รายงานการวิจัย

การแยกและศึกษาสมบัติของเชื้อเอนโดไฟท์ที่เจริญอยู่ในมันสำปะหลัง และการนำมาประยุกต์ใช้

Isolation and characterization of endophytes in cassava and their applications

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.กนกพร ไตรวิทยากร

ดร.ศุภจิต สระเพชร

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

อาจารย์ ดร.ณัฐพล อภิรติกุล

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

อาจารย์ ดร.วัฒนชัย จำปาทอง

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มีนาคม 2562

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

ประจำปีงบประมาณ 2561

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การแยกและศึกษาสมบัติของเชื้อเอนโดไฟท์ที่เจริญอยู่ในมันสำปะหลัง และการนำมาประยุกต์ใช้” มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประชากรเอนโดไฟท์ที่เจริญอยู่ในมันสำปะหลัง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ห้วยบง 60 สายพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และ สายพันธุ์พิรุณ 1 และศึกษาสมบัติของเอนโดไฟท์ที่แยกได้ และความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อวงการเกษตร อุตสาหกรรม และการแพทย์ในอนาคต รวมถึงการสร้างองค์ความรู้ใหม่ โดยโครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2561

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และทุกหน่วยงาน ที่ได้ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการดำเนินการวิจัย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นิสิตและนักวิจัยหลังปริญญาเอกทุกคน ในห้องปฏิบัติการ 2014 ชั้น 20 อาคารมหาวชิรุณหิศ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมถึงทุกท่านที่มิได้กล่าวนาม ซึ่งมีส่วนร่วมให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีสมตามความมุ่งหมาย

รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล หัวหน้าโครงการ

และ คณะผู้วิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง การแยกและศึกษาสมบัติของเชื้อเอนโดไฟท์ที่เจริญอยู่ในมันสำปะหลัง และการนำมาประยุกต์ใช้

หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2561

จำนวนเงิน **500,000 บาท**

ระยะเวลาการทำวิจัย 1 ปี 6 เดือน เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม 2560 ถึง มีนาคม 2562

โครงการนี้เป็นโครงการปีที่ 3 ของการศึกษาหาเอนโดไฟท์ที่เจริญอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของมันสำปะหลังที่เจริญอยู่ร่วมกับมันสำปะหลังจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) พันธุ์ห้วยบง 60 2) พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และ 3) พันธุ์พิรุณ 1 รายงานครั้งนี้ได้นำเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่แยกได้มาทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และในพืช พบว่าเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่แยกได้มาบางส่วนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์และในพืชได้ โดยพบว่า เอนโดไฟท์แบคทีเรียส่วนใหญ่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในพืชได้ดีกว่า จึงได้คัดเลือกเอนโดไฟท์แบคทีเรียไอโซเลท KUs6 มาเป็นต้นแบบในการศึกษาวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และวิธีทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในพืช *Xanthomonas axonopodis* และราก่อโรคพืชจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides Fusarium moniliformis Fusarium proliferatum* และ *Fusarium solani* ผลการทดลองพบว่า เอนโดไฟท์แบคทีเรียไอโซเลท KUs6 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืชได้ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในพืช ซึ่งวิธีการศึกษาดังกล่าวในโครงการนี้สามารถเป็นต้นแบบในการศึกษาเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในพืชได้ต่อไป

นอกจากนี้ได้ศึกษาแบคทีเรียที่สมบัติในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่ช่วยในการย่อยสลายซากพืชจากดินที่ปลูกมันสำปะหลังทั้ง 3 สายพันธุ์ ในระยะเวลา 3, 6, 9 และ 12 เดือน พบแบคทีเรียที่มีสมบัติในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จำนวน 86 ไอโซเลท และได้คัดเลือกไอโซเลทที่แยกได้จะถูกนำมาศึกษาสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสที่จำเพาะและประยุกต์ใช้ต่อไป ในรายงานนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ได้แก่ PR1-P15 (6 เดือน), PR1-N9 (6 เดือน) และ HT-P9 (6 เดือน) มาทดสอบความสามารถในการย่อย filter paper และใบมันสำปะหลัง เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

