัจจัยความเป็นกรด-เบสต่อไป

ตารางที่ 4.3 การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)	% การยับยั้ง	เพลตแสดงการยับยั้ง
ชุดควบคุม* (NB)	1.55 ± 0.11	0.00	
NB	1.1 ± 0.07	29.03	

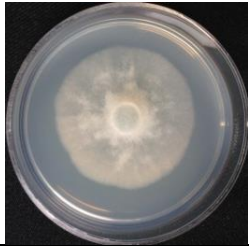

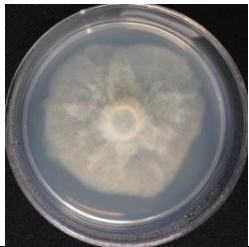
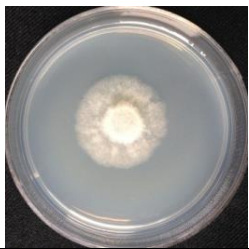

ชุดควบคุม* (LB)	1.5 ± 0.07	0.00	
LB	0.7 ± 0.07	53.33	
ชุดควบคุม* (TSB)	1.5 ± 0.04	0.00	
TSB	1.3 ± 0.08	13.33	

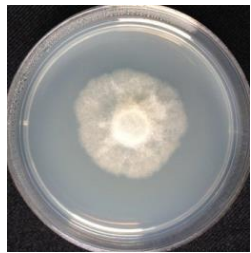


* ชุดควบคุมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆที่ไม่มีแบคทีเรีย

4.2.2 การแปรผันความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลต RS1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่แปรผันความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่า pH6, pH7, pH8 และ pH9 แล้วผสมกับอาหาร V8 ด้วยอัตราส่วน 1:9 จากนั้นทดสอบต่อการเจริญของ *P. palmivora* เป็นเวลา 4 วัน ผลการทดลองพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจากแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงที่ pH ต่างๆให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* จากมากที่สุดไปหาน้อยที่สุดดังนี้ pH7, pH6, pH8 และ pH9 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* เท่ากับ 52.63%, 48.57%, 32.35% และ 22.58% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH ต่างๆดังแสดงในตารางที่ 4.4 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในอาหารเหลว LB ที่ pH7 เพื่อใช้ในการทดลองแปรผันอุณหภูมิสำหรับการบ่มแบคทีเรียต่อไป

ตารางที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ความเป็นกรด-เบสต่างๆ

ความเป็นกรด-เบส ของ LB	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี (มิลลิเมตร)	% การยับยั้ง	เพลตแสดงการยับยั้ง
ชุดควบคุม* (pH 6)	1.75 ± 0.07	0.00	
pH 6	0.9 ± 0.07	48.57	
ชุดควบคุม* (pH 7)	1.9 ± 0.07	0.00	
pH 7	0.9 ± 0.07	52.63	
ชุดควบคุม* (pH 8)	1.7 ± 0.07	0.00	





pH 8	1.15 ± 0.07	32.35	
ชุดควบคุม* (pH 9)	1.55 ± 0.11	0.00	
pH 9	1.2 ± 0.04	22.58	

* ชุดควบคุมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่ความเป็นกรด-เบสต่างๆที่ไม่มีแบคทีเรีย

4.2.3 การแปรผันอุณหภูมิสำหรับการบ่มแบคทีเรียไอโซเลต RS1

เพื่อหาอุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1 เพื่อให้ผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ดีที่สุด ได้เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB ที่ pH7 โดยมีการแปรผันอุณหภูมิในการบ่มที่ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสผสมกับอาหาร V8 ด้วยอัตราส่วน 1:9 เพื่อใช้ในการทดสอบกับรา ผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1 คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รองลงมา คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส โดยแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 54.84%, 41.94% และ 35.48% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งก็คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่ pH7 ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงเลือกอุณหภูมิสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในอาหารเหลว LB pH7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปหาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ดีที่สุดในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.5 การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB pH7 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี (มิลลิเมตร)	% การยับยั้ง	เพลตแสดงการยับยั้ง
ชุดควบคุม*	1.55 ± 0.07	0.00	
30 องศาเซลเซียส	0.9 ± 0.07	41.94	
37 องศาเซลเซียส	0.7 ± 0.07	54.84	
40 องศาเซลเซียส	1.0 ± 0.07	35.48	

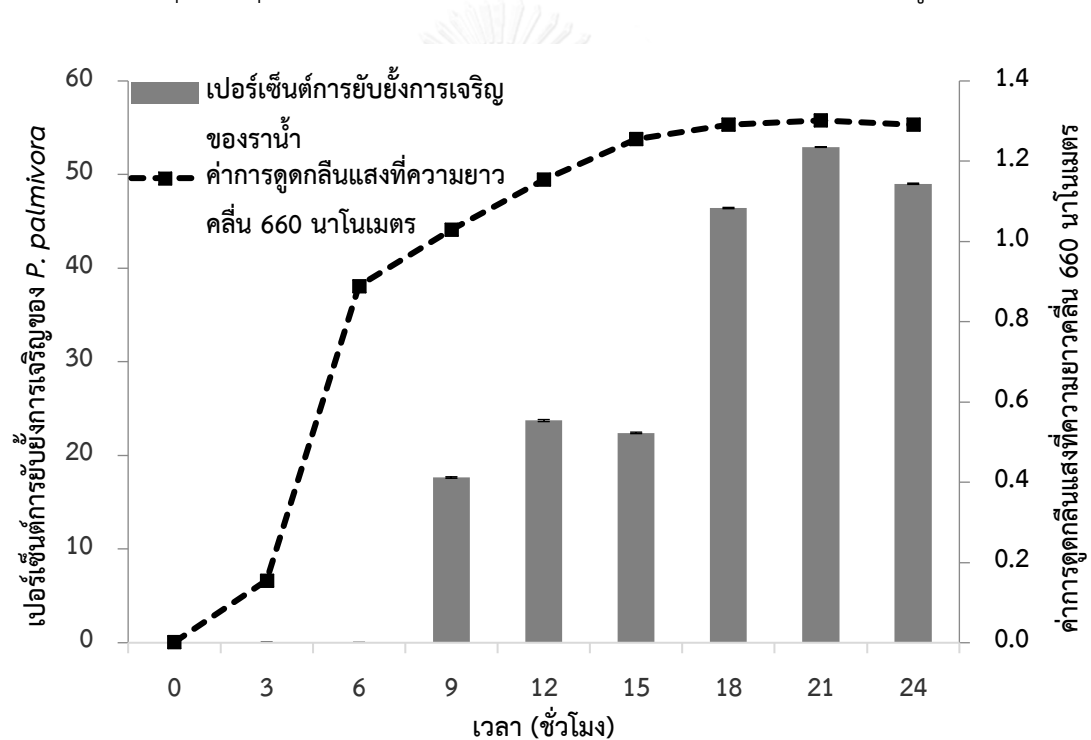
* ชุดควบคุมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB, pH7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.2.4 การแปรผันระยะเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1

การทดลองนี้ได้เลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในอาหารเหลว LB pH7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *P. palmivora* ที่แต่ละช่วงเวลาดังกล่าว โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง V8 ในอัตราส่วนเท่ากับ 1:9 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.1 ซึ่ง

พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต RS1 มีการเจริญเข้าสู่ lag phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-3 และเข้าสู่ระยะ logarithmic phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3-18 และเข้าสู่ช่วง stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 เป็นต้นไป

ในด้านการยับยั้งรา พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต RS1 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 เป็นต้นไป ซึ่งเป็นช่วงที่แบคทีเรียไอโซเลต RS1 เจริญอยู่ในระยะ late logarithmic phase ดังนั้นจึงจัดว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งราที่แบคทีเรียผลิตขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ประเภท non-growth associate โดยแบคทีเรียไอโซเลต RS1 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ดีที่สุดที่ ชั่วโมงที่ 21 ซึ่งมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 52.94% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *P. palmivora* และการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3 การทดสอบความเสถียรของสารยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลต RS1

4.3.1 การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจากแบคทีเรียไอโซเลต RS1

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสไปปรับค่าความเป็นกรด-เบส ที่ pH2, pH4, pH6, pH8 และ pH10 เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสไปผสมกับอาหาร V8 ด้วยอัตราส่วน 1:9 เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* นั้น ผลการทดลองพบว่า สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราน้ำสามารถทนความเป็นกรด-เบส ได้เพียงเล็กน้อย โดยแสดงผลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราน้ำ ที่ pH2, pH4, pH6, pH8 และ pH10 มีค่าเท่ากับ 10.87%, 19.57%, 21.74%, 26.09% และ 21.74% ตามลำดับ และค่าความเป็นกรด-เบสที่สารออกฤทธิ์ในน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ยังสามารถแสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดอยู่ในช่วงที่เป็นกลาง (ที่ pH8) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 26.09% และเมื่อยิ่งเพิ่มความเป็นกรดหรือเบสของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสมากขึ้น จะมีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความเสถียรของสารยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ในน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่ค่าความเป็นกรด-เบส ต่างๆ

ความเป็นกรด-เบส	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)	% การยับยั้ง
ชุดควบคุม*	2.30 ± 0.14	0.00
pH2	2.05 ± 0.07	10.87
pH4	1.85 ± 0.07	19.57
pH6	1.80 ± 0.00	21.74
pH8	1.70 ± 0.14	26.09
pH10	1.80 ± 0.14	21.74

* ชุดควบคุมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB, pH7

4.3.2 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจากแบคทีเรียไอโซเลต RS1

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นตั้งไว้จนเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* แล้ว ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.7 ซึ่งพบว่าหลังจากบ่มน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 20 องศาเซลเซียส, 40 องศาเซลเซียส, 60 องศาเซลเซียส, 80 องศาเซลเซียส, 100 องศาเซลเซียส และ 121 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเท่ากับ 30.43%, 33.70%, 23.91%, 23.91%, 23.91% และ 2.17% ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* มีประสิทธิภาพดี เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 20-40 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราลดลง โดยเฉพาะเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการยับยั้งราจะลดลงจนเหลือเพียง 2.17% ซึ่งแสดงว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ไม่สามารถทนความร้อนได้ (heat labile)

ตารางที่ 4.7 ความเสถียรของสารยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ในน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)	% การยับยั้ง
ชุดควบคุม*	2.30 ± 0.14	0.00
20 องศาเซลเซียส	1.60 ± 0.07	30.43
40 องศาเซลเซียส	1.53 ± 0.04	33.70
60 องศาเซลเซียส	1.75 ± 0.35	23.91
80 องศาเซลเซียส	1.75 ± 0.07	23.91
100 องศาเซลเซียส	1.75 ± 0.00	23.91
121 องศาเซลเซียส	2.25 ± 0.21	2.17

* ชุดควบคุมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB, pH7 บ่มที่อุณหภูมิห้อง

4.4 การทำบริสุทธิ์โปรตีนจาก *B. subtilis* N3 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* และจากแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora*

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานไว้ว่า *B. subtilis* N3 สามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในกล้วยไม้ได้ โดยพบว่าโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราตกตะกอนได้ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-80% (รพีวรรณ โสวรรณปรีชา, 2553) ในงานวิจัยนี้ได้เลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ในภาวะที่เหมาะสมตามงานวิจัยก่อนหน้า (รพีวรรณ โสวรรณปรีชา, 2553) และขยายขนาดเพื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ให้มีปริมาณของสารละลายโปรตีนมากพอที่จะนำไปทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร (ion exchange chromatography) เพื่อที่จะนำไปศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป

สำหรับแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* นั้น เพื่อหาโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราดังกล่าว ได้เลี้ยงแบคทีเรียในภาวะที่เหมาะสม และขยายขนาดเพื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และทำให้โปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรามีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสารเช่นกัน

4.4.1 การทำบริสุทธิ์โปรตีนจากแบคทีเรียไอโซเลต RS1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora*

4.4.1.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

งานวิจัยนี้ได้เลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในภาวะที่เหมาะสม และนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงต่างๆ ได้แก่ 0-40%, 40-80% และ 80-100% เพื่อสังเกตว่าสารละลายโปรตีนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตใดที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ดีที่สุด เมื่อผสมสารละลายโปรตีนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆ กับอาหาร V8 ด้วยอัตราส่วน 1:19 โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้สารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5 แทนสารละลายโปรตีนในแต่ละช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตนั้น ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.8 ซึ่งผลการทดลองพบว่า สารละลายโปรตีนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-40% และ 80-100% แสดงผลการยับยั้งการเจริญของราได้เพียงเล็กน้อย ขณะที่สารละลายโปรตีนในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 40-80% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด โดยแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* เท่ากับ 100.00%

ตารางที่ 4.8 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ด้วยสารละลายโปรตีนของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆ

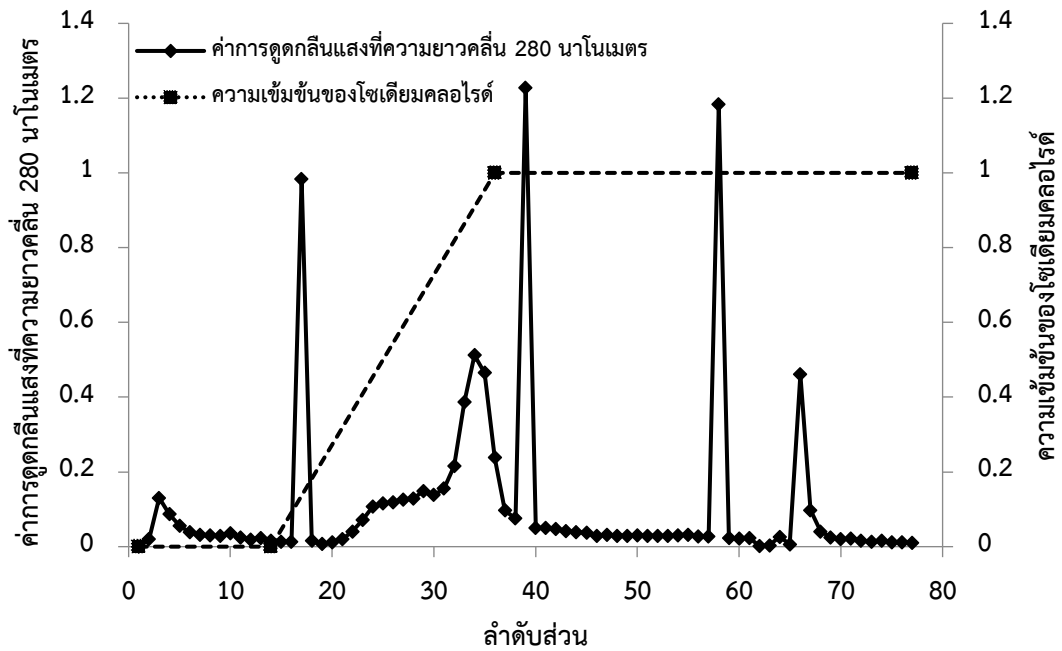
ความเข้มข้นของ (NH ₄) ₂ SO ₄	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี (มิลลิเมตร)	% การยับยั้ง	เฟลตแสดงการยับยั้ง
ชุดควบคุม	2.6 ± 0.04	0.00	
0-40%	2.5 ± 0.07	3.85	
40-80%	0.00 ± 0.00	100.00	
80-100%	2.6 ± 0.04	0.00	

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีของน้ำเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ซึ่งเลี้ยงในอาหารปริมาตร 5,000 มิลลิลิตร พบว่า มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 360 มิลลิกรัม, มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 22.22 AU ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 8,000 AU จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 40-80% ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่พบว่าโปรตีนมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ดีที่สุด จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีของสารละลายโปรตีนที่ได้ พบว่าสารละลายโปรตีนที่ได้

จากช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 40-80% มีปริมาตร 24 มิลลิลิตร, มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 17.232 มิลลิกรัม, มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 22.28 AU ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และมีแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 384 AU ดังแสดงในตารางที่ 4.10 สารละลายโปรตีนช่วงความเข้มข้นที่ 40-80% ของแอมโมเนียมซัลเฟตทั้งจาก *B. subtilis* N3 และแบคทีเรียไฮโซเลต RS1 ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร

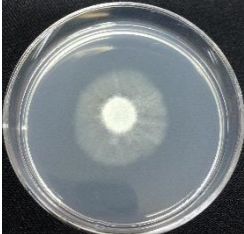
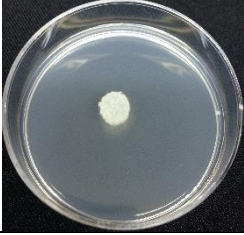
4.4.1.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร

เมื่อนำโปรตีนไปผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร และชะโปรตีนด้วยเกรเดียนต์ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 แล้วติดตามปริมาณโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ในทุกลำดับส่วน และนำแต่ละช่วงลำดับส่วนของโปรตีนมาผสมรวมกัน โดยจับเป็นคู่ๆ เช่น 1-2, 3-4, 5-6, ..., และ 77-78 ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ด้วยวิธี poison food technique ผลการทดลองจากรูปที่ 4.2 พบว่า สารละลายโปรตีนที่อยู่ในช่วงลำดับส่วนที่ 9-10 และ 33-34 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* เท่ากับ 75.00% และ 82.35% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้สารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5 แทนสารละลายโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 4.9



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ในแต่ละลำดับส่วนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ของแบคทีเรีย *ไอโซเลต RS1*

ตารางที่ 4.9 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ด้วยสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ในช่วงลำดับส่วนที่ 9-10 และ 33-34

ตัวอย่าง	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)	% การยับยั้ง	เฟลตแสดงการยับยั้ง
ชุดควบคุม	1.70 ± 0.14	0.00%	
DEAE Bio-gel A ลำดับส่วนที่ 9-10	0.43 ± 0.04	75.00%	
DEAE Bio-gel A ลำดับส่วนที่ 33-34	0.30 ± 0.00	82.35%	

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของลำดับส่วนที่ 9-10 และ 33-34 พบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 0.0336 และ 0.432 มิลลิกรัม ตามลำดับ และเมื่อทดสอบแอกทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ด้วยโปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A พบว่ามีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 250.00 และ 37.04 AU ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ตามลำดับ และแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 8.40 และ 16.00 AU ดังแสดงในตารางที่ 4.10 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A มีโปรตีนบริสุทธิ์จากช่วงของลำดับส่วนที่ 9-10 และ 33-34 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้

ตารางที่ 4.10 ค่าต่างๆหลังจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีของแบคทีเรียโอโซเลต RS1 ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora*

ตัวอย่าง	ปริมาณ (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตี (AU ต่อ มิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (AU ต่อ มิลลิกรัม ของโปรตีน)	แอกทิวิตีรวม (AU)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารสกัดโปรตีนเริ่มต้น	5,000.00	72.00	360.00	1.60	22.22	8,000.00	1.00
สารละลายโปรตีนช่วงแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80%	24.00	718.00	17.232	16.00	22.28	384.00	1.00
DEAE Bio-gel A ลำดับส่วน 9-10	4.20	8.00	0.0336	2.00	250.00	8.40	11.25
DEAE Bio-gel A ลำดับส่วนที่ 33-34	4.00	108.00	0.432	4.00	37.04	16.00	1.67

4.4.2 การทำให้บริสุทธิ์โปรตีนจาก *B. subtilis* N3 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. lunata*

4.4.2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

หลังจากเลี้ยง *B. subtilis* N3 ในภาวะที่เหมาะสม โดยมีปริมาตรเริ่มต้นรวมที่ 13,000 มิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีการยับยั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 163,540 มิลลิกรัม, มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 12.72 AU ต่อ มิลลิกรัมของโปรตีน และแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 2,080,228 AU เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 40-80% ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่พบว่าโปรตีนมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้สูงที่สุด (รพีวรรณ ไสวรรณปรีชา, 2553) แล้ววิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอกทิวิตีการยับยั้ง พบว่ามีปริมาตรของสารละลายโปรตีนช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 40-80% เท่ากับ 46 มิลลิลิตร, ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1,868.98

มิลลิกรัม, มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 504.06 AU ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 942,078 AU ดังแสดงในตารางที่ 4.11

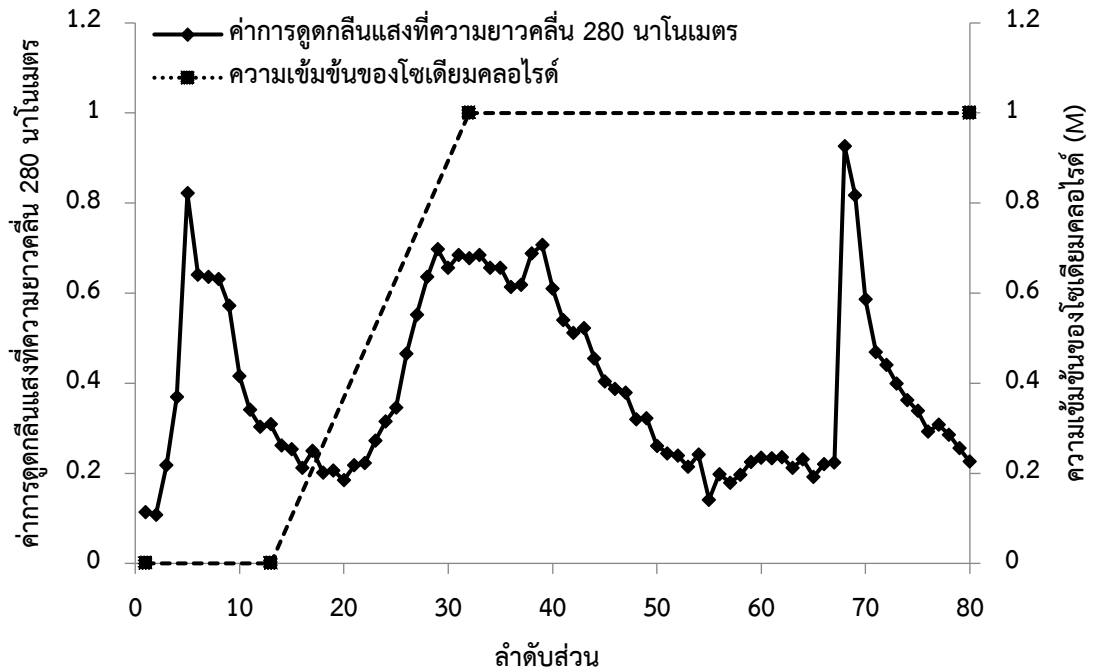
ตารางที่ 4.11 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีจากน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3

ตัวอย่างที่ทดสอบ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตี (AU ต่อ มิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (AU ต่อ มิลลิกรัมของโปรตีน)	แอกทิวิตีรวม (AU)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส	13,000.00	12.58	163,540.00	160.00	12.72	2,080,228.00	1.00
สารละลายโปรตีนช่วงแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80%	46.00	40.63	1,868.98	20,480.00	504.06	942,078.00	39.63
DEAE Bio-gel A ลำดับส่วนที่ 51-60	3.32	0.42	1.28	3,200.00	7,710.84	9,854.46	606.20

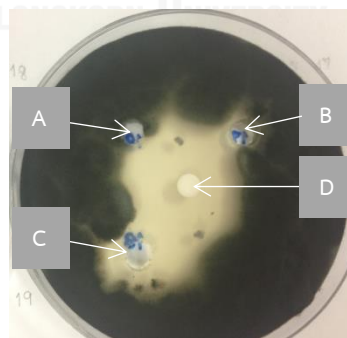
4.4.2.2 การทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของสาร

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.3 พบว่าสามารถติดตามปริมาณโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ในทุกลำดับส่วน โดยโปรตีนจะถูกชะด้วยเกรเดียนต์ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 และช่วงของโปรตีนจะถูกนำมาผสมรวมกัน โดยรวมลำดับส่วนดังนี้ 1-10, 11-20, 21-30, 41-50, 51-60, 61-70 และ 71-80 จากนั้นนำแต่ละช่วงลำดับส่วนที่ผสมรวมกันไปทดสอบด้วยวิธี agar diffusion เพื่อสังเกตหาช่วงลำดับส่วนที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ดีที่สุด ซึ่งพบว่าสารละลายโปรตีนที่อยู่ในช่วงลำดับส่วนที่ 51-60 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ดีที่สุด โดยมีความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 5 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของลำดับส่วนที่ 51-60 พบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1.28 มิลลิกรัม และเมื่อตรวจสอบแอกทิวิตีในการยับยั้ง *C. lunata* จากโปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่ามีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 7,710.84 AU ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และแอกทิวิตีรวมทั้งหมด 9,854.46 AU ดังแสดงในตารางที่ 4.11 ข้างต้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์

โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A มีโปรตีนจากช่วงของลำดับส่วนที่ 51-60 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตด 1 โมลาร์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH7.5 ในแต่ละลำดับส่วนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ของเชื้อ *B. subtilis* N3

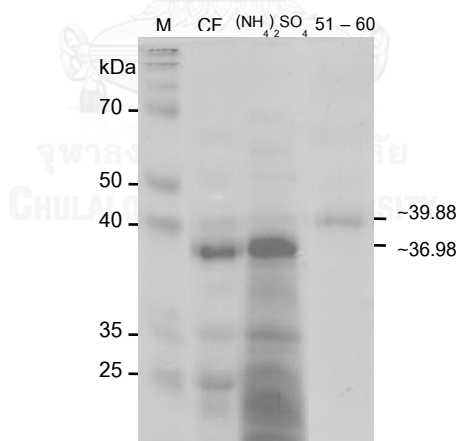


รูปที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* โดยสารละลายโปรตีนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงของลำดับส่วนที่ 41-50 (A), 21-30 (B) และ 51-60 (C) ชุดควบคุมคือ นิสทาทิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (D)

4.4.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก *B. subtilis* N3 และแบคทีเรียไฮโซเลต RS1 ด้วยวิธี SDS-PAGE

4.4.3.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก *B. subtilis* N3

เมื่อนำโปรตีนจากส่วนน้ำใสของ *B. subtilis* N3 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ประมาณ 251.6 ไมโครกรัม, โปรตีนจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-80% ประมาณ 812.6 ไมโครกรัม และโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์จากการผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงลำดับส่วนที่ 51-60 ประมาณ 84 ไมโครกรัม มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง (Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder: Cat. No. 26616, Lithuania) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งพบว่า โปรตีนจากส่วนน้ำใสและโปรตีนที่ตกตะกอนได้จากแอมโมเนียมซัลเฟตปรากฏแถบโปรตีนเป็นจำนวนมาก และมีรูปแบบแถบของโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกัน หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A (ลำดับส่วนที่ 51-60) แล้ว ปรากฏจำนวนแถบโปรตีนลดลงเหลือเพียงแถบเดียวเท่านั้น เมื่อวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) กับระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนช่วงลำดับส่วนที่ 51-60 บน SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 39.88 kDa



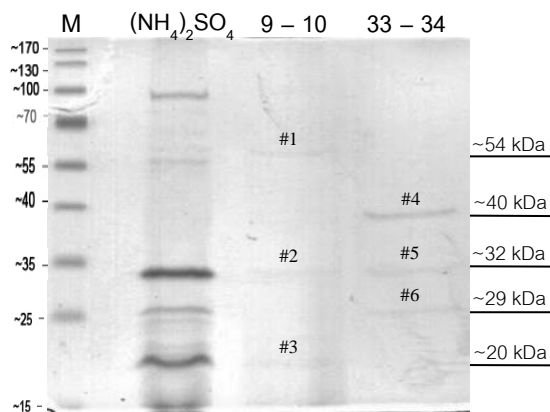
รูปที่ 4.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนจาก *B. subtilis* N3 โดยวิธี SDS-PAGE;

M	โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง (kDa)
CF	ส่วนน้ำใสของ <i>B. subtilis</i> N3 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ <i>C. lunata</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄	โปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 40-80%
51-60	โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงลำดับส่วนที่ 51-60

4.4.3.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลเบื้องต้นของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จากแบคทีเรียไอโซเลต

RS1

สำหรับการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์จากแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ด้วยวิธี SDS-PAGE นั้น เป็นการเปรียบเทียบผลระหว่างสารละลายโปรตีนจากช่วงต่างๆ ได้แก่ โปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 40-80% ที่มีโปรตีนประมาณ 71.8 ไมโครกรัม, และโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์จากการผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงลำดับส่วนที่ 9-10 และ 33-34 ที่มีโปรตีนประมาณ 3.2 และ 43.2 ไมโครกรัมตามลำดับ ผลการทดลองจากรูปที่ 4.6 พบว่า โปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ปรากฏแถบโปรตีนเป็นจำนวนมาก และเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A จะเห็นว่าโปรตีนในช่วงลำดับส่วนที่ 9-10 และ 33-34 มีจำนวนของแถบโปรตีนลดลง เมื่อวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ค หมายเลข 3) กับระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนช่วงลำดับส่วนที่ 9-10 และ 33-34 บน SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนจากช่วงลำดับส่วนที่ 9-10 ปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 54 kDa, 32 kDa และ 20 kDa ดังแสดงในรูปที่ 4.6, #1 – #3 ตามลำดับ ส่วนแถบโปรตีนจากช่วงลำดับส่วนที่ 33-34 ปรากฏแถบโปรตีน 3 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40, 32 และ 29 kDa ดังแสดงในรูปที่ 4.6, #4 – #6 ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนจากแบคทีเรียไอโซเลต RS1 โดยวิธี SDS-PAGE;

M	โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง (kDa)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	โปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 40-80%
9-10	โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงลำดับส่วนที่ 9-10
33-34	โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ในช่วงลำดับส่วนที่ 33-34

4.5 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา

เพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก *B. subtilis* N3 ได้ตัดแถบโปรตีนขนาดประมาณ 39.88 kDa ที่ปรากฏบนเจล SDS-PAGE (รูปที่ 4.5) ส่งไปวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง ESI-Q-TOF MS/MS โดยใช้บริการเครื่องมือที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จากแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ได้ตัดแถบโปรตีน #1 – #6 ที่ปรากฏบนเจล SDS-PAGE (รูปที่ 19) ส่งไปวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง ESI-Q-TOF MS/MS โดยใช้บริการเครื่องมือที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเช่นกัน

สำหรับรูปแบบลายพิมพ์ของโปรตีนขนาดประมาณ 39.88 kDa จาก *B. subtilis* N3 ได้นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐานของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์โปรตีน Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่า แถบของโปรตีนที่ได้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนคล้ายแฟลกเจลลิน (flagellin-like protein) มากถึง 69%

ของการครอบคลุมของลำดับโปรตีน (protein sequence coverage) ของกลุ่ม *Bacillus subtilis* (gi|5497830040) ดังแสดงในรูปที่ 4.7

Protein View: gi|549783040

MULTISPECIES: flagellin A [*Bacillus subtilis* group]

Database: NCBI nr
Score: 981
Nominal mass (M_r): 35431
Calculated pI: 4.95
Taxonomy:

This protein sequence matches the following other entries:

- [gi|549063354](#) (no taxonomy information for this entry)
- [gi|700311071](#) (no taxonomy information for this entry)
- [gi|916373716](#) (no taxonomy information for this entry)
- [gi|959994867](#) (no taxonomy information for this entry)
- [gi|959997288](#) (no taxonomy information for this entry)
- [gi|959999990](#) (no taxonomy information for this entry)
- [gi|1007410852](#) (no taxonomy information for this entry)
- [gi|1039352082](#) (no taxonomy information for this entry)
- [gi|1044623942](#) (no taxonomy information for this entry)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|549783040 against nr](#).

Search parameters

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: **Carbamidomethyl (C)**
Variable modifications: **Oxidation (M)**