Project Title	Isolation and characterization of endophytes in cassava and their applications
Principle Investigator	Associate Professor Wanchai Assavalapsakul, Ph.D. Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University
Granted for research from office of the National Research Council of Thailand	
Research Budget	500,000 Baht
Durations	1 year and 6 months (October 2017 - March 2019)

This is the third-year project to isolate the plant-associated endophytic bacteria from three cassava strains including Huay Bong60 (HB 60), Kasetsart 50 (KU 50) and Pirun-1 (PR1). In this study, the antimicrobial activity of endophytic bacteria was assessed against human and plant pathogen. The results showed that a number of isolated entophytic bacteria could inhibit both human and plant pathogens. However, most of them were more efficient to suppress plant pathogens than human ones. Therefore, endophytic bacterial isolate KUs6 was selected and used as a model to develop the method for bioactive compound extraction. KUs6 isolate and its extract were subsequently used to inhibit plant pathogenic microorganisms including bacteria *Xanthomonas axonopodis* and other fungi including *Collectotrichum gloeosporioides, Fusarium moniliformis, Fusarium proliferatum* and *Fusarium solani*. The results demonstrated KUs6 isolate had the ability to suppress the growth of plant pathogenic bacteria and fungi *in vitro* and *in vivo*. Therefore, the developed method in this project could be used to apply for examination of other endophytic bacteria inhibiting plant pathogenic microorganisms.

Further, this project also studied the cellulase producing bacteria which could decompose the dead leave or plant from 3 strains of cassava-grown soil at 3, 6, 9 and 12 months. Eighty-six cellulase producing bacteria were isolated and determined the specific cellulase enzyme. In this study, 3 bacterial isolates-PR1-P15 (6 months), PR1-N9 (6 months) and HT-P9 (6 months) were examined the ability to decompose a filter paper and cassava leaf.

รายนามคณะผู้วิจัย

1. รศ.ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล หัวหน้าโครงการวิจัย
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2218-5096 โทรสาร 0-2252-7576
อีเมล์ wanchai.a@chula.ac.th

2. รศ.ดร.กนกพร ไตรวิทยากร สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

3. ดร.ศุภจิต สระเพชร สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

4. อาจารย์ ดร.ณัฐพล อภิรติกุล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

5. อาจารย์ ดร.วัฒนชัย จำปาทอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

6. นายรพี สินเนืองนอง นิสิตปริญญาเอก หลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา

7. นางสาววิลาสินี ระวีกุล นิสิตปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์

8. นางสาวพิชญ์วสุ เอี่ยมยั่งยืน นิสิตปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

กิตติกรรมประกาศ ก

บทคัดย่อภาษาไทย ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ค

รายนามคณะผู้วิจัย ง

สารบัญเรื่อง (Table of Contents) จ

สารบัญตาราง (List of Tables) ฉ

สารบัญรูป (List of Figures) ช

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations) ซ

บทนำ (Introduction) 1

เนื้อเรื่อง (Main Body) 5

การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพก่อโรค 5

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods) 5

ผลการวิจัย (Results) 13

อภิปราย / วิจารณ์ (Discussion) ผลการวิจัย 39

การคัดแยกและศึกษาสมบัติของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากดินที่ปลูกมันสำปะหลัง 42