Protein sequence coverage: 69%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MRINHNIAAL NTSRQLNAGS NSAAKNMEKL SSGLRINRAG DDAAGLAISE
51 KMRSQIRGLD MASKNAQDGI SLIQTSEGal NETHSILQRM SELATQAAND
101 TNTDSRSEL QKEMDQLSSE VTRISTDTEF NTKKLLDGTa KDLTFQIGAN
151 EGQTMTLSIN KMDSESLKVG TTYTAQADGT LKSGDGNSTA TWADEEVTDG
201 KVTKEAGYYD DKGALVGSEK LEEGEKLSKG IDISSAKAA SSALTTIKTA
251 IDTVSSERAK LGAVQNRLEH TINNLGTSSE NLTSAESRIR DVDMASEMME
301 YTKNNILTQA SQAMLAQANQ QPQVLQLLK G

```

รูปที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์โปรตีนที่ได้จากแถบโปรตีนขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 39.88 kDa ของ *B. subtilis* N3 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Mascot โดยลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกับโปรตีนคล้ายแฟลกเจลลินแสดงด้วยลำดับกรดอะมิโนที่มีตัวหนาสีแดง

สำหรับรูปแบบลายพิมพ์ของโปรตีนจากแบคทีเรียไอโซเลต RS1 แถบที่ #1 – #6 ที่ปรากฏบนเจล SDS-PAGE (รูปที่ 19) ได้นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐานของ GPMDB (Global Proteome Machine database) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์โปรตีน X! TANDEM Spectrum Modeler (<http://www.thegpm.org>) โดยแถบของโปรตีน #1 – #3 ซึ่งมีขนาดมวลโมเลกุลโปรตีน

ประมาณ 54 kDa, 32 kDa และ 20 kDa ตามลำดับ พบว่ามีความใกล้เคียงกับเอนไซม์แคทาเลส (catalase), เอนไซม์โปรตีเอส (protease) และยีนที่แสดงออกเอนไซม์โปรตีเอส IV (protease IV) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.12

สำหรับแถบของโปรตีน #4 – #6 ซึ่งมีขนาดมวลโมเลกุลโปรตีนประมาณ 40, 32 และ 29 kDa ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 19 นั้น ผลการวิเคราะห์โปรตีนพบว่า แถบโปรตีน #4 มีความใกล้เคียงกับโปรตีนที่ยึดเกาะกับไคติน (chitin binding protein) ส่วนแถบโปรตีน #4 และ #5 ต่างมีความใกล้เคียงกับเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ดังแสดงในตารางที่ 4.12



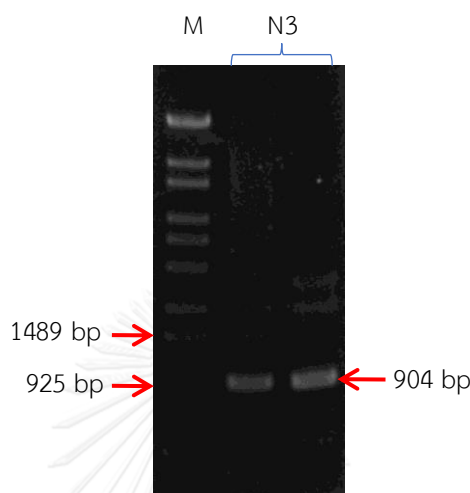
ตารางที่ 4.12 ลักษณะสมบัติของแถบโปรตีน #1 – #6 หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE Bio-gel A

ตัวอย่างโปรตีน	Log (e)	การครอบคลุมของลำดับโปรตีน	จำนวนของเพปไทด์ลักษณะเฉพาะที่พบ	น้ำหนักมวลโมเลกุล	หมายเลขเข้าถึง	ชนิดของโปรตีน	จุลินทรีย์
#1	-737.5	65%	64	55.6	gij218889435	catalase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58
#2	-1881.8	53%	145	53.7	gij218890000	protease	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58
#3	-1349.0	40%	99	48.2	gij218889496	Piv gene product (protease IV)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58
#4	-1648.1	86%	128	41.9	gij218893181	chitin binding protein	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58
#5	-1881.8	53%	145	53.7	gij218890000	protease	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58
#6	-864.7	33%	68	45.5	gij218892171	protease	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58

4.6 การศึกษาอินแฟลกเจลลินในแบคทีเรีย

เมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เพื่อเพิ่มปริมาณอินแฟลกเจลลินของ *B. subtilis* N3 แล้วพบว่าผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับอินแฟลกเจลลินที่ปรากฏใน *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 ที่มีการศึกษาแล้ว (Barbe และคณะ, 2009) เมื่อศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปลงเป็นลำดับกรดอะมิโนใน

ฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยโปรแกรม Blastx พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประมวลรหัสให้ลำดับกรดอะมิโนที่มีจำนวน 306 หมู่ และมีความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของแฟลกเจลินของ *B. subtilis* หมายเลขเข้าถึง BAB58986.1 ถึง 100% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 1 และ 2



รูปที่ 4.8 ผลิตภัณฑ์ชิ้นดีเอ็นเอของ *B. subtilis* N3 จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

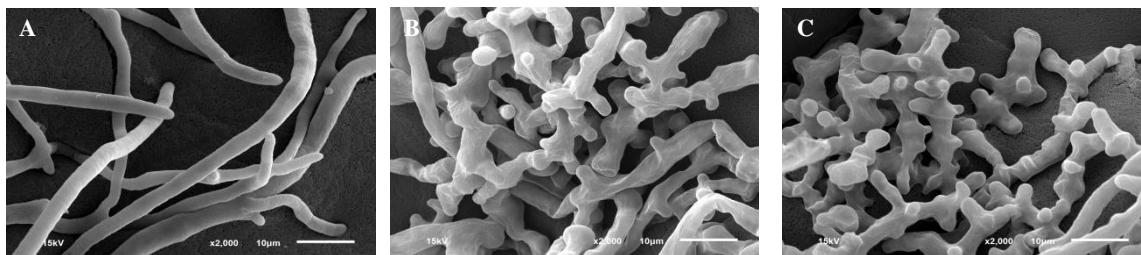
ช่องที่ 1	1kb DNA Ladder
ช่องที่ 2 และ 3	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ <i>B. subtilis</i> N3 เป็นแม่แบบ

4.7 การศึกษาผลของโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์ต่อการเจริญของเส้นใยของรา

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า โปรตีนบริสุทธิ์จากเชื้อ *B. subtilis* N3 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์รา *C. lunata* ได้ เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าสปอร์ของ *C. lunata* เริ่มงอกในช่วงที่ 9 และเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) พบว่าลักษณะของเส้นใยที่งอกออกมาจะมีความผิดปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ราสามารถเจริญได้อย่างปกติ โดยลักษณะของเส้นใยจะมีการบวมพอง ขดงอ เป็นปล้องๆ และที่บริเวณปลายของเส้นใยเกิดการแตกแขนง (รพีวรรณ โสวรรณปรีชา, 2553)

เมื่อนำสารละลายโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์ของแบคทีเรียโอโซเลต RS1 ลำดับส่วนที่ 9-10 และ 33-34 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ด้วยอัตราส่วน 1:19 ของโปรตีนบริสุทธิ์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปตรวจสอบผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ผลการทดลองพบว่า บริเวณ

เส้นใยโดยรอบและปลายของเส้นใยของ *P. palmivora* มีความผิดปกติ ดังรูปที่ 4.9 (B และ C) โดยที่บริเวณปลายเส้นใยของ *P. palmivora* มีการแตกแขนงออกหลายทิศทางและมีลักษณะปลายที่สั้น กุด และเส้นใยมีลักษณะเหี่ยวย่น ไม่เรียบ ขณะที่ราในชุดควบคุมที่เจริญโดยไม่มีส่วนผสมของโปรตีน ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า เราสามารถเจริญได้อย่างปกติ โดยเส้นใยของ *P. palmivora* มีลักษณะยาว และเรียบ ดังรูปที่ 4.9 (A)



รูปที่ 4.9 ลักษณะการเจริญของเส้นใย *P. palmivora* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เมื่อทดสอบด้วยโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์ลำดับส่วนที่ 9-10 (B) และ 33-34 (C) ของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 หลังจากบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีโปรตีน (A)

4.8 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราชนิดต่างๆโดย *B. subtilis* N3 แบบ *in vitro* และ *in vivo*

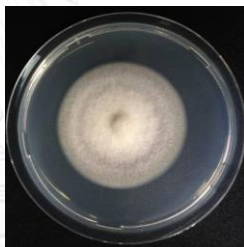

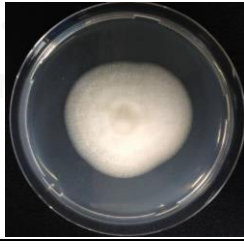

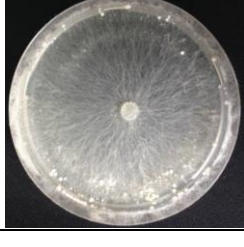

เนื่องจากโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จากแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ประกอบไปด้วยแถบโปรตีนหลายแถบที่มีขนาดแตกต่างกัน ดังนั้นในการศึกษาผลของโปรตีนที่มีต่อราแบบ *in vitro* และ *in vivo* จึงไม่ได้นำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จากแบคทีเรียไอโซเลต RS1 มาศึกษาต่อ

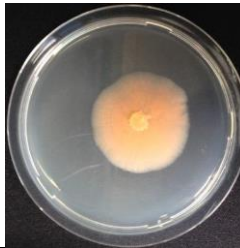

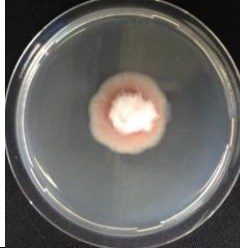

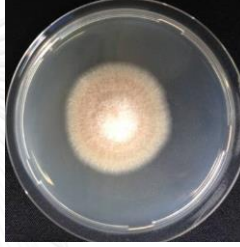



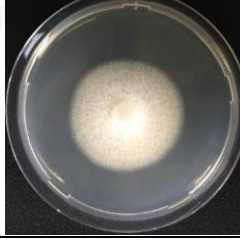



สำหรับโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก *B. subtilis* N3 นั้น ผลการทดลองเบื้องต้นจาก SDS-PAGE แสดงแถบของโปรตีนหลักเพียงแถบเดียว ดังนั้นจึงนำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จากแบคทีเรียนี้ มาศึกษากับรากกล้วยไม้ในการทดลองต่อไป จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้รายงานว่า *B. subtilis* N3 สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ (รพีวรรณ โสวรรณปรีชา, 2553) ในงานวิจัยนี้ได้นำแบคทีเรียชนิดนี้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชชนิดต่างๆเพิ่มเติมทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ *C. lunata*, *C. gloeosporioides*, *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. periferatum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora* ซึ่งในการทดลองจะแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*) และบนกล้วยไม้ (*in vivo*)

4.8.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราชนิดต่างๆโดย *B. subtilis* N3 บนจานเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*)

การทดลองนี้เป็นการทดสอบเซลล์ของ *B. subtilis* N3 กับราทั้ง 9 ชนิด ซึ่งผลการทดลองใน *in vitro* พบว่า *B. subtilis* N3 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราได้ทั้ง 9 ชนิด โดยราที่ถูกยับยั้งโดย *B. subtilis* N3 ได้มากกว่า 70% มีทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ *C. gloeosporioides*, *C. lunata*, *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ 78.18%, 77.36%, 84.71%, 81.25%, 78.41%, 73.53%, 80.43% และ 71.70% ตามลำดับ และมีเพียง *F. periferatum* ชนิดเดียวเท่านั้น ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราต่ำกว่า 70% ซึ่งมีค่าเท่ากับ 66.67% ดังแสดงในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 การยับยั้งการเจริญของราชนิดต่างๆโดย *B. subtilis* N3 บนจานเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*)

ชนิดของรา	ชุดควบคุม (4 วัน)	ชุดทดสอบ (4 วัน)	% การยับยั้ง	ชุดควบคุม (4 วัน)	ชุดทดสอบ (4 วัน)
<i>C. lunata</i>	5.5 cm	1.2 cm	78.18		
<i>C. gloeosporioides</i>	5.3 cm	1.2 cm	77.36		
<i>R. solani</i> (2 วัน)	8.5 cm	1.3cm	84.71		

<i>F. oxysporum</i>	4 cm	0.75 cm	81.25		
<i>F. periferatum</i>	3.3 cm	1.1 cm	66.67		
<i>F. solani</i>	4.4 cm	0.95 cm	78.41		
<i>F. moniliforme</i>	3.4 cm	0.9 cm	73.53		
<i>P. aphanidermatum</i>	4.6 cm	0.9 cm	80.43		
<i>P. palmivora</i>	5.3 cm	1.5 cm	71.70		

4.8.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งรากล่อโรคพืชชนิดต่างๆโดย *B. subtilis* N3 บนกล้วยไม้ (*in vivo*)





















4.8.2.1 การทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งการเจริญของรากล่อโรคพืชทั้ง 9 ชนิดบนต้นกล้วยไม้

จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของรากล่อโรคชนิดต่างๆบนกล้วยไม้ 2 สกุล ได้แก่ สกุล ช้างกระและสกุลหวาย โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ได้แก่ 1. ชุดควบคุมผลลบบที่ใส่น้ำปลอดเชื้อ, 2. ชุดที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย เพื่อทดสอบผลของน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่มีต่อต้นกล้วยไม้, 3. ชุดที่ใส่ราแต่ละชนิด เพื่อทดสอบการเกิดโรคบนกล้วยไม้โดยราเหล่านี้, 4. ชุดการรักษาโรค ที่ใส่รากล่อน 1 วัน แล้วตามด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรีย และ 5. ชุดการป้องกันโรค ที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียก่อน 1 วัน แล้วตามด้วยราแต่ละชนิด

4.8.2.1.1 ผลการยับยั้ง *C. lunata* บนต้นกล้วยไม้

จากตารางที่ 4.14 ผลการทดลองพบว่า ชุดที่ใส่น้ำปลอดเชื้อ และชุดที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 ในกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวายนั้น กล้วยไม้สามารถเจริญได้ปกติ ส่วนกล้วยไม้ที่ถูกทำให้ติดเชื้อ *C. lunata* ในกล้วยไม้สกุลช้างกระพบว่าใบร่วงทั้งหมด ส่วนสกุลหวายมีใบร่วงเล็กน้อย สำหรับชุดการทดสอบแบบการรักษาและการป้องกันสำหรับสกุลช้างกระพบว่ากล้วยไม้ไม่เกิดโรคและสามารถเจริญได้อย่างปกติ ส่วนสกุลหวายพบว่ากล้วยไม้มีลักษณะเหี่ยวแต่ใบยังไม่ร่วง ผลการทดลองทั้งหมดแสดงผลเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 0 และวันที่ 14

ตารางที่ 4.14 ผลการทดสอบการยับยั้ง *C. lunata* บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย โดย น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3





















สกุลของกล้วยไม้	ช้างกระ		หวาย	
	0 วัน	14 วัน	0 วัน	14 วัน
น้ำปลอดเชื้อ				
น้ำเลี้ยงเชื้อ				
<i>C. lunata</i>				
<i>C. lunata</i> + น้ำเลี้ยงเชื้อ				
น้ำเลี้ยงเชื้อ + <i>C. lunata</i>				

4.8.2.1.2 ผลการยับยั้ง *C. gloeosporioides* บนต้นกล้วยไม้

จากตารางที่ 4.15 ผลการทดลองพบว่า ชุดที่ใส่น้ำปลอดเชื้อ และชุดที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนใสของ *B. subtilis* N3 และชุดทดสอบการรักษาของกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวายนั้น กล้วยไม้สามารถเจริญได้ปกติ ส่วนชุดทดสอบการป้องกันซึ่งใส่น้ำเลี้ยงแบคทีเรียก่อนแล้วจึงใส่รา ใน กล้วยไม้สกุลช้างกระนั้น กล้วยไม้มีการเจริญที่ปกติ ส่วนสกุลหวาย พบว่ามีใบเหี่ยว มีสีเหลือง

สำหรับการติดเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในกล้วยไม้ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่ากล้วยไม้ตาย ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองทั้งหมดของวันที่ 0 และวันที่ 14

ตารางที่ 4.15 ผลการทดสอบการยับยั้ง *C. gloeosporioides* บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระ และสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3





















สกุลของกล้วยไม้	ช้างกระ		หวาย	
	0 วัน	14 วัน	0 วัน	14 วัน
ชุดควบคุม				
น้ำเลี้ยงเชื้อ				
<i>C. gloeosporioides</i>				
<i>C. gloeosporioides</i> + น้ำเลี้ยงเชื้อ				
น้ำเลี้ยงเชื้อ + <i>C. gloeosporioides</i>				

4.8.2.1.3 ผลการยับยั้ง *R. solani* บนต้นกล้วยไม้

จากตารางที่ 4.16 ผลการทดลองพบว่า ชุดที่ใส่น้ำปลอดเชื้อ และชุดที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนใสของ *B. subtilis* N3 ในกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวายนั้น กล้วยไม้สามารถเจริญได้ปกติ

ส่วนการติดเชื้อรา *R. solani* ในกล้วยไม้สกุลช้างกระ พบว่ากล้วยไม้มีอาการเหี่ยว แต่สำหรับสกุลหวาย พบว่ากล้วยไม้ตาย ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ส่วนชุดทดสอบการรักษาในกล้วยไม้สกุลช้างกระ พบว่ากล้วยไม้ตาย แต่สำหรับสกุลหวาย กล้วยไม้สามารถเจริญได้ปกติ ส่วนชุดทดสอบการป้องกันของกล้วยไม้สกุลช้างกระ กล้วยไม้มีการเจริญที่ปกติ และสกุลหวายพบว่า มีใบเหี่ยวและร่วงเกิดขึ้น ผลการทดลองทั้งหมดได้มีการเปรียบเทียบผลในวันที่ 0 และวันที่ 14





















ตารางที่ 4.16 ผลการทดสอบการยับยั้ง *R. solani* บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3

สกุลของกล้วยไม้	ช้างกระ		หวาย	
	0 วัน	14 วัน	0 วัน	14 วัน
ชุดควบคุม				
น้ำเลี้ยงเชื้อ				
<i>R. solani</i>				
<i>R. solani</i> + น้ำเลี้ยงเชื้อ				
น้ำเลี้ยงเชื้อ + <i>R. solani</i>				

4.8.2.1.4 ผลการยับยั้ง *F. oxysporum* บนต้นกล้วยไม้

จากตารางที่ 4.17 ผลการทดลองพบว่า ชุดควบคุมที่ใส่น้ำปลอตเชื้อ, ชุดที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3, ชุดทดสอบการรักษา และชุดทดสอบการป้องกัน ของกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวายนั้น กล้วยไม้สามารถเจริญได้ปกติ ส่วนการติดเชื้อ *F. oxysporum* ในกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย พบว่ากล้วยไม้ตาย ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ โดยเป็นผลการเปรียบเทียบผลการทดลองทั้งหมดที่ได้ของวันที่ 0 และวันที่ 14

















ตารางที่ 4.17 ผลการทดสอบการยับยั้ง *F. oxysporum* บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3

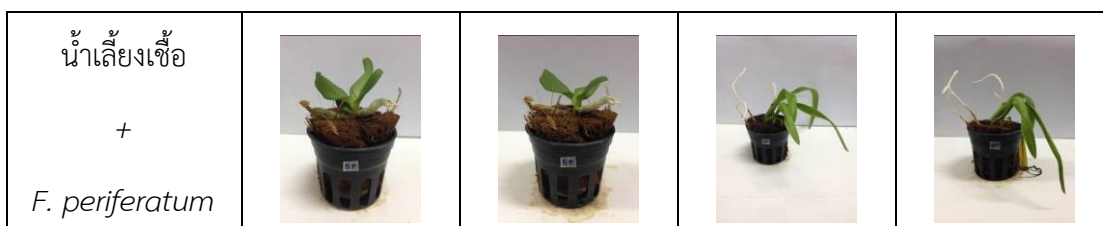
สกุลของกล้วยไม้	ช้างกระ		หวาย	
	0 วัน	14 วัน	0 วัน	14 วัน
ชุดควบคุม				
น้ำเลี้ยงเชื้อ				
<i>F. oxysporum</i>				
<i>F. oxysporum</i> + น้ำเลี้ยงเชื้อ				
น้ำเลี้ยงเชื้อ + <i>F. oxysporum</i>				

4.8.2.1.5 ผลการยับยั้ง *F. periferatum* บนต้นกล้วยไม้

จากตารางที่ 4.18 ผลการทดลองพบว่า ชุดควบคุมที่ใส่น้ำปลอดเชื้อ, ชุดที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3, และชุดทดสอบการป้องกันของกล้วยไม้สกุลข้างกระและสกุลหวาย นั้น กล้วยไม้สามารถเจริญได้ปกติ ส่วนชุดทดสอบการรักษาสำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย พบว่ากล้วยไม้มีใบเหี่ยวและใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ส่วนสกุลข้างกระ พบว่ากล้วยไม้ตาย ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ สำหรับการติดเชื้อ *F. periferatum* ในกล้วยไม้สกุลข้างกระ พบว่ากล้วยไม้ตาย แต่ในสกุลหวายใบมีอาการหงิกงอ เหี่ยว และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ของวันที่ 0 และวันที่ 14

ตารางที่ 4.18 ผลการทดสอบการยับยั้ง *F. periferatum* บนต้นกล้วยไม้สกุลข้างกระและสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3













สกุลของกล้วยไม้	ข้างกระ		หวาย	
	0 วัน	14 วัน	0 วัน	14 วัน
ชุดควบคุม				
น้ำเลี้ยงเชื้อ				
<i>F. periferatum</i>				
<i>F. periferatum</i> + น้ำเลี้ยงเชื้อ				











4.8.2.1.6 ผลการยับยั้ง *F. solani* บนต้นกล้วยไม้

จากตารางที่ 4.19 ผลการทดลองพบว่า ชุดควบคุมที่ใส่น้ำปลอดเชื้อ, ชุดที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3, และชุดทดสอบการรักษาของกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวายนั้นกล้วยไม้สามารถเจริญได้ปกติ ส่วนการติดเชื้อ *F. solani* ในกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวายพบว่ากล้วยไม้ตาย ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ สำหรับชุดทดสอบการป้องกันของกล้วยไม้สกุลช้างกระกล้วยไม้สามารถเจริญได้ปกติ แต่ในสกุลหวายใบมีอาการเหี่ยว และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เมื่อเปรียบเทียบของผลวันที่ 0 และวันที่ 14

ตารางที่ 4.19 ผลการทดสอบการยับยั้ง *F. solani* บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3









สกุลของกล้วยไม้	ช้างกระ		หวาย	
	0 วัน	14 วัน	0 วัน	14 วัน
ชุดควบคุม				
น้ำเลี้ยงเชื้อ				
<i>F. solani</i>				








<i>F. solani</i> + น้ำเลี้ยงเชื้อ				
น้ำเลี้ยงเชื้อ + <i>F. solani</i>				

4.8.2.1.7 ผลการยับยั้ง *F. moniliforme* บนต้นกล้วยไม้

จากตารางที่ 4.20 ผลการทดลองพบว่า ชุดควบคุมที่ใส่น้ำปลอดเชื้อ, ชุดที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของเชื้อ *B. subtilis* N3, ชุดทดสอบการรักษา และชุดทดสอบการป้องกัน ของกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย กล้วยไม้สามารถเจริญได้ปกติ ส่วนการติดเชื้อ *F. moniliforme* ในกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย พบว่ากล้วยไม้ตาย ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ผลการทดลองทั้งหมดได้จากการเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 0 และวันที่ 14

ตารางที่ 4.20 ผลการทดสอบการยับยั้ง *F. moniliforme* บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3





















สกุลของกล้วยไม้	ช้างกระ		หวาย	
	0 วัน	14 วัน	0 วัน	14 วัน
ชุดควบคุม				
น้ำเลี้ยงเชื้อ				

<i>F. moniliforme</i>				
<i>F. moniliforme</i> + น้ำเลี้ยงเชื้อ				
น้ำเลี้ยงเชื้อ + <i>F. moniliforme</i>				

4.8.2.1.8 ผลการยับยั้ง *P. aphanidermatum* บนต้นกล้วยไม้

จากตารางที่ 4.21 ผลการทดลองพบว่า ชุดควบคุมที่ใส่น้ำปลอดเชื้อ, ชุดที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3, ชุดทดสอบการรักษา, และชุดทดสอบการป้องกัน ของกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย กล้วยไม้มีการเจริญที่ปกติ ส่วนการติดเชื้อ *P. aphanidermatum* ในกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย พบว่ากล้วยไม้ตายและไม่สามารถเจริญต่อไปได้ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองทั้งหมดระหว่างวันที่ 0 และวันที่ 14

ตารางที่ 4.21 ผลการทดสอบการยับยั้ง *P. aphanidermatum* บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3





















สกุลของกล้วยไม้	ช้างกระ		หวาย	
	0 วัน	14 วัน	0 วัน	14 วัน
ชูดควบคุม				
น้ำเลี้ยงเชื้อ				
<i>P. aphanidermatum</i>				
<i>P. aphanidermatum</i> + น้ำเลี้ยงเชื้อ				
น้ำเลี้ยงเชื้อ + <i>P. aphanidermatum</i>				

4.8.2.1.9 ผลการยับยั้ง *P. palmivora* บนต้นกล้วยไม้

จากตารางที่ 4.22 ผลการทดลองพบว่า ชูดควบคุมที่ใส่น้ำปลอดเชื้อ, ชูดที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3, และชูดทดสอบการป้องกันของกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย

กล้วยไม้มีการเจริญที่ปกติ ส่วนการติดเชื้อ *P. palmivora* ในกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย พบว่ากล้วยไม้ตาย ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ สำหรับชุดทดสอบการรักษาของกล้วยไม้สกุลช้างกระ กล้วยไม้สามารถเจริญได้เป็นปกติ แต่ในสกุลหวายมีใบเหลืองเกิดขึ้นเล็กน้อย โดยเปรียบเทียบผลการทดลองทั้งหมดที่ได้รับระหว่างวันที่ 0 และวันที่ 14

ตารางที่ 4.22 ผลการทดสอบการยับยั้ง *P. palmivora* บนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3

สกุลของกล้วยไม้	ช้างกระ		หวาย	
	0 วัน	14 วัน	0 วัน	14 วัน
ชุดควบคุม				
น้ำเลี้ยงเชื้อ				
<i>P. palmivora</i>				
<i>P. palmivora</i> + น้ำเลี้ยงเชื้อ				
น้ำเลี้ยงเชื้อ + <i>P. palmivora</i>				

เมื่อระดับดัชนีความรุนแรงในการเกิดโรคให้กับผลการทดลองข้างต้นได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.23 ที่สามารถสรุปได้ว่า น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 เพียงอย่างเดียวไม่ทำให้ต้นกล้วยไม้ ทั้งสกุลช้างกระและสกุลหวายเกิดโรคหรือเกิดอาการใดๆที่ผิดไปจากปกติ และเมื่อทดสอบการติดเชื้อราแต่ละชนิดบนต้นกล้วยไม้ พบว่ากล้วยไม้สกุลช้างกระมีเพียงเชื้อเดียวที่ไม่สามารถทำเกิดโรคได้ คือ *R. solani* ส่วนกล้วยไม้สกุลหวายมีรา 2 ชนิดที่ไม่สามารถก่อโรคในกล้วยไม้ในสกุลนี้ได้ คือ *C. lunata* และ *F. periferatum* เมื่อราก่อโรคในต้นกล้วยไม้พบว่า ต้นกล้วยไม้จะไม่สามารถเจริญต่อไปได้ สำหรับชุดทดสอบการป้องกันในต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระ พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 มีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันราทั้ง 9 ชนิดไม่ให้อโรคในกล้วยไม้สายพันธุ์นี้ได้ แต่ชุดทดสอบการป้องกันในต้นกล้วยไม้สกุลหวายสามารถป้องกันราก่อโรคได้ดีกับราเพียง 4 ชนิด ได้แก่ *F. oxysporum*, *F. periferatum*, *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora* ส่วนราที่เหลืออีก 5 ชนิด พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 มีประสิทธิภาพในการป้องกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนชุดทดสอบการรักษาในกล้วยไม้สกุลช้างกระ พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีทั้ง 7 ชนิด ขณะที่ *F. oxysporum* สามารถถูกยับยั้งได้เพียงเล็กน้อย และ *R. solani* น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ในชุดทดสอบการรักษาในกล้วยไม้สกุลหวาย พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดี 5 ชนิด ได้แก่ *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora* ส่วนราที่เหลืออีก 4 ชนิด คือ *C. lunata*, *R. solani*, *F. periferatum*, และ *F. moniliforme* นั้น น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ตารางที่ 4.23 สรุปผลการทดสอบการยับยั้งราทั้ง 9 ชนิดบนต้นกล้วยไม้สกุลช้างกระและสกุลหวาย โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3

ชนิดของรา	ดัชนีความรุนแรงในการเกิดโรค									
	กล้วยไม้สกุลช้างกระ					กล้วยไม้สกุลหวาย				
	น้ำ	CF	F	F+CF	CF+F	น้ำ	CF	F	F+CF	CF+F
<i>C. lunata</i>	2	2	0	2	2	2	2	1	1	1
<i>C. gloeosporioides</i>	2	2	0	2	2	2	2	0	2	1
<i>R. solani</i>	2	2	1	0	2	2	2	0	1	1
<i>F. oxysporum</i>	2	2	0	1	2	2	2	0	2	2
<i>F. periferatum</i>	2	2	0	2	2	2	2	1	1	2
<i>F. solani</i>	2	2	0	2	2	2	2	0	2	1
<i>F. moniliforme</i>	2	2	0	2	2	2	2	0	1	1
<i>P. aphanidermatum</i>	2	2	0	2	2	2	2	0	2	2
<i>P. palmivora</i>	2	2	0	2	2	2	2	0	2	2

หมายเหตุ CF = ใส่ น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส (culture filtrate) เท่านั้น

F = ใส่ราเท่านั้น

F + CF = ใส่ร่าก่อนน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส 1 วัน

CF+F = ใส่ น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสก่อนรา 1 วัน

ดัชนีความรุนแรงในการเกิดโรค:

(2) = กล้วยไม้เจริญปกติ









(1) = กล้วยไม้มีอาการเหี่ยว/ใบมีสีเหลือง


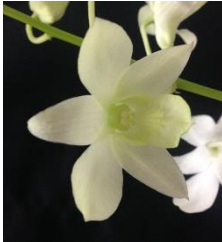
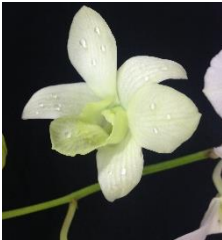

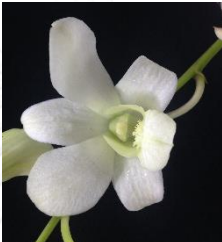

(0) = กล้วยไม้ตาย

4.8.2.2 การทดสอบความสามารถของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก *B. subtilis* N3 ในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* บนดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์สีขาว (5N) และพันธุ์สีชมพู (ชมพูซากุระ)





เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *C. lunata* โดยโปรตีนบริสุทธิ์จาก *B. subtilis* N3 บนดอกกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 4.25 ซึ่งพบว่าทุกชุดการทดลอง ซึ่งรวมทั้งชุดที่ใส่สปอร์ของรา นั้น ดอกกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ยังคงแสดงอาการปกติ ไม่มีอาการของโรคดอกสนิมหรือจุดสนิมแต่อย่างใด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าโปรตีนบริสุทธิ์และน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจาก *B. subtilis* N3 สามารถยับยั้งหรือป้องกันการเกิดโรคได้หรือไม่ (ตารางที่ 4.24 และ 4.25)








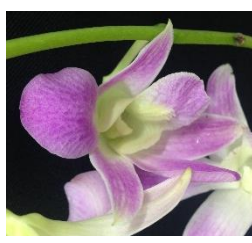
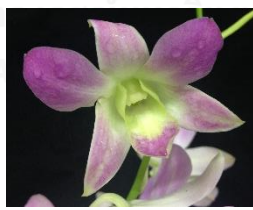

ตารางที่ 4.24 ผลการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสและโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์ของ *B. subtilis* N3 กับ *C. lunata* บนดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์สีขาว (5N)

	วันที่ 1	วันที่ 6
น้ำ		
น้ำเลี้ยงเชื้อ		
<i>C. lunata</i>		
น้ำเลี้ยงเชื้อ + <i>C. lunata</i>		

<p><i>C. lunata</i></p> <p>+</p> <p>น้ำเลี้ยงเชื้อ</p>		
<p>โปรตีนกิ่งบริสุทธิ์</p> <p>+</p> <p><i>C. lunata</i></p>		
<p><i>C. lunata</i></p> <p>+</p> <p>โปรตีนกิ่งบริสุทธิ์</p>		

ตารางที่ 4.25 ผลการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสและโปรตีนกิ่งบริสุทธิ์ของ *B. subtilis* N3 กับ *C. lunata* บนดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์สีชมพู (ชมพูซากุระ)

	วันที่ 1	วันที่ 6
น้ำ		
น้ำเลี้ยงเชื้อ		

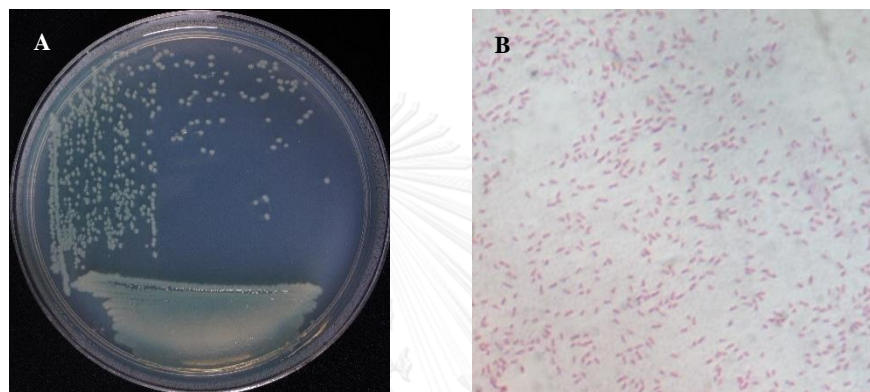
<i>C. lunata</i>		
น้ำเลี้ยงเชื้อ + <i>C. lunata</i>		
<i>C. lunata</i> + น้ำเลี้ยงเชื้อ		
โปรตีนกิ่งบริสุทธิ์ + <i>C. lunata</i>		
<i>C. lunata</i> + โปรตีนกิ่งบริสุทธิ์		

4.9 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ได้ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 3 และ 4 ซึ่งหลังจากนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวรวม 968 คู่เบส ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยโปรแกรม Blastn พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต RS1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ

16S rDNA ของ *P. aeruginosa* หมายเลขเข้าถึง CP020603.1 ถึง 99% ดังแสดงในภาคผนวก ง หมายเลข 3 และ 4

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* พบว่าโคโลนีมีลักษณะกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ ผิวมันวาว และมีสีเหลืองอมเขียว (รูปที่ 4.10(A)) เมื่อย้อมสีแกรมแล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างแท่งสั้น (รูปที่ 4.10(B))



รูปที่ 4.10 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 บนอาหารแข็ง NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (A), ผลการย้อมสีแกรมของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (1,000x) (B)

เมื่อทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีต่างๆ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต RS1 สามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลส, เจลาติเนส, เพปติเดส และไนเตรตรีดักเทสได้ สามารถใช้กลูโคสและซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่สามารถใช้แลคโทสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ สามารถสร้างแอมโมเนียและรงควัตถุ (pigment) สีเขียวได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.26

ตารางที่ 4.26 แสดงผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต RS1

แคทาเลส	เพปทีเดส	TSI	ซิงเตรต	ไนเตรต	NH ₄	เจลาตินเนส	อินโดล	IMViC	รงควัตถุ
+	+	Alkaline butt / Alkaline slant w/o gas	+	+	+	+	-	---+	+ (สีเขียว)

จากผลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล, ทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมี ดังนั้นจึงระบุเบื้องต้นได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลต RS1 เป็น *Pseudomonas aeruginosa* และต่อจากนี้จะเรียกแบคทีเรียไอโซเลตนี้ว่า *Pseudomonas aeruginosa* RS1

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติโดยคงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549) ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียทั้งหมด 10 ไอโซเลต ได้แก่ M10, M22, M23, M25, M26, M27, N1, N3, N9 และ RS1 โดยแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลตพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้หลายชนิด ในงานวิจัยนี้ส่วนแรกได้เน้นทดสอบแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลตกับราสองชนิด ได้แก่ *P. palmivora* และ *P. aphanidermatum* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคเน่าดำหรือโรคเน่าเข้าไส้ (black rot หรือ *Phytophthora rot*) และโรครากเน่าหรือโรคเน่าคอดิน (damping-off) บนกล้วยไม้ ตามลำดับ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น การทดสอบโดยใช้เซลล์แบคทีเรียและการทดสอบโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียในการยับยั้งราทั้งสองชนิดดังกล่าว

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดด้วยเซลล์ของแบคทีเรียพบว่า เซลล์แบคทีเรียไอโซเลต M10, M25 และ M27 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. aphanidermatum* ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราของแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลตเท่ากับ 57.08% เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองกับชุดควบคุม และเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต M10 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ดีที่สุดเท่ากับ 78.06% โดยเปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดควบคุม และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* และ *P. aphanidermatum* โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 1:1 ผลการทดลองพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ 100%

ลักษณะสมบัติทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 แสดงว่าโคโลนีของแบคทีเรียมีลักษณะกลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ ผิวมันวาว และมีสีเหลืองอมเขียว เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างแท่งสั้น สามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลส, เจลาติเนส, เพปติเดส และไนเตรตรีดักเทสได้ สามารถใช้กลูโคสและซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยไม่ใช้แลคโทสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถสร้างแอมโมเนีย และรงควัตถุสีเขียวได้ ข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ซึ่งมีความยาว 968 นิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *P. aeruginosa* หมายเลขเข้าถึง CP020603.1 มากถึง 99% จึงเรียกแบคทีเรียไอโซเลต RS1 ว่า *P. aeruginosa* RS1

งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าแบคทีเรียพวก *Pseudomonas* สามารถสร้างสารต้านการเจริญของราก่อโรคทั้งในพืชและในสัตว์ได้ ตัวอย่างเช่น *P. aeruginosa* สามารถสร้างสาร phenazine ได้หลายชนิด ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรค พวก *Candida albicans* ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในคน (Morales และคณะ, 2010) และสารบริสุทธิ์ pafungin จาก *P. aeruginosa* K-187 มีผลต่อการเจริญของ *F. oxysporum* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคเน่าคอดิน (damping-off) โดยทำให้เส้นใยของรามี้อาการบวมและแตกสลาย ส่งผลให้ราตายในที่สุด และ pafungin ยังสามารถทนความเป็นกรด-เบสที่ 5-7 และทนต่ออุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 40 นาทีอีกด้วย (Wanga และคณะ, 1999) นอกจากนี้ *Pseudomonas* sp. ยังสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด สารเหล่านี้ ได้แก่ โคตินีน, ไลโซไซม์ (Wang และ Chang, 1997), โปรตีนซึ่งยึดเกาะกับโคติน (Folders และคณะ, 2000), แคทาเลส (Levy และคณะ, 1992) และโปรตีเอส (Yen และคณะ, 2006) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *P. aeruginosa* GSE 18 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในถั่วลิสงได้ถึง 8 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Rhizoctonia bataticola*, *R. solani*, *S. rolfisii*, *Cercospora arachidicola*, *Phaeoisariopsis personata*, และ *Puccinia arachidis* (Kishore และคณะ, 2005)

P. aeruginosa เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่พบได้ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติทั่วไป และยังสามารถพบได้ในตัวอย่างจากคนไข้ด้วย (Buysens และคณะ, 1996, Mavrodi และคณะ, 2001) ซึ่งการหาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่พบได้ทางการเกษตรกับทางการแพทย์สามารถจัดจำแนกด้วยวิธี paraffin baiting system เนื่องจากแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการนำพาราฟฟินไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน (Massengale และคณะ, 1999) ซึ่งในปัจจุบันจะพบว่า *P. aeruginosa* ที่พบได้ทั่วไปนั้นสามารถใช้เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้มากมาย ตัวอย่างเช่น *P. aeruginosa* M-1001 ที่แยกได้จากดินในประเทศไต้หวัน (Wang และคณะ, 1995a, Wang และคณะ, 1995b, Yen และคณะ, 2006) หรือ *P. aeruginosa* 7NSK2 ที่พบได้บริเวณดินรอบรากของข้าวบาร์เลย์ (Iswandi และคณะ, 1987) หรือ *P. aeruginosa* PNA1 ที่พบได้จากดินบริเวณรากถั่วเขียว (Anjaiah และคณะ, 1998) หรือ *P. aeruginosa* SD12 ที่พบได้จากดินที่ปนเปื้อนจากโรงฟอกหนัง (Patra, 2012) โดย *P. aeruginosa* ที่กล่าวมานั้นเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ซึ่งมีความสามารถในการควบคุมราที่ก่อโรคในพืชได้ ตัวอย่างเช่น *P. aeruginosa* GC-B26 พบว่าเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สร้างสาร phenazine-1-carboxylic acid ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *P. capsica* และ *C. orbiculare* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต้นและใบแห้ง (*Phytophthora blight*) บนต้นพริกไทย และโรคแอนแทรคโนสบนใบของแตงกวา ตามลำดับ (Lee และคณะ, 2003) ใน

งานวิจัยนี้พบว่า *P. aeruginosa* RS1 เป็นแบคทีเรียซึ่งสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา *P. palmivora* บนกล้วยไม้

งานวิจัยนี้ได้มีการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* โดย *P. aeruginosa* RS1 โดยมีการแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, ค่าความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ และเวลาที่เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างสารเพื่อยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ในการทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย เพื่อให้สร้างสารออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด ได้ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อรา ด้วยอัตราส่วน 1:9 หลังจากทดสอบด้วยวิธี poison food technique พบว่าการแปรผันชนิดและค่าความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างสารต้านการเจริญของ *P. palmivora* โดย *P. aeruginosa* RS1 แต่สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง *P. aeruginosa* RS1 มีผลต่อการสร้างสารต้านราเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง *P. aeruginosa* RS1 เพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* คือ เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB pH7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง ซึ่งในการแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบไปด้วยอาหารเหลว NB, LB และ TSB ซึ่งอาหารเหลว TSB เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบสมบูรณ์ที่สุดที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียมากกว่าอาหารเหลว NB และ LB แต่ในงานวิจัยนี้แบคทีเรียสามารถสร้างสารต้านการเจริญของราได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB อาจเนื่องมาจากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว TSB จะสนับสนุนการเจริญของแบคทีเรีย แต่อาจไปรบกวนการสร้างสารต้านการเจริญของราโดยแบคทีเรียได้ (Valentine และคณะ, 2005)

สำหรับการแปรผันค่าความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB pH7 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้สูงที่สุด รองลงมาคือ เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว LB pH6 และ *P. aeruginosa* RS1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB pH8 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* มากกว่าแบคทีเรียเลี้ยงในอาหารเหลว LB pH9 เท่ากับ 1.63 เท่า นอกจากนี้การแปรผันอุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียที่ 30°C, 37°C และ 40°C พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อสร้างสารต้านรา คือ 37°C โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C มีค่าน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 37°C เท่ากับ 1.31 และ 1.55 เท่า *P. aeruginosa* RS1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB pH7 ที่อุณหภูมิ 37°C จะสามารถสร้างสารต้านการเจริญของราได้ดีที่สุดที่เวลา 21 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วง late logarithmic ของแบคทีเรีย แสดงว่าสารต้านการเจริญของราที่ได้นั้นไม่เกี่ยวข้องกับสารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของ *P. aeruginosa* RS1 (non-growth associated product)

การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจาก *P. aeruginosa* RS1 พบว่าเมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส จะมีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ลดลง อาจเนื่องมาจากความเป็นกรด-เบสไปทำลายสารต้านราทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งราลดลง ส่วนการทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *P. aeruginosa* RS1 พบว่าสารต้านราไม่สามารถทนความร้อนได้

ในงานวิจัยนี้การทำบริสุทธิ์ของโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของรา ได้แบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนแรกเป็นงานวิจัยต่อเนื่อง โดยนำแบคทีเรีย *B. subtilis* N3 มาเพิ่มปริมาณโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *C. lunata* (Sowanpreecha และ Rerngsamran, 2010, รพีวรรณ ไสวรรณปรีชา, 2553) และส่วนที่สองเป็นการทำบริสุทธิ์โปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *P. palmivora* จาก *P. aeruginosa* RS1 ซึ่งขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีนจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการทำโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ซึ่งการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นเกลือของแอมโมเนียมจะไปจับตัวกับโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย เพื่อดึงโปรตีนทั้งหมดให้รวมกันเป็นตะกอน ทำให้โปรตีนทั้งหมดตกตะกอนลงมา จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนทั้งหมดด้วยปริมาตรของสารละลายบัฟเฟอร์ที่น้อยที่สุด แล้วนำสารละลายโปรตีนทั้งหมดที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A โดยเมทริกซ์ของคอลัมน์มีประจุความเป็นบวกสูงจึงสามารถจับกับสารต้านราในสารละลายโปรตีนที่มีประจุความเป็นลบสูง แล้วโปรตีนจะค่อยๆถูกชะด้วยเกรเดียนท์ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (Cummins และคณะ, 2011, Ouedraogo และคณะ, 2011, Hegedus และ Marx, 2013)

จากผลการทดลองพบว่าโปรตีนจากทั้ง *B. subtilis* N3 และ *P. aeruginosa* RS1 เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จะพบลำดับส่วนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* และ *P. palmivora* ดีที่สุดในช่วง 40-80% ของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งจากนั้นสารละลายโปรตีนจากช่วงนี้จะถูกนำไปทำบริสุทธิ์เพิ่มเติมด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีบน DEAE Bio-gel A ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่า โปรตีนจาก *B. subtilis* N3 ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE Bio-gel A ลำดับส่วนที่ 51-60 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ดีที่สุด ส่วน *P. aeruginosa* RS1 ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE Bio-gel A ลำดับส่วนที่ 9-10 และ 33-34 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* เท่ากับ 75.00% และ 82.35% ตามลำดับ

หลังจากนั้นได้นำสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทั้งสองชนิดไปวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของโปรตีนเบื้องต้นด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

(SDS-PAGE) และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง Q exactive plus hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry ที่ต่อกับ liquid chromatography และ เครื่อง ESI-Q-TOF MS/MS พบว่าเมื่อวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนบริสุทธิ์จาก *P. aeruginosa* RS1 ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE Bio-gel A ลำดับส่วนที่ 9-10 เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนพบว่ามีด้วยกัน 3 ขนาด ได้แก่ 54 kDa, 32 kDa และ 20 kDa ซึ่งมีความใกล้เคียงกับแคทาเลส, โปรตีเอส, และโปรตีเอส IV ตามลำดับ และสำหรับโปรตีนบริสุทธิ์จาก *P. aeruginosa* RS1 ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE Bio-gel A ลำดับส่วนที่ 33-34 พบว่ามีขนาดของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเท่ากับ 40 kDa, 32 kDa และ 29 kDa ซึ่งมีความใกล้เคียงกับโปรตีนที่ยึดเกาะกับไคติน, โปรตีเอส, และโปรตีเอส ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลต่อเส้นใย *P. palmivora* โดยโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์จาก *P. aeruginosa* RS1 ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE Bio-gel A ลำดับส่วนที่ 9-10 และ 33-34 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) พบว่าเส้นใยของ *P. palmivora* มีความผิดปกติเกิดขึ้น โดยมีการแตกแขนงในหลายทิศทาง โดยมีปลายเส้นใยที่สั้นกุด และเส้นใยมีลักษณะเหี่ยวย่น ไม่เรียบ ดังนั้นจะสรุปเบื้องต้นได้ว่ากลไกการทำงานของโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์นี้น่าจะมีต่อการเจริญของเส้นใยของราเป็นหลักโดยอาจผ่านกลไกการผลิตสารกลุ่มสารปฏิชีวนะและ/หรือเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต่อเส้นใยของรา (Stein, 2005)

แคทาเลสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่สัมผัสกับออกซิเจน ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำและออกซิเจน (Chelikani และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามแคทาเลสเคยมีรายงานว่าเป็นสารต้านการเจริญของรา แต่ว่ากลไกในการยับยั้งการเจริญของรายังไม่มีข้อมูลรายงานอย่างชัดเจน ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สร้างแคทาเลสเพื่อยับยั้งการเจริญของรา เช่น *B. subtilis* LEV-006 ซึ่งสามารถสร้างสารต้านราได้ 3 ชนิด โดยหนึ่งในนั้นคือแคทาเลส ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. sclerotiorum*, *R. solani*, *A. brassicae* และ *Leptosphaeria maculans* ได้ (Hou และคณะ, 2006) หรือ *Bacillus* sp. M10 สามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลส ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium* sp. และ *C. capsica* ซึ่งก่อให้เกิดโรคผลเน่าและโรคแอนแทรคโนสในมะเขือเทศหลายสายพันธุ์ ตามลำดับ และเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและแบบส่องกราด พบว่าโปรตีนบริสุทธิ์มีผลทำให้เส้นใยและสปอร์ของ *Fusarium* sp. และ *C. capsica* เกิดการบวมและแตกหัก (ประภาศรี ศรีคง, 2552)

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในสัตว์ พืช รา แบคทีเรีย และไวรัล ซึ่งบางครั้งอาจเรียกว่าเพปติเดส (peptidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการไฮโดรไลซ์พันธะเพปไทด์ให้อยู่ในรูปของสายโพลีเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กหรือย่อยจนได้เป็นกรดอะมิโน กลุ่มของโปรตีเอสที่แตกต่างกันจะแสดงปฏิกิริยาเดียวกันโดยมีกลไกการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง (Oda, 2012) จาก

งานวิจัยก่อนหน้านี้ โปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของรากถูกค้นพบจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ N7 โดยการวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยวิธี MALDI TOF/TOF เอนไซม์นี้สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและสปอร์ของ *F. oxysporum* f. sp. *cucumerium* (FOC) ที่บริเวณผนังเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ โดยผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิส (Luo และคณะ, 2013)

ไคติโนไลติกเอนไซม์ (chitinolytic enzyme) และโปรตีนซึ่งยึดเกาะกับไคติโนถูกพบได้ในธรรมชาติ ซึ่งถูกผลิตและหลั่งออกนอกเซลล์ของแบคทีเรียหลายสกุล เช่น *Serratia*, *Bacillus* และ *Vibrio* (Watanabe และคณะ, 1990, Bassler และคณะ, 1991, Watanabe และคณะ, 1997) โดยกลไกการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้จะไปทำลายไคติโน (chitin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญของผนังเซลล์รา (Bowman และ Free, 2006) ทั้งนี้โปรตีนที่ประกอบด้วยส่วนโปรตีนซึ่งยึดเกาะกับไคติโนเพียงอย่างเดียว โดยไม่ปรากฏว่ามีแอกทิวิตีของไคติโนไลติกเอนไซม์ ก็มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ (Folders และคณะ, 2000) งานวิจัยก่อนหน้ารายงานว่า *P. aeruginosa* สามารถผลิตโปรตีนซึ่งยึดเกาะกับไคติโน CbpD และหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ โดยผ่านกระบวนการหลั่งสารของแบคทีเรียชนิดที่ 2 (type II secretion pathway) (Tommasen และคณะ, 1992, Folders และคณะ, 2000, Folders และคณะ, 2001) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า *P. aeruginosa* PAO25 สามารถหลั่งโปรตีนซึ่งยึดเกาะกับไคติโน เพื่อไปยับยั้งการเจริญของ *R. solani* และ *F. oxysporum* ได้ (Folders และคณะ, 2000) *Phytophthora* จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่คล้ายราพวก oomycetes ที่ผนังเซลล์มีเซลลูโลสและ β -กลูแคน เป็นองค์ประกอบหลัก แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าราน้ำในกลุ่มนี้มีการสร้างไคติโนขึ้นมาชั่วคราวที่บริเวณปลายสุดของเส้นใยก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นเซลลูโลส (Guerriero และคณะ, 2010) ดังนั้นโปรตีนซึ่งยึดเกาะกับไคติโนอาจมีผลกับ *P. palmivora* ที่บริเวณนี้ และส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติของปลายเส้นใยตามที่สังเกตพบในผลการทดลอง นอกจากนี้ ก็ยังเป็นไปได้ว่าเอนไซม์กลุ่มไคติโนไลติกเอนไซม์ (chitinolytic enzyme) เพียงอย่างเดียวอาจไม่มีผลโดยตรงต่อ *Phytophthora* และอาจจำเป็นต้องมีการทำงานร่วมกับสารประกอบชีวภาพชนิดอื่นที่แบคทีเรียสร้างขึ้น (Kim และคณะ, 2008) ดังที่มีรายงานว่าฟลูออเรสเซนต์ *Pseudomonas* ที่สามารถผลิตไคติเนส และ β -1,3-กลูคาเนส สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. capsici* ได้ (Arora และคณะ, 2007)

สำหรับโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้จาก *B. subtilis* N3 ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE Bio-gel A ลำดับส่วนที่ 51-60 ปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 39.88 kDa และสำหรับการวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์นี้ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับโปรตีนคล้ายแฟลกเจลลิน (flagellin-like protein) สูงถึง 69% ของบริเวณที่ครอบคลุมลำดับของโปรตีนนี้ โปรตีนแฟลกเจลลินเป็นองค์ประกอบโปรตีนพื้นฐานของแฟลกเจลลา (flagella) ของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งเป็นโครงสร้าง

ที่แบคทีเรียใช้สำหรับการเคลื่อนที่ และเมื่อโปรตีนเหล่านี้รวมตัวกันอยู่บริเวณแฟลกเจลลาของแบคทีเรีย โปรตีนชนิดนี้จะสามารถรื้อออกจากเซลล์แบคทีเรียได้ในระหว่างการสร้างแฟลกเจลลาของเชื้อแบคทีเรีย และทำให้สามารถแยกและทำบริสุทธิ์โปรตีนชนิดนี้ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Komoriya และคณะ, 1999) จากรายงานก่อนหน้านี้นี้พบว่าโปรตีนคล้ายแฟลกเจลลินจาก *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้ (Ren และคณะ, 2013, Zhao และคณะ, 2013a) ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่แสดงการยับยั้งโดยโปรตีนคล้ายแฟลกเจลลินที่มีต่อการเจริญของ *C. lunata* ที่ก่อโรคในกล้วยไม้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงกลไกการทำงานเพื่อยับยั้งราโดยโปรตีนนี้

จากการทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* N3 ในการต้านการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชหลายชนิด โดยทดสอบ *B. subtilis* N3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*) พบว่า *B. subtilis* N3 มีความสามารถในการยับยั้งราทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ *C. lunata*, *C. gloeosporioides*, *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. periferatum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora* ซึ่งทั้งหมดเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช และเมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 บนต้นกล้วยไม้ (*in vivo*) ทั้งสกุลช้างกระและสกุลหวาย พบว่าชุดทดสอบการป้องกันในต้นกล้วยไม้สายพันธุ์ช้างกระนั้น น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 ช่วยป้องกันการเกิดโรคราทั้งหมด 8 ชนิดในกล้วยไม้สายพันธุ์ช้างกระ แต่ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคราจาก *R. solani* ได้ ส่วนกล้วยไม้สกุลหวายนั้น พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 ช่วยป้องกันการเกิดโรคราจากรา 4 ชนิด ได้แก่ *F. oxysporum*, *F. periferatum*, *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora* ส่วนราที่เหลืออีก 5 ชนิด น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของเชื้อ *B. subtilis* N3 มีประสิทธิภาพในการป้องกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

สำหรับชุดทดสอบการรักษาในกล้วยไม้สกุลช้างกระ พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดี 7 ชนิด ซึ่งมีเฉพาะ *F. oxysporum* ที่น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 ยับยั้งได้เพียงเล็กน้อย ส่วนชุดทดสอบการรักษาในกล้วยไม้สกุลหวาย พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดี 5 ชนิด ได้แก่ *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora* ส่วนราที่เหลืออีก 4 ชนิด คือ *C. lunata*, *R. solani*, *F. periferatum*, และ *F. moniliforme* นั้น น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* N3 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

สำหรับการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสและโปรตีนที่บริสุทธิ์ที่ได้จาก *B. subtilis* N3 ต่อ *C. lunata* บนดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์สีขาวยุค (5N) และสายพันธุ์สีชมพู (ชมพูชากุระ) นั้น

พบว่า *C. lunata* ไม่ก่อให้เกิดโรคในดอกกล้วยไม้ทั้งสองสายพันธุ์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่า โปรตีนบริสุทธิ์และน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจาก *B. subtilis* N3 สามารถยับยั้งหรือป้องกันการเกิดโรคกับดอกกล้วยไม้ได้หรือไม่ ทั้งนี้การที่เราไม่สามารถก่อให้เกิดโรคกับดอกกล้วยไม้ได้นั้น อาจมีสาเหตุมาจากสายพันธุ์ดอกกล้วยไม้ที่นำมาใช้นั้น มีการปรับปรุงพันธุ์จนต้านทานต่อราชนิดนี้ หรือผู้ขายอาจมีการใช้สารเคมีบางอย่างที่อาจตกค้างและส่งผลกระทบต่อราที่ใช้ในการทดลองนี้

จากงานวิจัยทั้งหมดนี้พบว่า *P. aeruginosa* RS1 สามารถต้านการเจริญของ *P. palmivora* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคเน่าดำหรือโรคเน่าเข้าไส้ในกล้วยไม้ได้ จากผลการวิเคราะห์โปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก *P. aeruginosa* RS1 พบโปรตีนหลายชนิด ซึ่งโปรตีนที่พบมีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในกล้วยไม้ได้ ซึ่งได้แก่ แคทาเลส, โปรตีเอส และโปรตีนซึ่งยึดเกาะกับไคติน ทั้งนี้กลไกการยับยั้งอาจเกิดจากการทำงานของโปรตีนใดโปรตีนหนึ่ง หรือเกิดจากการทำงานร่วมกันของโปรตีนทั้งหมดก็ได้ ซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาให้แน่ชัดเพิ่มเติมต่อไป อีกแง่หนึ่ง การผลิตโปรตีนได้หลายชนิดที่สามารถยับยั้งราก่อโรคได้ ก็ถือเป็นข้อดีในการทำงานเพื่อเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งราก่อโรคได้เช่นกัน ดังเช่นก่อนหน้านี้มีรายงานว่า *P. aeruginosa* JO และ JO7 สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น β -1,3-กลูคาเนส, เซลลูเลส, โปรตีเอส, และไคติเนส ซึ่งสามารถนำไปใช้ร่วมกันเพื่อแสดงประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมการยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* และ *Alternaria solani* (Paramanandham และคณะ, 2017)

สำหรับ *B. subtilis* N3 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ โดยสารที่ *B. subtilis* N3 ผลิตได้นั้น คือ โปรตีนคล้ายแฟลกเจลลิน นอกจากนี้ *B. subtilis* N3 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้หลายชนิด เช่น *C. lunata*, *C. gloeosporioides*, *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. periferatum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora* และน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจากแบคทีเรียนี้ยังสามารถควบคุมการเจริญของราหลายชนิดที่ก่อโรคในกล้วยไม้ได้ด้วยเช่นกัน โดยมีการทดสอบทั้งชุดทดสอบการป้องกันและชุดทดสอบการรักษาในกล้วยไม้สกุลช้างกระและกล้วยไม้สกุลหวาย ซึ่งพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสจาก *B. subtilis* N3 สามารถป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจาก *P. aphanidermatum* และ *P. palmivora* ในกล้วยไม้ทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีเช่นกัน

ในงานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในกล้วยไม้ ประกอบไปด้วย *B. subtilis* N3 และ *P. aeruginosa* RS1 ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไป ทั้งในดินและอากาศ อีกทั้งยังเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์กับราที่ก่อโรคในพืชได้หลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่พบได้ทั่วไปและมีการวางจำหน่ายในท้องตลาดเพื่อไปยับยั้งเชื้อ

ก่อโรคในพืชได้หลายชนิด (Cawoy และคณะ, 2011, Donoso และคณะ, 2015) ส่วนแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* ถึงแม้จะมีรายงานว่าบางสายพันธุ์เป็นเชื้อก่อโรค แต่แบคทีเรียชนิดนี้ก็มีการรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้หลายชนิด และมีการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดเช่นเดียวกัน (Cawoy และคณะ, 2011) ดังนั้นแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวซึ่งสามารถผลิตสารประกอบทางชีวภาพประเภทโปรตีนหลายชนิดที่น่าจะเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและไม่ก่อให้เกิดโทษแก่ผู้ใช้ โดยจึงสามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เชิงพาณิชย์เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ทางการเกษตรแบบยั่งยืนได้ต่อไป อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จของการศึกษาถึงผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆเพิ่มเติมต่อไปด้วย และในด้านวิชาการนั้น ก็ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารชีวภาพแต่ละชนิดที่พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของรา ซึ่งอาจเริ่มด้วยการโคลนยีนและแสดงออกโปรตีนที่เกี่ยวข้อง แล้วนำไปทดสอบกับราก่อโรคแต่ละชนิดต่อไป



รายการอ้างอิง

- Akram W., Anjum T., Ahmad A. and Moeen R. (2016). First report of *Curvularia lunata* causing leaf spots on *Sorghum bicolor* from Pakistan. *Molecular Genetics and Genomics* 291: 1105-1115.
- Aktar S., Nasiruddin K. and Huq H. (2007). *In vitro* root formation in *Dendrobium* orchid plantlets with IBA. *Journal of Agriculture & Rural Development* 5: 48-51.
- Amersham (2002). Ion exchange chromatography, principles and methods. *Biosciences* 91: 970490-970493.
- Andersen J. B., Koch B., Nielsen T. H., Sorensen D., Hansen M., Nybroe O., Christophersen C., Sorensen J., Molin S. and Givskov M. (2003). Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology* 149: 37-46.
- Anjaiah V., Koedam N., Nowak-Thompson B., Loper J. E., Hofte M., Tambong J. T. and Cornelis P. (1998). Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn 5 derivatives toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 847-854.
- Arora N. K., Kim M. J., Kang S. C. and Maheshwari D. K. (2007). Role of chitinase and β -1, 3-glucanase activities produced by a fluorescent pseudomonad and *in vitro* inhibition of *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 207-212.
- Asano Y., Onishi H., Tajima K. and Shinozawa T. (2001). Flagellin as a biomarker for *Bacillus subtilis* strains; application to the DB9011 strain and the study of interspecific diversity in amino-acid sequences. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 65: 1218-1222.
- Barbe V., Cruveiller S., Kunst F., et al. (2009). From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* 155: 1758-1775.

- Bardas G. A., Lagopodi A. L., Kadoglidou K. and Tzavella-Klonari K. (2009). Biological control of three *Colletotrichum lindemuthianum* races using *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 and *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Biological Control* 49: 139-145.
- Barefoot S. F. and Klaenhammer T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 1808-1815.
- Basha S. and Ulaganathan K. (2002). Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science* 82: 1457-1463.
- Bassler B. L., Yu C., Lee Y. C. and Roseman S. (1991). Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *Journal of Biological Chemistry* 266: 24276-24286.
- Baxter A. P., Van Der Westhuizen G. C. A. and Eicker A. (1983). Morphology and taxonomy of south african isolates of *Colletotrichum*. *South African Journal of Botany* 2: 259-289.
- Bechinger C., Giebel K. F., Schnell M., Leiderer P., Deising H. B. and Bastmeyer M. (1999). Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* 285: 1896-1899.
- Benitez L. B., Velho R. V., Lisboa M. P., Da Costa Medina L. F. and Brandelli A. (2010). Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *The Journal of Microbiology* 48: 791-797.
- Benyon F., Summerell B. A. and Burgess L. W. (1996). Association of *Fusarium* species with root rot of *Cymbidium* orchids. *Australasian Plant Pathology* 25: 226-228.
- Berg J. M., Tymoczko J. L. and Stryer L. (2002). The purification of proteins is an essential first step in understanding their function. *Biochemistry* 5: 20.
- Bjorsell P., Edin E. and Viketoft M. (2017). Interactions between some plant-parasitic nematodes and *Rhizoctonia solani* in potato fields. *Applied Soil Ecology* 113: 151-154.
- Bollag D. M. (1994). Ion-exchange chromatography. *Peptide Analysis Protocols*, (Dunn BM and Pennington MW, eds.), pp. 11-22. Humana Press, Totowa, New Jersey.

- Bottom S. (2017 a). Orchid Pests and Diseases Diagnosis, Treatment and Prevention. Web page, Phelps Farm Orchids, United States, Available on 9th May 2017.
- Bottom S. (2017 b). Root Rot Caused by Rhizoctonia. Web page, St. Augustine Orchid Society, United States, Available on 9th May 2017.
- Bowman S. M. and Free S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28: 799-808.
- Brunskole M., Zorko K., Kerbler V., Martens S., Stojan J., Gobec S. and Rizner T. L. (2009). Trihydroxynaphthalene reductase of *Curvularia lunata*-A target for flavonoid action? *Chemico-Biological Interactions* 178: 259-267.
- Buysens S., Heungens K., Poppe J. and Hofte M. (1996). Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 865-871.
- Caldeira A. T., Feio S. S., Arteiro J. M. S. and Roseiro J. C. (2006). Antimicrobial activity of steady-state cultures of *Bacillus* sp. CCMI 1051 against wood contaminant fungi. *Biochemical Engineering Journal* 30: 231-236.
- Caldeira A. T., Arteiro J. M. S., Coelho A. V. and Roseiro J. C. (2011). Combined use of LC-ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051. *Process Biochemistry* 46: 1738-1746.
- Calvo H., Marco P., Blanco D., Oria R. and Venturini M. E. (2017). Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology* 63: 101-110.
- Cating R., Palmateer A., Stiles C. and Rayside P. (2010). Black rot of orchids caused by *Phytophthora cactorum* and *Phytophthora palmivora* in Florida. *Plant Health Progress*.
- Cawoy H., Ongena M., Fickers P. and Bettioli W. (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases. INTECH Open Access Publisher.
- Chang E., Pourmal S., Zhou C., Kumar R., Teplova M., Pavletich N. P., Mariani K. J. and Erdjument-Bromage H. (2016). N-terminal amino acid sequence determination of proteins by N-terminal dimethyl labeling: pitfalls and advantages when

- compared with Edman degradation sequence analysis. *Journal of biomolecular techniques* 27: 61.
- Chang W. T., Chen Y. C. and Jao C. L. (2007). Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource Technology* 98: 1224-1230.
- Chee K. (1974). Hosts of *Phytophthora palmivora*. *Phytophthora Disease of Cocoa PH Gregory, ed.*
- Chelikani P., Fita I. and Loewen P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 192-208.
- Chemeltorit P. P., Mutaqin K. H. and Widodo W. (2017). Combining *Trichoderma hamatum* THSW13 and *Pseudomonas aeruginosa* BJ10–86: a synergistic chili pepper seed treatment for *Phytophthora capsici* infested soil. *European Journal of Plant Pathology* 147: 157-166.
- Chia T. F., Lim A. Y. H., Luan Y. and Ng I. (2001). Transgenic *Dendrobium* (Orchid). *Transgenic Crops III*, (Bajaj YPS, ed.) p. 95-106. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Chowdappa P., Chethana C. S., Bharghavi R., Sandhya H. and Pant R. P. (2012). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. isolates causing anthracnose of orchids in India. *Journal of Biotechnology Bioinformatics and Bioengineering* 2: 567-572.
- Cottrell J. S. and London U. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *electrophoresis* 20: 3551-3567.
- Cui R. and Sun X. (2016). First report of *Curvularia lunata* causing leaf spot on lotus in China. *Plant Disease* 100: 652-652.
- Cummins P. M., Dowling O. and O'Connor B. F. (2011). Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. *Methods in Molecular Biology* 681: 215-228.
- Cutler P. (2004). *Protein purification protocols*. Springer Science & Business Media.

- Da Silva J. A. T., Aceto S., Liu W., Yu H. and Kanno A. (2014). Genetic control of flower development, color and senescence of *Dendrobium* orchids. *Scientia Horticulturae* 175: 74-86.
- Davies K. G. (2009). Understanding the interaction between an obligate hyperparasitic bacterium, *Pasteuria penetrans* and its obligate plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne* spp. *Advances in parasitology* 68: 211-245.
- De Cara-Garcia M., Perez-Hernandez A., Aguilera-Lirola A. and Gomez-Vazquez J. M. (2017). First report of wilting, root rot and stunting caused by *Pythium aphanidermatum* on sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) in southeastern Spain. *Plant Disease*.
- De Weger L. A., Van Boxtel R., Van der Burg B., Gruters R. A., Geels F. P., Schippers B. and Lugtenberg B. (1986). Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant-growth-stimulating, root-colonizing *Pseudomonas* spp. *Journal of bacteriology* 165: 585-594.
- Deutscher M. P. (1990). *Guide to protein purification*. Gulf Professional Publishing.
- Domenech B., Bastos-Arrieta J., Alonso A., Macanas J., Munoz M. and Muraviev D. N. (2012). Bifunctional polymer-metal nanocomposite ion exchange materials. *Ion Exchange Technologies*, (Kilislioglu A, ed.) p. App. 3. InTech, Rijeka.
- Domon B. and Aebersold R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312: 212.
- Donoso E., Lobos G. and Escobar P. (2015). Products of Bionativa. *Bionativa Chile*.
- Dowling D. N. and O'Gara F. (1994). Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology* 12: 133-141.
- Dursun D. and Sengul F. (2006). Waste minimization study in a solvent-based paint manufacturing plant. *Resources, Conservation and Recycling* 47: 316-331.
- Eilenberg J., Hajek A. and Lomer C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387-400.
- Falcao Salles J., Le Roux X. and Poly F. Relating phylogenetic and functional diversity proxies among denitrifiers and quantifying their capacity to predict community functioning.

- Figueredo M. S., Tonelli M. L., Ibanez F., Morla F., Cerioni G., Del Carmen Tordable M. and Fabra A. (2017). Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plants challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6 1 4 4 . *Microbiological research* 197: 65-73.
- Folders J., Tommassen J., Van Loon L. C. and Bitter W. (2000). Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 182: 1257-1263.
- Folders J., Algra J., Roelofs M. S., Van Loon L. C., Tommassen J. and Bitter W. (2001). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* chitinase, a gradually secreted protein. *Journal of bacteriology* 183: 7044-7052.
- Fukuta S., Takahashi R., Kuroyanagi S., Miyake N., Nagai H., Suzuki H., Hashizume F., Tsuji T., Taguchi H. and Watanabe H. (2013). Detection of *Pythium aphanidermatum* in tomato using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with species-specific primers. *European journal of plant pathology* 136: 689-701.
- Gajera H. P., Savaliya D. D., Hirapara D. G., Patel S. V. and Golakiya B. A. (2016). Biocontrol mechanism of *Bacillus* for *Fusarium* Wilt management in cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices*, (Kumar P, Gupta VK, Tiwari AK and Kamle M, eds.), p. 29-47. Springer International Publishing, Cham.
- Gao J., Prlic A., Bi C., Bluhm W. F., Dimitropoulos D., Xu D., Bourne P. E. and Rose P. W. (2017a). BioJava-ModFinder: identification of protein modifications in 3D structures from the Protein Data Bank. *Bioinformatics (Oxford, England)*.
- Gao S. G., Xuan N., Li Y. Y., Fu K. H., Yu C. J., Gao J. X., Meng W., Li Y. Q. and Jie C. (2017b). Sod gene of *Curvularia lunata* is associated with the virulence in maize leaf. *Journal of Integrative Agriculture* 16: 874-883.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S. E., Wilkins M. R., Appel R. D. and Bairoch A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, (Walker JM, ed.) p. 571-607. Humana Press, Totowa, NJ.

- Gibb S. and Strimmer K. (2017). Mass spectrometry analysis using MALDIquant. *Statistical Analysis of Proteomics, Metabolomics, and Lipidomics Data Using Mass Spectrometry*, (Datta S and Mertens BJA, eds.), pp. 101-124. Springer International Publishing, Cham.
- Guerriero G., Avino M., Zhou Q., Fugelstad J., Clergeot P. H. and Bulone V. (2010). Chitin synthases from *Saprolegnia* are involved in tip growth and represent a potential target for anti-oomycete drugs. *PLoS Pathogens* 6: e1001070.
- Habibi R., Tarighi S., Behravan J., Taheri P., Kjoller A. H., Brejnrod A., Madsen J. S. and Sorensen S. J. (2017). Whole-genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* EK007-RG4, a promising biocontrol agent against a broad range of bacteria, including the fire blight bacterium *Erwinia amylovora*. *Genome Announcements* 5.
- Han M., Lee H. R., Choi M. N., Lee H., Lee S. W. and Park E. J. (2017). First report of *Fusarium solani* causing soft rot on the tuber of *Gastrodia elata* in Korea. *Plant Disease*.
- Hark I. (2017). Rhizoctonia. Web page, Hark-Orchideen - Competence in Orchids, Germany, Available on 9th May 2017.
- Hegedus N. and Marx F. (2013). Antifungal proteins: more than antimicrobials? *Fungal biology reviews* 26: 132-145.
- Hew C. (1994). Orchid cut-flower production in ASEAN countries. *Orchid Biology: reviews and perspectives* 6: 363-401.
- Hirpara D. G., Gajera H. P., Bhimani R. D. and Golakiya B. A. (2016). The SRAP based molecular diversity related to antifungal and antioxidant bioactive constituents for biocontrol potentials of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Scc. *Current Genetics* 62: 619-641.
- Hou X., Boyetchko S. M., Brkic M., Olson D., Ross A. and Hegedus D. (2006). Characterization of the anti-fungal activity of a *Bacillus* spp. associated with sclerotia from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 644-653.