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods) 43

ผลการวิจัย (Results) 47

อภิปราย / วิจารณ์ (Discussion) ผลการวิจัย 58

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย 59

บรรณานุกรม (Bibliography) 60

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด 66

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่		หน้า
1	ความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์	13
2	ความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช	15
3	ความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช	17
4	ขนาดของวงใสที่วัดได้จากสารสกัดจากเอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis*	26
5	กลุ่มการทดลองในการย่อยสลาย Filter paper	45
6	กลุ่มการทดลองในการย่อยสลายใบมันสำปะหลัง	46
7	จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่ปลูกมันสำปะหลัง 3 สายพันธุ์ ทุก 3 เดือน	47
8	จำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลส 2 ใน 3 หรือ 3 ใน 3 ซับสเตรต	48
9	สายพันธุ์เอนโดไฟท์แบคทีเรียที่คัดแยกได้	48
10	ลักษณะวงใสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	49
11	ลักษณะวงใสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	50
12	ลักษณะวงใสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	51
13	ลักษณะวงใสบนอาหารที่มีการปรับเป็น pH 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	52
14	ลักษณะวงใสบนอาหารที่มีการปรับเป็น pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	53
15	ลักษณะวงใสบนอาหารที่มีการปรับเป็น pH 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	54
16	ลักษณะวงใสบนอาหารที่มีการปรับเป็น pH 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	55
17	จำนวนเชื้อและน้ำหนักของ Filter paper ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการบ่ม 30 วัน	56

สารบัญรูป (List of Figures)

รูปที่		หน้า
1	ความสามารถของสาร Lipopeptide ที่สกัดได้จากเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* โดยทำการแปรความเข้มข้นของสาร Lipopeptide ที่สกัดได้	19
2	ความสามารถของสาร Lipopeptide ที่สกัดได้จากเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์	20
3	ลักษณะของเส้นใยของราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์	23
4	ความสามารถของสารสกัดจากเอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis*	25
5	ประสิทธิภาพจากสารสกัดที่ได้จากเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6 โดยใช้ตัวทำละลาย Butanol ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชบนจานเพาะเชื้อ	28
6	ลักษณะความผิดปกติของเส้นใยของราก่อโรคพืชที่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดที่ได้จากเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6 โดยใช้ตัวทำละลาย Butanol เปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบ	29
7	ประสิทธิภาพของสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย/อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเกิดโรคบนใบต้นถั่วเขียว โดยทำการหยดสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย/อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียก่อนตามด้วยหยดสารละลายเซลล์แบคทีเรียก่อโรคพืช	32
8	ประสิทธิภาพของสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย/อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเกิดโรคบนใบต้นถั่วเขียว โดยทำการหยดสารละลายเซลล์แบคทีเรียก่อโรคพืชก่อนตามด้วยสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย/อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย	33
9	ประสิทธิภาพของสารละลายเซลล์เอนไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์	35
10	Filter paper ที่เลี้ยงกับแบคทีเรียระยะเวลา 30 วัน	57
11	Filter paper ที่เลี้ยงกับแบคทีเรียระยะเวลา 30 วันภายใต้กล้อง SEM	57

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (Abbreviations)

HB60	มันสำปะหลัง สายพันธุ์ห้วยบง 60
KU50	มันสำปะหลัง สายพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50
PR1	มันสำปะหลัง สายพันธุ์พิรุณ 1