- Huang X. Q., Zhang N., Yong X. Y., Yang X. M. and Shen Q. R. (2012). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiological research* 167: 135-143.
- Hughes H. (1995). Why have East Asian countries led economic development? *Economic Record* 71: 88.
- Iftikhar S., Shahid A. A., Nawaz K. and Ali S. W. (2016). First report of *Curvularia lunata* causing fruit rot of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in Pakistan. *Plant Disease* 100: 1013.
- Imperiali N., Dennert F., Schneider J., Laessle T., Velatta C., Fesselet M., Wyler M., Mascher F., Mavrodi O. and Mavrodi D. (2017). Relationships between root pathogen resistance, abundance and expression of *Pseudomonas* antimicrobial genes, and soil properties in representative swiss agricultural soils. *Frontiers in Plant Science* 8.
- Iswandi A., Bossier P., Vandenaabeele J. and Verstraete W. (1987). Effect of seed inoculation with the rhizopseudomonad strain 7NSK2 on the root microbiota of maize (*Zea mays*) and barley (*Hordeum vulgare*). *Biology and Fertility of Soils* 3: 153-158.
- Jamal Q., Cho J. Y., Moon J. H. and Kim K. Y. (2017). Purification and antifungal characterization of cyclo (d-Pro-l-Val) from *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 against *Fusarium graminearum* to control head blight in wheat. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 10: 141-147.
- Jiang C., Shi J., Liu Y. and Zhu C. (2014). Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. *Food Control* 35: 41-48.
- Jing L., Tao W., Ai-rui S. and Han-wen N. (2013). Evaluation of *Curvularia lunata* strain B6 as a potential mycoherbicide to control barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Journal of Integrative Agriculture* 12: 1201-1207.
- Jungbauer A. and Hahn R. (2009). Chapter 22 ion-exchange chromatography. *Methods in Enzymology*, Vol. Volume 463 (Richard RB and Murray PD, eds.), p. 349-371. Academic Press.
- Kamboj R., Tiwari I. M., Botella J. R., Sharma V. and Sharma T. R. (2017). Novel chitinase gene LOC_Os11g47510 from indica rice Tetep provides enhanced resistance

- against sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* in rice. *Frontiers in Plant Science* 8: 596.
- 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.
- Khan A. F., Liu Y. and Khan M. F. (2017). Efficacy and safety of generic azoxystrobin at controlling *Rhizoctonia solani* in sugar beet. *Crop Protection* 93: 77-81.
- Kim P. I., Ryu J., Kim Y. H. and Chi Y. T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 138-145.
- Kim S. Y., Lee S. Y., Weon H. Y., Sang M. K. and Song J. (2017). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* M75, a biocontrol agent against fungal plant pathogens, isolated from cotton waste. *Journal of Biotechnology* 241: 112-115.
- Kim W. G., Lee B. D., Kim W. S. and Cho W. D. (2002). Root rot of moth orchid caused by *Fusarium* spp. *The Plant Pathology Journal* 18: 225-227.
- Kim Y. C., Jung H., Kim K. Y. and Park S. K. (2008). An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 120: 373-382.
- Kishore G. K., Pande S. and Podile A. (2005). Biological control of collar rot disease with broad-spectrum antifungal bacteria associated with groundnut. *Canadian Journal of Microbiology* 51: 123-132.
- Koehler A. M., Lookabaugh E. C., Shew B. and Shew H. D. (2017). First report of *Pythium* root rot of stevia caused by *Pythium myriotylum*, *Pythium irregulare*, and *Pythium aphanidermatum* in North Carolina. *Plant Disease*.
- Komoriya K., Shibano N., Higano T., Azuma N., Yamaguchi S. and Aizawa S. I. (1999). Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology* 34: 767-779.

- Kumar A., Badhhan M., Jha K. and Mohan A. Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria isolated from soil contaminated with oil. *Unpublished*.
- Kumar R. S., Ayyadurai N., Pandiaraja P., Reddy A. V., Venkateswarlu Y., Prakash O. and Sakthivel N. (2005). Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *Journal of applied microbiology* 98: 145-154.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laurence M. H., Howard C., Summerell B. A. and Liew E. C. Y. (2016). Identification of *Fusarium solani* f.sp. *phalaenopsis* in Australia. *Australasian Plant Disease Notes* 11: 15.
- Lee J. Y., Moon S. S. and Hwang B. K. (2003). Isolation and *in vitro* and *in vivo* activity against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare* of phenazine-1-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain GC-B26. *Pest management science* 59: 872-882.
- 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.
- Leifert C., Li H., Chidburee S., Hampson S., Workman S., Sigee D., Epton H. A. and Harbour A. (1995). Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Journal of Applied Bacteriology* 78: 97-108.
- Levy E., Eyal Z., Chet I. and Hochman A. (1992). Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40: 163-171.

- Lewinstein I., Matalon S., Slutzkey S. and Weiss E. I. (2005). Antibacterial properties of aged dental cements evaluated by direct-contact and agar diffusion tests. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 93: 364-371.
- Li J., Yang Q., Zhao L. H., Zhang S. M., Wang Y. X. and Zhao X. Y. (2009). Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 10: 264-272.
- Li L. H., Ma J. C., Li Y., Wang Z. Y., Gao T. T. and Wang Q. (2012). Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. *Crop Protection* 35: 29-35.
- Liu N., Zhang S., Zhang W. and Li C. (2017). *Vibrio* sp. 33 a potential bacterial antagonist of *Vibrio splendidus* pathogenic to sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Aquaculture* 470: 68-73.
- Liu Y., Tao J., Yan Y. J., Li B., Li H. and Li C. (2011). Biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an antifungal chitinase. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 19: 128-134.
- Liu Y. F., Chen Z. Y., Ng T. B., Zhang J., Zhou M. G., Song F. P., Lu F. and Liu Y. Z. (2007). Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Peptides* 28: 553-559.
- LMU-Munich Team (2012). Isolation of genomic DNA from *Bacillus* (for PCR). Web page, ludwig maximilian university of munich, Munich, Available on 29th May 2017.
- Lodhi A. M., Khanzada M. A., Shahzad S., Ghaffar A. and Lévesque C. (2013). Prevalence of *Pythium aphanidermatum* in agro-ecosystem of Sindh province of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 45: 635-642.
- Lugtenberg B. and Kamilova F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology* 63: 541-556.
- Luo Y., Sun L., Zhu Z., Ran W. and Shen Q. (2013). Identification and characterization of an anti-fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* protease from the *Bacillus subtilis* strain N7. *Journal of Microbiology* 51: 359-366.
- Ma Z., Hua G. K. H., Ongena M. and Hofte M. (2016). Role of phenazines and cyclic lipopeptides produced by *pseudomonas* sp. CMR1 2 a in induced systemic resistance on rice and bean. *Environmental Microbiology Reports* 8: 896-904.

- Maketon C., Tongjib Y., Patipong T., Meechareon N., Rungratanaubon T. and Maketon M. (2015). Greenhouse evaluations of harpin protein and microbial fungicides in controlling *Curvularia lunata*, *Fusarium moniliforme*, and *Phytophthora palmivora*, major causes of orchid diseases in Thailand. *Life Science Journal* 12.
- Markakis E. A., Tzima A. K., Palavouzis S. C., Antoniou P. P., Paplomatas E. J. and Tjamos E. C. (2017). First report of *Phytophthora palmivora* causing fruit rot on pomegranate in Greece. *Plant Disease* PDIS-11-16-1691-PDN.
- Massengale A. R. D., Ollar R. A., Giordano S. J., Felder M. S. and Aronoff S. C. (1999). Use of the paraffin wax baiting system for identification of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 35: 177-183.
- 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.
- Mavrodi D. V., Bonsall R. F., Delaney S. M., Soule M. J., Phillips G. and Thomashow L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology* 183: 6454-6465.
- McLafferty F. W. (1981). Tandem mass spectrometry. *Science* 214: 280.
- Mohd J., Ahmad K., Parejko J. A., Paulitz T. C., Weller D. M. and Thomashow L. S. (2017). Sensitivity of *Rhizoctonia* isolates to phenazine-1-carboxylic acid and biological control by phenazine-producing *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*.
- 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 & Biodegradation* 55: 261-269.
- Morales D. K., Jacobs N. J., Rajamani S., Krishnamurthy M., Cubillos-Ruiz J. R. and Hogan D. A. (2010). Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. *Molecular microbiology* 78: 1379-1392.

- Morris K., Langston D., Dutta B., Davis R., Timper P., Noe J. and Dickson D. (2016). Evidence for a disease complex between *Pythium aphanidermatum* and root-knot nematodes in cucumber. *Plant Health Progress* 17: 200-201.
- Munoz Z., Moret A. and Garces S. (2009). Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. *Crop Protection* 28: 36-40.
- Nelson S. C. (2008). *Mango anthracnose (Colletotrichum gloeosporioides)*. University of Hawaii at Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources, Cooperative Extension Service.
- Oda K. (2012). New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *The Journal of Biochemistry* 151: 13-25.
- Ogoshi A. (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annual review of phytopathology* 25: 125-143.
- Ohara T. and Tsuge T. (2004). FoSTUA, encoding a basic helix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cell* 3: 1412-1422.
- Ohno A., Ano T. and Shoda M. (1995). Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* Rb14, in solid state fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80: 517-519.
- Ongena M. and Jacques P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* 16: 115-125.
- Orlando J. and Neilands J. (1982). *Ferrichrome compounds as a source of iron for higher plants*. Karger Publishers, Chemistry and biology of hydroxamic acids.
- Orlikowski L. and Szkuta G. (2006). *Phytophthora* rot of some orchids—new disease in Poland. *Phytopathologia Polonica* 40: 57-61.
- Ouedraogo J. P., Hagen S., Spielvogel A., Engelhardt S. and Meyer V. (2011). Survival strategies of yeast and filamentous fungi against the antifungal protein AFP. *Journal of Biological Chemistry* 286: 13859-13868.
- Pal K. K. and Gardener B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor* 2: 1117-1142.

- Paramanandham P., Rajkumari J., Pattnaik S. and Busi S. (2017). Biocontrol potential against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Alternaria solani* and tomato plant growth due to plant growth-promoting *Rhizobacteria*. *International Journal of Vegetable Science* 1-10.
- Patra D. D. (2012). Production, purification, and characterization of antifungal metabolite from *Pseudomonas aeruginosa* SD12, a new strain obtained from tannery waste polluted soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 674-683.
- Pedersen H. A. and Ormerod P. (2009). Notes on the orchid flora of Thailand (I). *Taiwania* 54: 213-218.
- Pornpienpakdee P., Singhasurasak R., Chaiyasap P., Pichyangkura R., Bunjongrat R., Chadchawan S. and Limpanavech P. (2010). Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. *Scientia Horticulturae* 124: 490-499.
- Powell J., Vargas Jr J., Nair M., Detweiler A. and Chandra A. (2000). Management of dollar spot on creeping bentgrass with metabolites of *Pseudomonas aureofaciens* (TX-1). *Plant Disease* 84: 19-24.
- Powell P., Szaniszlo P., Cline G. and Reid C. (1982). Hydroxamate siderophores in the iron nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition* 5: 653-673.
- Prapagdee B., Akrapikulchart U. and Mongkolsuk S. (2008). Potential of a soil-borne *Streptomyces hygroscopicus* for biocontrol of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in orchid. *Journal of Biological Sciences* 8: 1187-1192.
- Rai A., Rai P. K. and Singh S. (2017). *Exploiting beneficial traits of plant-associated fluorescent Pseudomonads for plant health*. Springer, Agro-Environmental Sustainability.
- Ram D., Devi T. P., Kamil D., Tyagi A. and Sekhar V. C. (2017). A Combined Morpho-Molecular approach towards identification of *Curvularia* species. *Annals of Plant Protection Sciences* 25: 144-151.
- Reim D. F. and Speicher D. W. (2001). N-terminal sequence analysis of proteins and peptides. *Current Protocols in Protein Science* **Chapter** 11: Unit 11.10.

- Ren J. J., Shi G. L., Wang X. Q., Liu J. G. and Wang Y. N. (2013). Identification and characterization of a novel *Bacillus subtilis* strain with potent antifungal activity of a flagellin-like protein. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29: 2343-2352.
- Riva S., Islam A. and Hoque M. (2017). *In vitro* regeneration and rapid multiplication of *Dendrobium bensoniae*, an indigenous ornamental orchid. *The Agriculturists* 14: 24-31.
- Roe S. (2001). *Protein purification techniques: a practical approach*. Oxford University Press Oxford, UK.
- Runkle E., Wang Y., Blanchard M. and Lopez R. (2005). The orchid grower. *Greenhouse Grower* 23: 64-70.
- Sakdapetsiri C., Fukuta Y., Aramsirujitwet Y., Shirasaka N. and Kitpreechavanich V. (2016). Antagonistic activity of endo- β -1, 3-glucanase from a novel isolate, *Streptomyces* sp. 9 X1 6 6 , against black rot in orchids. *Journal of basic microbiology*.
- Salomon M. V., Funes Pinter I., Piccoli P. and Bottini R. (2017). Use of plant growth-promoting rhizobacteria as biocontrol agents: induced systemic resistance against biotic stress in plants. *Microbial Applications Volume2: Biomedicine, Agriculture and Industry*, Vol. 2 (Kalia VC, ed.) p. 133-152. Springer International Publishing, Cham.
- Saravanakumar D., Ciavarella A., Spadaro D., Garibaldi A. and Gullino M. L. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology* 49: 121-128.
- Sasirekha B. and Srividya S. (2016). Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6 , a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agriculture and Natural Resources* 50: 250-256.
- Sathi Reddy K., Yahya Khan M., Archana K., Gopal Reddy M. and Hameeda B. (2016). Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas*

- aeruginosa* DR1 towards its application as biocontrol agent. *Bioresource Technology* 221: 291-299.
- Schmourlo G., Mendonca-Filho R. R., Alviano C. S. and Costa S. S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 563-568.
- Scopes R. K. (2013). *Protein purification: principles and practice*. Springer Science & Business Media.
- Seidenfaden G. and Smitinand T. (1959). The orchids of Thailand: a preliminary list. Parts I and II, 1. *The orchids of Thailand: a preliminary list Parts I and II, 1*.
- Selkirk C. (2004). *Ion-exchange chromatography*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Shanahan P., O'Sullivan D. J., Simpson P., Glennon J. D. and O'Gara F. (1992). Isolation of 2, 4 - Diacetylphloroglucinol from a Fluorescent Pseudomonad and Investigation of Physiological Parameters Influencing Its Production. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 353-358.
- Sharma S., Singh P. B., Chadha P. and Saini H. S. (2017). Chlorpyrifos pollution: its effect on brain acetylcholinesterase activity in rat and treatment of polluted soil by indigenous *Pseudomonas* sp. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 381-387.
- Shrivastava A., Tadepalli K., Goel G., Gupta K. and Kumar Gupta P. (2017). Melanized fungus as an epidural abscess: a diagnostic and therapeutic challenge. *Medical Mycology Case Reports* 16: 20-24.
- Singh K., Ihlenfeld C., Oates C., Plant J. and Voulvoulis N. (2011). Developing a screening method for the evaluation of environmental and human health risks of synthetic chemicals in the mining industry. *International Journal of Mineral Processing* 101: 1-20.
- Sowanpreecha R. and Rerngsamran P. (2010). Optimization conditions for bacteria to produce active compound to inhibit the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Curvularia lunata* that caused disease in orchid. *The 7th Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus Conference* 822-829.

- Spadaro A. C. C., Assis-Pandochi A. I., Lucisano-Valim Y. M. and Rothschild Z. (2003). Salt fractionation of plasma proteins: A procedure to teach principles of protein chemistry. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31: 249-252.
- Sriwati R., Melnick R. L., Muarif R., Strem M. D., Samuels G. J. and Bailey B. A. (2015). *Trichoderma* from Aceh Sumatra reduce *Phytophthora* lesions on pods and cacao seedlings. *Biological Control* 89: 33-41.
- Stein T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology* 56: 845-857.
- Streda T., Kredl Z., Pokorny R. and Sangchote S. (2013). Effect of wetting period on infection of orchid flowers by *Alternaria alternata* and *Curvularia eragrostidis*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 41: 1-8.
- Subhani M. N. (2016). *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (Peronosporales: Pythiaceae): A review of life history, evolutionary status of pathogen, host range, mating types, symptomology, disease cycle, means of dispersal, extent of losses, and management. *Journal of Global Agriculture and Ecology* 5: 108-126.
- Suchismita C., Mukherjee S., Jayanta T. and Roy S. (2016). Biocontrol and plant growth promoting activity of bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* KUCd1 in *Phytophthora* rot of brinjal (*Solanum melongena* L.) caused by *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan under *in vivo* conditions. *Journal of Mycopathological Research* 54: 229-237.
- Sumi C. D., Yang B. W., Yeo I. C. and Hahm Y. T. (2014). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology* 61: 93-103.
- Tann H. and Soyong K. (2017). Biological control of brown leaf spot disease caused by *Curvularia lunata* and field application method on rice variety IR66 in Cambodia. *Agrivita* 39: 111.
- Thammasiri K. (2007). Cryopreservation of some Thai orchid species. *International Workshop on Ornamental Plants* 788 53-62.
- Tomassen J., Filloux A., Bally M., Murgier M. and Lazdunski A. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 103: 73-90.

- Torres M. J., Perez Brandan C., Sabate D. C., Petroselli G., Erra-Balsells R. and Audisio M. C. (2017). Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biological Control* 105: 93-99.
- Tsai H. L., Huang L. C., Ann P. J. and Liou R. F. (2006). Detection of orchid *Phytophthora* disease by nested PCR. *Botanical Studies* 47.
- Uchida J. (1994). Diseases of orchids in Hawaii. *Plant Disease* 78: 220-224.
- Vadivel T. and Sathurappan N. Biosurfactant producing *Pseudomonas*. *Unpublished*.
- Valentine N., Wunschel S., Wunschel D., Petersen C. and Wahl K. (2005). Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 58-64.
- Valot B., Rohmer L., Jacobs M. A., Miller S. I., Bertrand X. and Hocquet D. (2014). Comparative genomic analysis of two multidrug-resistant clinical isolates of ST395 epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* obtained 12 years apart. *Genome Announcements* 2.
- Verma V. C. and Kharwar R. N. (2006). Efficacy of neem leaf extract against its own fungal endophyte *Curvularia lunata*. *Journal of Agricultural Technology* 2: 329-335.
- Wang F. and Zhang Q. (2017). *In vitro* inhibition of *Saprolegnia* sp. by an antifungal peptide from *Pseudomonas protegens* XL03. *North American Journal of Aquaculture* 79: 168-175.
- Wang S. L. and Chang W. T. (1997). Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 380-386.
- Wang S. L., Pai C. S. and Shieh S. T. (1995a). Production of lytic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* M-1001. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China Part B, Life sciences* 19: 216-224.
- Wang S. L., Shieh S. T. and Pai C. S. (1995b). Production, purification and characterization of two proteinaceous hen-egg-white lysozyme inhibitors from *Pseudomonas*

- aeruginosa* M-1001. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China Part B, Life sciences* 19: 166-175.
- Wanga S. L., Yieh T. C. and Shih I. L. (1999). Purification and characterization of a new antifungal compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 439-446.
- Watanabe T., Oyanagi W., Suzuki K. and Tanaka H. (1990). Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *Journal of bacteriology* 172: 4017-4022.
- Watanabe T., Kimura K., Sumiya T., Nikaidou N., Suzuki K., Suzuki M., Taiyaji M., Ferrer S. and Regue M. (1997). Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. *Journal of bacteriology* 179: 7111-7117.
- Wei L. W., Wei M., Bing Z. Y., You D. C. and Feng L. (2008). Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. *Agricultural Sciences in China* 7: 1104-1114.
- Weir B. S., Johnston P. R. and Damm U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.
- Williams A. and Frasca V. (2001). *Ion-exchange chromatography*. John Wiley & Sons, Inc., Current Protocols in Protein Science.
- Wingfield P. (2001). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current protocols in protein science* A. 3F. 1-A. 3F. 8.
- Xia Y., Deng X., Zhou P., Shima K. and Da Silva J. A. T. (2006). The world floriculture industry: dynamics of production and markets. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume IV, Global Science Books UK*.
- Xing Y. M., Li X. D., Liu M. M., Zhang G., Wang C. L. and Guo S. X. (2015). Morphological and enzymatical characterization of the infection process of *Pythium ultimum* in *Dendrobium officinale* (orchidaceae). *Cryptogamie, Mycologie* 36: 275-286.
- Xiong J., Deraspe M., Iqbal N., Krajden S., Chapman W., Dewar K. and Roy P. H. Complete genome of pan-resistant *P. aeruginosa* isolated from a patient with respiratory failure in a Canadian community hospital. *Unpublished*.

- Ye Y. F., Li Q. Q., Fu G., Yuan G. Q., Miao J. H. and Lin W. (2012). Identification of antifungal substance (Iturin A(2)) produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on southern corn leaf blight. *Journal of Integrative Agriculture* 11: 90-99.
- Yen Y. H., Li P. L., Wang C. L. and Wang S. L. (2006). An antifungal protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* M-1001 with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 311-317.
- Yu H. and Goh C. J. (2001). Molecular genetics of reproductive biology in orchids. *Plant Physiology* 127: 1390-1393.
- Zentmyer G., Mitchell D., Jefferson L., Roheim J. and Carnes D. (1973). Distribution of mating types of *Phytophthora palmivora*. *Phytopathology* 63: 10.1094.
- Zhang M., Cheng S. T., Wang H. Y., Wu J. H., Luo Y. M., Wang Q., Wang F. X. and Xia G. X. (2017a). iTRAQ-based proteomic analysis of defence responses triggered by the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia solani* in cotton. *Journal of Proteomics* 152: 226-235.
- Zhang W., Liu J., Huo P. and Nan Z. (2017b). *Curvularia lunata* causes a leaf spot on carpetgrass (*Axonopus compressus*) in China. *Plant Disease* PDIS-09-16-1354-PDN.
- Zhao X., Zhao X., Wei Y., Shang Q. and Liu Z. (2013a). Isolation and identification of a novel antifungal protein from a rhizobacterium *Bacillus subtilis* strain F3. *Journal of Phytopathology* 161: 43-48.
- Zhao X., Zhou Z. J., Han Y., Wang Z. Z., Fan J. and Xiao H. Z. (2013b). Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. *Microbiological research* 168: 598-606.
- Zhao Y., Yang L. N., Wang X. M., Bai Q. R. and Li Y. (2017). *Gastrodia elata* tuber rot caused by *Fusarium oxysporum*, a new disease in Jilin province, China. *Plant Disease* 101: 633-633.
- Zhao Z. Z., Wang Q. S., Wang K. M., Brian K., Liu C. H. and Gu Y. C. (2010). Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology* 101: 292-297.

- Zhu Y. J., Agbayani R., Jackson M. C., Tang C. and Moore P. H. (2004). Expression of the grapevine stilbene synthase gene VST1 in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora*. *Planta* 220: 241-250.
- กนิษฐกา แदनราช (2553). สารต้านราก่อโรคจาก *Bacillus* sp. N1 ต่อ *Curvularia* sp. ที่คัดแยกจากปทุมมา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต Thesis, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.
- คงยุทธ เลิศมงคลธรรม (2549). การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งราที่ก่อโรคพืช. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ระดับปริญญาบัณฑิต Thesis, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.
- ครรชิต ธรรมศิริ (2547). เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อัมรินทร์พรินติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.
- ณัฏฐา คุณชัยประเสริฐ (2557). การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. M10 ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคในมะเขือเทศ. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ระดับปริญญาบัณฑิต Thesis, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.
- ทิพย์ศิรา ทองพิลา (2553). การคัดเลือกแบคทีเรียและการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารต้านรา *Bipolaris* sp. ที่ก่อโรคในพืช. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ระดับปริญญาบัณฑิต Thesis, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.
- ธนพัฒน์ อธิกิจ (2556). การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. M10 ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคในมะเขือเทศ. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ระดับปริญญาบัณฑิต Thesis, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.
- ธานี กุลแพทย์ (2556). อนาคตส่งออกกล้วยไม้ไทยเน้นคุณภาพ-สร้างมูลค่าเพิ่ม. คมชัดลึก, กรุงเทพฯ.
- ประภาศรี ศรีคง (2552). การแยกและฤทธิ์ของโปรตีนต้านราก่อโรคในมะเขือเทศจาก *Bacillus* sp. M10. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต Thesis, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.
- พรทิพา ทัพไทย (2553). การคัดเลือกแบคทีเรียและการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารต้านรา *Colletotrichum* sp. ที่ก่อโรคในพืช. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ระดับปริญญาบัณฑิต Thesis, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.

- รพีวรรณ โสวรรณปรีชา (2553). สารออกฤทธิ์จากแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราก่อโรคในกล้วยไม้ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Curvularia lunata*. วิทยานิพนธ์ปริญญา
มหาบัณฑิต Thesis, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.
- สมบัติ รักไพบูลย์สมบัติ (2540). ปลุกเลี้ยงกล้วยไม้จากประสบการณ์. ธรรมสาร, กรุงเทพฯ.
- สุดารัตน์ นุชวงษ์ (2556). การทำบริสุทธิ์โปรตีนต้านราก่อโรคพืช *Bipolaris* sp. จาก *Bacillus subtilis* N3. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต Thesis, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ภาควิชาจุล
ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.
- อุไร จิรมงคลการ (2548). มือใหม่หัดปลูกกล้วยไม้. บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

1. อาหารแข็ง Nutrient Agar (NA)

แบคโตเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ผสมสารตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 N NaOH แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDB (Potato Dextrose Broth)	24	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำปราศจากไอออนปริมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าประมาณ 5.1-5.3 แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารแข็ง V8

Original 100% vegetable juice (V8, USA)	50	มิลลิลิตร
---	----	-----------

ผสมสารน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 N NaOH แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลว Nutrient Broth (NB)

แบคโตเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม

ผสมสารตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 N NaOH แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเหลว Luria Bertani Broth (LB)

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม

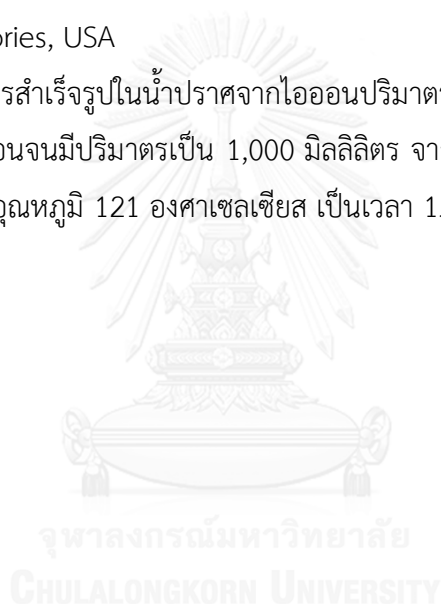
ผสมสารตามลำดับในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 N NaOH แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB)

อาหารสำเร็จรูป TSB (tryptic soy broth)	30	กรัม
--	----	------

Difco Laboratories, USA

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7 แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข

1. กลีเซอรอล 15%

กลีเซอรอล 87 เปอร์เซ็นต์	17.24 มิลลิลิตร
--------------------------	-----------------

น้ำปราศจากไอออน	82.76 มิลลิลิตร
-----------------	-----------------

ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย 0.1% Tween 20

Tween 20	100 ไมโครลิตร
----------	---------------

น้ำปราศจากไอออน	100 มิลลิลิตร
-----------------	---------------

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์

สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์	50 มิลลิลิตร
---------------------------------	--------------

น้ำปราศจากไอออน	50 มิลลิลิตร
-----------------	--------------

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชา

4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์	40 กรัม
-------------------	---------

น้ำปราศจากไอออน	1000 มิลลิลิตร
-----------------	----------------

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชา

5. สารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5

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

ละลายในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เข้ากัน และวัดค่า pH ให้เท่ากับ 7.5 เติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้ให้นำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์

6. กระจกโตะไลซ์

ตัดกระจกโตะไลซ์ขนาด cutoff ที่ 3,500 MW ให้มีความยาวประมาณ 10-12 เซนติเมตร โดยความยาวของกระจกโตะไลซ์จะขึ้นอยู่กับปริมาตรของสารละลายที่จะใส่ลงไป ในกระจก นำกระจกโตะไลซ์ที่ตัดแล้วใส่ลงใน EDTA 1% (ภาคผนวก ข หมายเลข 20) ที่ต้มเดือดนาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนประมาณ 4-5 ครั้ง หรือจนกว่ากลิ่นของ EDTA จะหมด เตรียมกระจกโตะไลซ์ไว้ใช้ต่อไป

7. สารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH เท่ากับ 7.5

นำกลีเซอรอล 87 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 345 มิลลิลิตร ผสมใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH เท่ากับ 7.5 ปริมาตร 655 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

8. นิสทาทีน (nystatin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นิสทาทีน 1 มิลลิกรัม

ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethyl formamide) 1 มิลลิลิตร

ละลายนิสทาทีนแล้วเก็บในขวดสีชาให้พ้นแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. สารละลาย 1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH7.5

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 46.8 กรัม ละลายใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH เท่ากับ 7.5 ปริมาตร 800 มิลลิลิตร

10. สารละลาย 1.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH8.8

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$) 181.71 กรัม

ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วคนให้เข้ากัน วัดค่า pH ให้เท่ากับ 8.8 เติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. สารละลาย 10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 กรัม

ละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปราศจากไอออนให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

12. สารละลาย 10% สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครพิวจ์ที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำปราศจากไอออนและปลอดเชื้อลงไป 1 มิลลิตร ละลายจนหมด

13. สารละลาย 0.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH6.8

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

ละลาย Trisma base ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 800 มิลลิตร ปรับค่า pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วคนให้เข้ากัน วัดค่า pH ให้เท่ากับ 6.8 เติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

14. สารละลายรันนิ่งบัฟเฟอร์ (running buffer)

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	30	กรัม
ไกลซีน (Glycine)	145	กรัม
SDS	10	กรัม

แยกละลายสารทั้งสามชนิดด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นนำมารวมกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้นำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

15. สารละลาย 4x SDS sample buffer

สารละลาย 0.5 โมลาร์ Tris-HCl, pH6.8	5	มิลลิลิตร
DTT (DL-Dithiothreitol)	1.851	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.4	กรัม
บรอมฟินอลบลู	0.05	กรัม
กลีเซอรอล 87%	12	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	12	มิลลิลิตร

ผสมทุกอย่างให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่หลอดไมโครพิวจ์

16. สารละลาย 1x SDS sample buffer

สารละลาย 4x SDS sample buffer	10	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	30	มิลลิลิตร

17. สารละลายสีย้อมคูแมสซีบลู (coomassie blue staining solution)

สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250	1	กรัม
เมทานอล	500	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	100	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	400	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน		

18. สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

เมทานอล	400	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	100	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	400	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน		

19. Fix solution

เมทานอล	100	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	100	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล 87%	50	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	750	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน		

20. สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

เอทาลีนไดเอมีนเตตระแอะซิติกแอซิด (EDTA)	1	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	100	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

21. สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 1 โมลาร์

เอทาลีนไดเอมีนเตตระแอะซิติกแอซิด (EDTA)	29.224	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	100	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

23. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์	5.844	กรัม
น้ำปราศจากไอออน	100	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

24. สารละลาย TEN

สารละลาย 1 โมลาร์ Tris-HCl, pH8.0	100	ไมโครลิตร
สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 21)	100	ไมโครลิตร
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 22)	1.5	มิลลิลิตร

นำสารทั้งหมดผสมรวมกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

25. Lysozyme 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง Lysozyme 20 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน

26. RNase A 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง RNase A 20 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน

27. สารละลาย TEN*

สารละลาย 1 โมลาร์ Tris-HCl, pH8.0	100	ไมโครลิตร
สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 21)	10	ไมโครลิตร
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 22)	500	ไมโครลิตร

นำสารทั้งหมดผสมรวมกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

29. บัฟเฟอร์ 50X TAE

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	121	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	28.55	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนมีปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

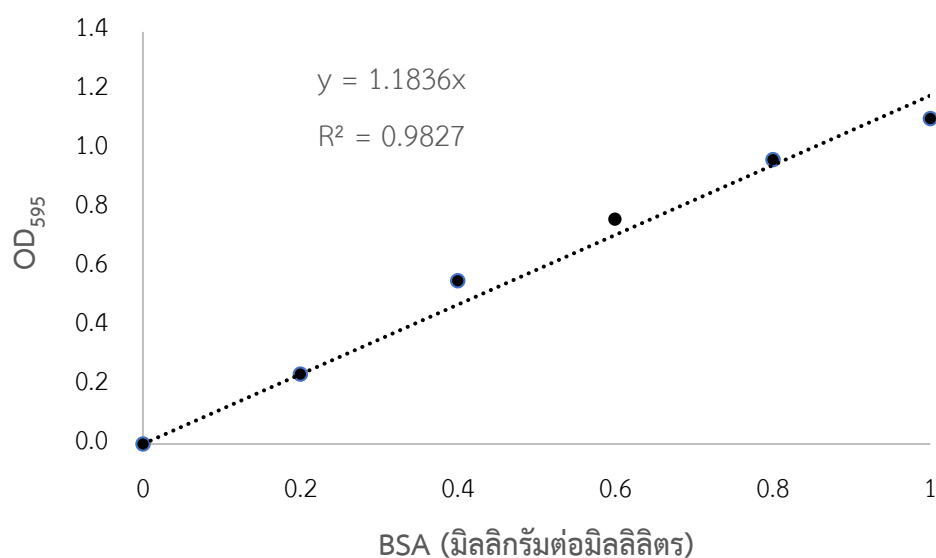
30. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งเอธิเดียมโบรไมด์ 0.1 มิลลิกรัม จากนั้นละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดมิดชิด แล้วเก็บให้พ้นแสง

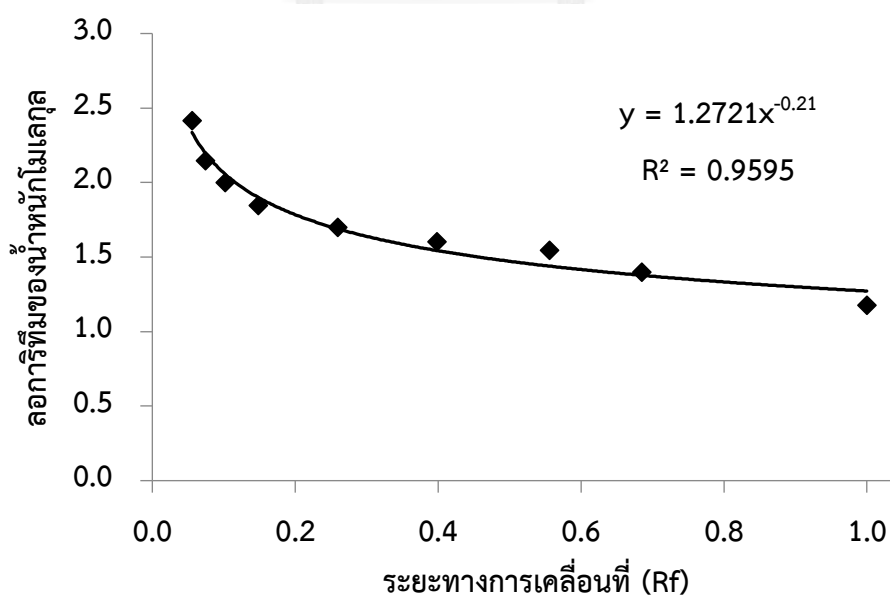


ภาคผนวก ค

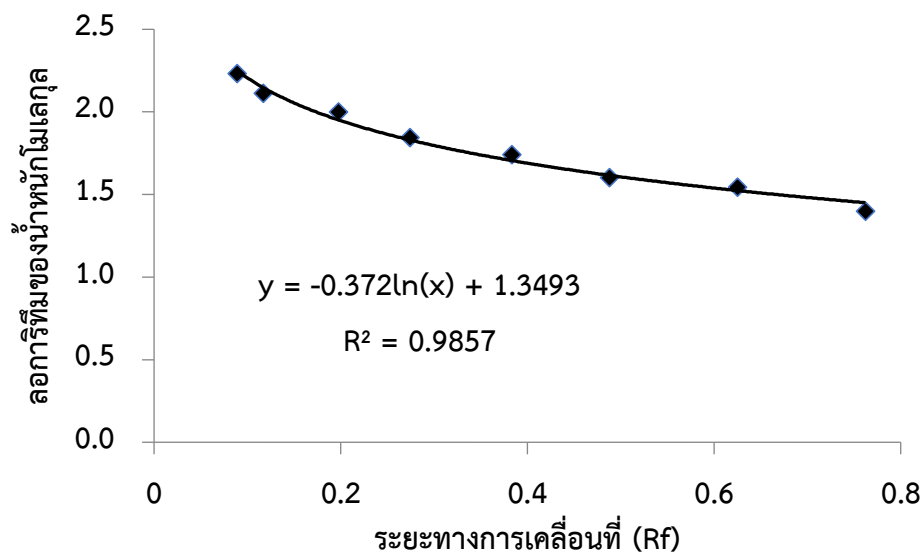
1. กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0.2-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



2. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างลอการิธึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่เคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล



3. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างลอการิธึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่เคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล



ภาคผนวก ง

1. ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ *B. subtilis* N3 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx

ลำดับซึ่งให้การจับเรียงเทียบสูงสุด:

หมายเลขเข้าถึง	รายละเอียด	E value	Max ident	เอกสารอ้างอิง
BAB58986.1	flagellin, partial [<i>B. subtilis</i>]	5e-159	100%	(Asano และคณะ, 2001)
WP_022553864.1	MULTISPECIES: flagellin A [<i>B. amyloliquefaciens</i> group]	3e-160	100%	<i>B. amyloliquefaciens</i> group
WP_017418819.1	MULTISPECIES: flagellin [<i>B. amyloliquefaciens</i> group]	3e-159	99%	<i>B. amyloliquefaciens</i> group
WP_057080256.1	flagellin [<i>B. amyloliquefaciens</i>]	1e-157	98%	<i>B. amyloliquefaciens</i>
WP_025853537.1	flagellin [<i>B. amyloliquefaciens</i>]	1e-157	98%	<i>B. amyloliquefaciens</i>



2. ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของแฟลกเจลลินของ *B. subtilis* N3 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

flagellin, partial [*Bacillus subtilis*]

Length: 306

Score = 453 bits (1165), Expect = 5e-159

Identities = 266/266 (100%), Gaps = 0/266 (0%)

Positive = 266/266 (100%), Frame = +1

Query	19	ISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGLISLIQTSEGALNETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDR	198
Sbjct	41	ISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGLISLIQTSEGALNETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDR	100
Query	199	SELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLDGTAKDLTFQIGANEGQTMTLSINKMDSESL	378
Sbjct	101	SELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLDGTAKDLTFQIGANEGQTMTLSINKMDSESL	160
Query	379	KVGTTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWADEEVTGKVTKEAGYYDDKCALVgsekleegek1	558
Sbjct	161	KVGTTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWADEEVTGKVTKEAGYYDDKCALVgsekleegek1	220
Query	559	skgIDiSSsakaassalttiktaidTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAES	738
Sbjct	221	SKGIDISSAKAASSALTTIKTAIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAES	280
Query	739	RIRDVDMASEMMEYTKNNILTQASQA	816
Sbjct	281	RIRDVDMASEMMEYTKNNILTQASQA	306

MULTISPECIES: flagellin A [*Bacillus amyloliquefaciens* group]

Length: 331

Score = 457 bits (1175), Expect = 3e-160

Identities = 268/268 (100%), Gaps = 0/268 (0%)

Positive = 268/268 (100%), Frame = +1

Query	19	ISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGLISLIQTSEGALNETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDR	198
Sbjct	48	ISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGLISLIQTSEGALNETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDR	107
Query	199	SELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLDGTAKDLTFQIGANEGQTMTLSINKMDSESL	378
Sbjct	108	SELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLDGTAKDLTFQIGANEGQTMTLSINKMDSESL	167
Query	379	KVGTTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWADEEVTGKVTKEAGYYDDKCALVgsekleegek1	558
Sbjct	168	KVGTTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWADEEVTGKVTKEAGYYDDKCALVgsekleegek1	227
Query	559	skgIDiSSsakaassalttiktaidTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAES	738
Sbjct	228	SKGIDISSAKAASSALTTIKTAIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAES	287
Query	739	RIRDVDMASEMMEYTKNNILTQASQAML	822
Sbjct	288	RIRDVDMASEMMEYTKNNILTQASQAML	315

MULTISPECIES: flagellin [*Bacillus amyloliquefaciens* group]

Length: 331

Score = 454 bits (1169), Expect = 3e-159

Identities = 267/268 (99%), Gaps = 0/268 (0%)

Positive = 267/268 (99%), Frame = +1

Query	19	ISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGLISLIQTSEGALNETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDR	198
Sbjct	48	ISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGLISLIQTSEGALNETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDR	107
Query	199	SELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLDGTAKDLTFQIGANEGQTM+LSINKMDSESL	378
Sbjct	108	SELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLDGTAKDLTFQIGANEGQTM+LSINKMDSESL	167
Query	379	KVGTTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWADEEVDGKVTKEAGYYDDKCALVgsekleeegekl	558
Sbjct	168	NVGTTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWADEEVDGKVTKEAGYYDDKCALVgsekleeegekl	227
Query	559	skgIDiSSsakaassalttiktaidTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAES	738
Sbjct	228	SKGIDISSAKAASSALTTIKTAIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAES	287
Query	739	RIRDVDMASEMMEYTKNNILTQASQAML	822
Sbjct	288	RIRDVDMASEMMEYTKNNILTQASQAML	315

flagellin [*Bacillus amyloliquefaciens*]

Length: 331

Score = 451 bits (1159), Expect = 1e-157

Identities = 263/268 (98%), Gaps = 0/268 (0%)

Positive = 267/268 (99%), Frame = +1

Query	19	ISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGLISLIQTSEGALNETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDR	198
Sbjct	48	ISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGLISLIQTSEGALNETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDR	107
Query	199	SELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLDGTAKDLTFQIGANEGQTM+LSINKMDSESL	378
Sbjct	108	SELQKEMDQLASEVTRISTDTEFNTKKLLDGTAKDLTFQIGANEGQTM+LSINKMDSESL	167
Query	379	KVGTTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWADEEVDGKVTKEAGYYDDKCALVgsekleeegekl	558
Sbjct	168	KVGTTTYTAQADGTLKSGDGTSTATWAEVEVDGKVTKEAGYYDDKCALVgsekleeegekl	227
Query	559	skgIDiSSsakaassalttiktaidTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAES	738
Sbjct	228	SKGIDISSAKAASSALTTIKTAIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAES	287
Query	739	RIRDVDMASEMMEYTKNNILTQASQAML	822
Sbjct	288	RIRDVDMASEMMEYTKNNILTQASQAML	315

flagellin [*Bacillus amyloliquefaciens*]

Length: 331

Score = 451 bits (1159), Expect = 1e-157

Identities = 263/268 (98%), Gaps = 0/268 (0%)

Positive = 267/268 (99%), Frame = +1