บทนำ

มันสำปะหลัง (Casssava, *Manihot esculenta*) เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่ก่อให้เกิดรายได้เข้าสู่ประเทศไทยเป็นจำนวนมาก เนื่องจากมันสำปะหลังสามารถนำไปแปรรูปเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแป้ง อาทิเช่น แป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลังอัดเม็ด และมันสำปะหลังเส้น เป็นต้น และอุตสาหกรรมอาหารทั้งคนและสัตว์ (ฐานข้อมูลมันสำปะหลัง, สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2562) นอกจากนี้ ทุกส่วนของต้นมันสำปะหลังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ คุณภาพของมันสำปะหลังและปริมาณแป้งในหัวมันสำปะหลัง ถือเป็นปัจจัยหลักในการที่จะก่อให้เกิดมูลค่า สำหรับพันธุ์ของมันสำปะหลังได้มีการปรับปรุงมาตลอด (เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง, กรมพัฒนาที่ดิน) และ มีงานวิจัยที่สนับสนุนเป็นจำนวนมากจากหลายหน่วยงานและความร่วมมือจากภาครัฐ อาทิเช่น ศูนย์วิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กรมพัฒนาที่ดิน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) เป็นต้น หน่วยงานจากภาคอุดมศึกษา อาทิเช่น หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวโมเลกุลมันสำปะหลัง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กลุ่มวิจัยพืช สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล สถาบันวิจัยศรีราชา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นต้น หน่วยงานที่ไม่หวังผลกำไร อาทิเช่น สถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย เป็นต้น และในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีต่าง ๆ มาใช้ภายในประเทศ เพื่อศึกษาอุตสาหกรรมมันสำปะหลัง ตั้งแต่ต้นน้ำสู่ปลายน้ำ กล่าวคือ ตั้งแต่การผลิตโดยภาคการเกษตร การแปรรูปของภาคอุตสาหกรรม ตลอดจนผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ซึ่งช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับอุตสาหกรรมมันสำปะหลัง เพิ่มรายได้ และสร้างชีวิตความเป็นอยู่ที่ดีกับเกษตรกร เศรษฐกิจของประเทศดีขึ้น รวมทั้งลดผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อสิ่งแวดล้อมได้อย่างยั่งยืน โดยการบูรณาการงานวิจัยและพัฒนา การใช้งบประมาณที่เกี่ยวข้องในด้านต่าง ๆ อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อแก้ไขปัญหาตลอดห่วงโซ่อุตสาหกรรมมันสำปะหลัง (ฝ่ายบริหารคลัสเตอร์และโปรแกรมวิจัย, 2554)

มันสำปะหลังที่เลือกใช้ในการศึกษานี้ มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ห้วยบง 60 สายพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และ สายพันธุ์พิรุณ 1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมปลูก และได้รับคำแนะนำจากคณะผู้วิจัย (รองศาสตราจารย์ ดร.กนกพร ไตรวิทยากร และ ดร.ศุภจิต สระเพชร) ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญในการพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังด้วยวิธีการผสมพันธุ์ โดยมีรายละเอียดของแต่ละสายพันธุ์ดังนี้

มันสำปะหลัง สายพันธุ์ห้วยบง 60 (กรมวิชาการเกษตร, 2014)

มันสำปะหลังสายพันธุ์ห้วยบง 60 เป็นพันธุ์ที่พัฒนาโดยความร่วมมือของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และมูลนิธิมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ระยอง 5 และพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 เมื่อปี พ.ศ.2534 ได้ผ่านการประเมินผลผลิตมากกว่า 30 การทดลอง ได้รับพระราชทานชื่อพันธุ์จากสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีว่า “ห้วยบง 60” รับรองพันธุ์โดยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อวันที่ 11 มีนาคม พ.ศ.2546 ลักษณะเด่นประจำสายพันธุ์ คือ ยอดอ่อนสีม่วงอ่อน ใบและก้านสีเขียวอมม่วง ใบมีขนอ่อน ลำต้นสีเขียวเงิน ต้นสูง 180-200 เซนติเมตร แตกกิ่งแรกระดับ 90-140 เซนติเมตร หัวยาวเรียว มีลักษณะคอดเป็นปล้องเล็กน้อย เปลือกหัวสีน้ำตาลอ่อน เนื้อสีขาว เปอร์เซ็นต์แป้งเฉลี่ย 25.4%

ข้อดีของสายพันธุ์ห้วยบง 60 คือ ท่อนพันธุ์เก็บรักษาได้ค่อนข้างนาน (3-4 สัปดาห์) อัตราการงอกสูง มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง และคุณภาพแป้งดี

ข้อเสียของสายพันธุ์ห้วยบง 60 คือ ลำต้นสั้น ใช้ทำพันธุ์ได้น้อย ควรเก็บเกี่ยวเมื่ออายุน้อยกว่า 10 เดือน เนื่องจากจะมีเสี้ยนในหัวมันมาก เมื่ออายุมาก

มันสำปะหลัง สายพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (กรมวิชาการเกษตร, 2014)

มันสำปะหลังสายพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 เป็นสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ระยอง 1 และพันธุ์ระยอง 90 (ผสมขึ้นในปี พ.ศ.2527) ลักษณะเด่นประจำสายพันธุ์ คือ มียอดอ่อนสีม่วง ใบแก่สีเขียวเข้ม และมีก้านใบสีเขียวอมม่วง ลำต้นสีเขียวเงิน ความสูงเฉลี่ย 2 เมตร แตกกิ่งแรกระดับ 150 เซนติเมตร ลำต้นตรง เปลือกหัวสีขาวนวล เนื้อสีขาว เปอร์เซ็นต์แป้ง 23% (ฤดูฝน) หรือ 28% (ฤดูแล้ง)

ข้อดีของสายพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 คือ มีความแข็งแรง ทนแล้ง อัตราการงอกดี ให้ผลผลิตสูง ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมได้ดี ท่อนพันธุ์ทนแล้งได้ดีกว่าท่อนพันธุ์อื่นๆ เพราะมีอาหารสะสมมาก ลำต้นตรง ทำให้สามารถตัดเป็นท่อนพันธุ์ปลูกได้จำนวนมาก

ข้อเสียของสายพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 คือ หากเก็บเกี่ยวในฤดูฝน หรือปลูกในดินทรายที่มีการจัดการธาตุอาหารไม่ดี จะทำให้เปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ หัวมันไม่ชิดต้น ส่วนโคนของหัวเป็นก้านค่อนข้างยาวเมื่อถอนจะขาดอยู่ในดิน ไม่เหมาะปลูกในพื้นที่ที่เป็นดินเหนียวจัด

มันสำปะหลัง สายพันธุ์พิรุณ 1 (กรมวิชาการเกษตร, 2014)

มันสำปะหลังสายพันธุ์พิรุณ 1 พัฒนาขึ้นจากความร่วมมือของกรมวิชาการเกษตร สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล และ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ตั้งแต่ปี พ.ศ.2549

จากลูกผสมมันสำปะหลังรุ่นที่ 1 ระหว่างพันธุ์ห้วยบง 60 และพันธุ์ห้านาที ลักษณะเด่นประจำสายพันธุ์ คือ มียอดอ่อนสีม่วงอมเขียว ก้านใบสีเขียวปนแดง ลำต้นสีเขียวเงิน ความสูงเฉลี่ย 2.35 เมตร แตกกิ่งแรกระดับ 90-150 เซนติเมตร ลำต้นตรง เปลือกหัวสีน้ำตาลเข้ม เนื้อสีขาว เปอร์เซ็นต์แป้ง 28.7%

ข้อดีของสายพันธุ์พิรุณ 1 คือ ให้ผลผลิตสูง เปอร์เซ็นต์แป้งในหัวสูง ใช้ปุ๋ยน้อยกว่าพันธุ์รับรองทั่วไป เหมาะปลูกในดินร่วนปนทรายมากที่สุด รองลงมาคือ ดินร่วนปนเหนียว ดินเหนียวสีแดง ดินทรายร่วน และดินเหนียวสีดำ

ข้อเสียของสายพันธุ์พิรุณ 1 คือ ถ้าปลูกในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง การเจริญเติบโตส่วนเหนือดินจะมากกว่าการให้ผลผลิต