```

Query 19 ISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGLISLIQTSEGALNETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDR 198
Sbjct 48 ISEKMRSQIRGLDMASKNAQDGLISLIQTSEGALNETHSILQRMSELATQAANDTNTDSDR 107

Query 199 SELQKEMDQLSSEVTRISTDTEFNTKKLLDGTAKDLTFQIGANEGQTM+LSINKMDSSEL 378
Sbjct 108 SELQKEMDQLASEVTRISTDTEFNTKKLLDGTAKDLTFQIGANEGQTM+LSINKMDSSEL 167

Query 379 KVGTTYTAQADGTLKSGDGNSTATWADEEVDGKVTKEAGYYDDKGALVgsekleeegek1 558
Sbjct 168 KVGTTYTAQADGTLKSGDGTSTATWAEDEVTDGKVTKEAGYYDDKGALVgsekieegek1 227

Query 559 skgIDissakaassalttiktaidTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAES 738
Sbjct 228 SKGIDISSAKAASSALTTIKTAIDTVSSERAKLGAVQNRLEHTINNLGTSSENLTSAES 287

Query 739 RIRDVDMASEMMEYTKNNILTQASQAML 822
Sbjct 288 RIRDVDMASEMMEYTKNNILTQASQAML 315

```

3. ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

ลำดับซึ่งให้การจับเรียงเทียบสูงสุด:

หมายเลขเข้าถึง	รายละเอียด	E value	Max ident	เอกสารอ้างอิง
CP020603.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์ E6130952, complete genome	0.0	99%	(Xiong และคณะ)
CP013993.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DHS01, complete genome	0.0	99%	(Valot และคณะ, 2014)
KP282446.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์ TEN01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	(Vadivel และ Sathurappan)
KF530282.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์ MK13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	(Kumar และคณะ)
HQ288943.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์ A9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%	(Falcao Salles และคณะ)

4. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลต RS1 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

Pseudomonas aeruginosa สายพันธุ์ E6130952, complete genome

Length: 7040952

Score = 1613 bits (873), Expect = 0.0

Identities = 895/904 (99%), Gaps = 8/904 (0%)

Strand=Plus/Minus

```

Query    65      TTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG 124
          |||
Sbjct    5950686 TTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG 5950627

Query    125      TAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTT 184
          |||
Sbjct    5950626 TAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTT 5950567

Query    185      CAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAACTACTGAG 244
          |||
Sbjct    5950566 CAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAACTACTGAG 5950507

Query    245      CTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGG 304
          |||
Sbjct    5950506 CTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGG 5950447

Query    305      AAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGC 364
          |||
Sbjct    5950446 AAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGC 5950387

Query    365      GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGC 424
          |||
Sbjct    5950386 GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGC 5950327

Query    425      CGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTCGACCCCTGGGGAG 484
          |||
Sbjct    5950326 CGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTCGACCCCTGGGGAG 5950267

Query    485      TACGGCCGCAAGGTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT 544
          |||
Sbjct    5950266 TACGGCCGCAAGGTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT 5950207

Query    545      GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACCTTTC 604
          |||
Sbjct    5950206 GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACCTTTC 5950147

Query    605      CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTTAGCTGCATGGCTGTCGTCAG 664
          |||
Sbjct    5950146 CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTTAGCTGCATGGCTGTCGTCAG 5950089

Query    665      CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGATTAAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTT 724
          |||
Sbjct    5950088 CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG--TAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTT 5950031

Query    725      ACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGAACCAAACCGGAGGAAGGTG 784
          |||
Sbjct    5950030 ACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGA-CAAAACCGGAGGAAGGTG 5949972

Query    785      GGCTAGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATG 844
          ||
Sbjct    5949971 GG---GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATG 5949915

Query    845      GTCGGTACAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 904
          |||

```

```

Sbjct  5949914  GTCGGTACAAAGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT  5949855
Query   905      CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAG  964
          |||
Sbjct  5949854  CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAG  5949795
Query   965      AATG   968
          |||
Sbjct  5949794  AATG   5949791

```

Pseudomonas aeruginosa DHS01, complete genome

Length: 7055752

Score = 1613 bits (873), Expect = 0.0

Identities = 898/908 (99%), Gaps = 10/908 (1%)

Strand=Plus/Minus

```

Query   61      ATCGTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC  120
          |||
Sbjct  6012446  ATC-TTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC  6012388
Query   121      GCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGT  180
          |||
Sbjct  6012387  GCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGT  6012328
Query   181      GGTTACGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACACTAC  240
          |||
Sbjct  6012327  GGTTACGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACACTAC  6012268
Query   241      TGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA  300
          |||
Sbjct  6012267  TGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA  6012208
Query   301      TAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGA  360
          |||
Sbjct  6012207  TAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGA  6012148
Query   361      AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGAC  420
          |||
Sbjct  6012147  AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGAC  6012088
Query   421      TAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCCGCTGG  480
          |||
Sbjct  6012087  TAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCCGCTGG  6012028
Query   481      GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA  540
          |||
Sbjct  6012027  GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA  6011968
Query   541      GCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAC  600
          |||
Sbjct  6011967  GCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAC  6011908
Query   601      TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTTAGCTGCATGGCTGTCC  660
          |||
Sbjct  6011907  TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTTAGCTGCATGGCTGTCC  6011850
Query   661      TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGATTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTT  720
          |||
Sbjct  6011849  TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGATTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTT  6011792
Query   721      AGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGAACCAACCGGAGGAA  780
          |||
Sbjct  6011791  AGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGA--CAACCGGAGGAA  6011734

```



```

Query 665   CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGATTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTT 724
          |||
Sbjct 1036   CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG--TAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTT 1093

Query 725   ACCAGCACCTCGGGTGGGCACCTCTAAGGAGACTGCCGGTGAACCAAACCGGAGGAAGGTG 784
          |||
Sbjct 1094   ACCAGCACCTCGGGTGGGCACCTCTAAGGAGACTGCCGGTGA--CAAACCGGAGGAAGGTG 1151

Query 785   GGCTAGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATG 844
          ||
Sbjct 1152   GGG--GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATG 1209

Query 845   GTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGT 904
          |||
Sbjct 1210   GTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGT 1269

Query 905   CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAG 964
          |||
Sbjct 1270   CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAG 1329

Query 965   AATG 968
          |||
Sbjct 1330   AATG 1333

```

Pseudomonas aeruginosa สายพันธุ์ MK13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length: 1444

Score = 1613 bits (873), Expect = 0.0

Identities = 895/904 (99%), Gaps = 8/904 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 65    TTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG 124
          |||
Sbjct 443    TTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG 502

Query 125   TAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTT 184
          |||
Sbjct 503   TAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTT 562

Query 185   CAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACACTGAG 244
          |||
Sbjct 563   CAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACACTGAG 622

Query 245   CTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGG 304
          |||
Sbjct 623   CTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGG 682

Query 305   AAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGC 364
          |||
Sbjct 683   AAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGC 742

Query 365   GTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGC 424
          |||
Sbjct 743   GTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGC 802

Query 425   CGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAG 484
          |||
Sbjct 803   CGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAG 862

Query 485   TACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT 544
          |||
Sbjct 863   TACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT 922

Query 545   GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC 604

```

```

Sbjct 923      |||
GTGGTTTAATCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC 982
Query 605      CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTTAGCTGCATGGCTGTCGTCAG 664
|||
Sbjct 983      CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGT--GCTGCATGGCTGTCGTCAG 1040
Query 665      CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGATTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTT 724
|||
Sbjct 1041     CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG--TAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTT 1098
Query 725      ACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGAACCAAACCGGAGGAAGGTG 784
|||
Sbjct 1099     ACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGA--CAAACCGGAGGAAGGTG 1156
Query 785      GGCTAGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGGTACACACGTGCTACAATG 844
||
Sbjct 1157     GGG--GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGGTACACACGTGCTACAATG 1214
Query 845      GTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 904
|||
Sbjct 1215     GTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT 1274
Query 905      CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAG 964
|||
Sbjct 1275     CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAG 1334
Query 965      AATG 968
|||
Sbjct 1335     AATG 1338

```

Pseudomonas aeruginosa สายพันธุ์ A9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length: 1528

Score = 1613 bits (873), Expect = 0.0

Identities = 898/908 (99%), Gaps = 10/908 (1%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 61      ATCGTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC 120
|||
Sbjct 455      ATC-TTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC 513
Query 121     GCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGT 180
|||
Sbjct 514     GCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGT 573
Query 181     GGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAACTGCATCCAAAACCTAC 240
|||
Sbjct 574     GGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAACTGCATCCAAAACCTAC 633
Query 241     TGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA 300
|||
Sbjct 634     TGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA 693
Query 301     TAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGA 360
|||
Sbjct 694     TAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGA 753
Query 361     AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGAC 420
|||
Sbjct 754     AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGAC 813
Query 421     TAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGG 480
|||

```

```

Sbjct 814 TAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGCGCAGCTAACCGGATAAGTCGACCGCCTGG 873
Query 481 GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA 540
      |||
Sbjct 874 GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA 933
Query 541 GCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAC 600
      |||
Sbjct 934 GCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAC 993
Query 601 TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTTAGCTGCATGGCTGTCG 660
      |||
Sbjct 994 TTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTTAGCTGCATGGCTGTCG 1051
      |||
Query 661 TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGATTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTT 720
      |||
Sbjct 1052 TCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG--TAACGAGCGCAACCCTTGTCCTT 1109
      |||
Query 721 AGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGAACCAAACCGGAGGAA 780
      |||
Sbjct 1110 AGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGA--CAAACCGGAGGAA 1167
      |||
Query 781 GGTGGGCTAGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTAC 840
      |||
Sbjct 1168 GGTGGG--GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTAC 1224
      |||
Query 841 AATGGTCCGTACAAAGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCG 900
      |||
Sbjct 1225 AATGGTCCGTACAAAGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCG 1284
      |||
Query 901 TAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAA 960
      |||
Sbjct 1285 TAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAA 1344
      |||
Query 961 TCAGAATG 968
      |||
Sbjct 1345 TCAGAATG 1352

```



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรพีวรรณ โสวรรณปรีชา เกิดเมื่อวันที่ 13 มกราคม 2528 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต และปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 และ 2553 ตามลำดับ และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 ที่อยู่ปัจจุบัน 41/11 ซอยเจริญกรุง 109 ถนนเจริญกรุง แขวง-เขต บางคอแหลม กรุงเทพมหานคร 10120

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The 19th Biological Sciences Graduate Congress (BSGC) ซึ่งจัดขึ้นที่ National University of Singapore ประเทศสิงคโปร์ ระหว่างวันที่ 12-14 ธันวาคม 2557 ในชื่อเรื่อง “Purification and identification of antifungal protein from Bacillus sp. N3”

ระหว่างศึกษาวิจัยผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนนิสิตระดับปริญญาเอกและโทไปทำวิจัยในต่างประเทศ จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อไปทำวิจัย ณ ICBiotech (International Center for Biotechnology), Osaka University, Osaka ประเทศญี่ปุ่น ระยะเวลาทำวิจัย 2 เดือน 26 วัน ระหว่างวันที่ 6 กันยายน 2558 ถึง 30 พฤศจิกายน 2558

ตลอดระยะเวลาการศึกษาระดับปริญญาเอก ผู้วิจัยได้รับทุนโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดี), ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และทุนสนับสนุนนิสิตระดับปริญญาเอกและโทไปทำวิจัยในต่างประเทศ จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อสนับสนุนค่าเล่าเรียน ค่าทำวิจัย ค่าเดินทางไปต่างประเทศ และค่าใช้จ่ายต่างๆ