เอนโดไฟท์ เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในหรือระหว่างเนื้อเยื่อพืช โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียหรืออันตรายต่อพืชชนิดนั้น ๆ โดยมากจะเป็นจำพวกแบคทีเรียหรือรา มีการอาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (Mutualism) ได้ประโยชน์ร่วมกัน ช่วยส่งเสริมการเจริญโตของพืช (Spiering et al., 2006) เอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งมีประโยชน์ในการดำรงชีวิตต่อพืช (Lahrmann and Zuccaro, 2012; Lahrmann et al., 2013; Zuccaro et al., 2014) รวมถึง phyto- หรือ plant hormone (Clark et al., 2013; Khan et al., 2014) ปัจจุบันมีการศึกษาค้นพบเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่กับพืชเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ ผลิตจากเอนโดไฟท์และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ อาทิเช่น เกษตรกรรม อุตสาหกรรม และการแพทย์ ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพเหล่านี้ เพื่อที่จะนำมาใช้ในขบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ โดยมุ่งเน้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นศัตรูพืช จำพวก alkaloids, tetraone quinines, terpenoids และ peptides (Mousa and Raizada, 2013) หรือ endotoxin (Monnerat et al., 2007; 2009) และ เอนไซม์ต่าง ๆ อาทิเช่น beta-1,6 glucanase (Moy et al., 2002) และ chitinase (Li et al., 2004) ที่ผลิตได้จากเอนโดไฟท์และสามารถยับยั้งแมลงศัตรูพืชได้ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสมบัติแตกต่างกันมากมายหลายรูปแบบ อาทิเช่น สารปฏิชีวนะ (Hazalin et al., 2009, Yu et al., 2010) สารต้านอนุมูลอิสระ (Muresu et al., 2013; Ye et al., 2013) สารต้านมะเร็ง (Chandra et al., 2012; Shweta et al., 2013) เป็นต้น อย่างไรก็ดี การเจริญเติบโตของเอนโดไฟท์ร่วมกับต้นพืชนั้น มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง อาทิเช่น ลักษณะพื้นที่ ลักษณะภูมิอากาศ ลักษณะทางสรีรวิทยาและความจำเพาะของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ส่งผลต่อการปรับตัวในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน รวมทั้งส่งผลให้รูปแบบประชากรของเอนโดไฟท์มีความจำเพาะต่อสภาพแวดล้อมและเนื้อเยื่อของพืชที่แตกต่างกันอีกด้วย (Ding et al., 2013)

ปัจจุบันกล่าวได้ว่า เอนโดไฟท์ เป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ ที่จะเป็นต้นแบบในการที่จะนำไปใช้ประโยชน์หลาย ๆ ด้านในภายภาคหน้า สำหรับการศึกษาเอนโดไฟท์ในมันสำปะหลังนั้น แทบจะไม่มีรายงานการศึกษาเอนโดไฟท์ รวมถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากเอนโดไฟท์ที่เจริญร่วมกับมันสำปะหลัง ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับมันสำปะหลัง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประชากรของเอนโดไฟท์ และเก็บรวบรวมเอนโดไฟท์ที่เจริญร่วมกับมันสำปะหลังในส่วนต่าง ๆ ที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดระยอง เพื่อนำไปศึกษาสปีชีส์เอนโดไฟท์ดังกล่าว พร้อมทั้งทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในรูปแบบที่เหมาะสมกับเชื้อชนิดนั้น ๆ รวมถึงการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการศึกษาโครงสร้างของสารดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาประชากร และเก็บรวบรวมเอนโดไฟท์ที่เจริญร่วมอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของมันสำปะหลัง
2. ศึกษาและแยกเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
3. ศึกษาและแยกเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีประโยชน์ต่อการเจริญของมันสำปะหลัง
4. แยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและศึกษาโครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการนี้เป็น การศึกษาหาเอนโดไฟท์ (Endophyte) ที่เจริญอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของมันสำปะหลังที่เจริญอยู่ร่วมกับมันสำปะหลังในช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตที่ต่างกัน จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) พันธุ์ห้วยบง 60 2) พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และ 3) พันธุ์พิรุณ 1 ซึ่งจะทำการศึกษาหาเอนโดไฟท์ในช่วงก่อนปลูก และหลังจากการลงแปลงไปเป็นระยะเวลา 3, 6, 9 และ 12 เดือน ตามลำดับ โดยมันสำปะหลังดังกล่าวจะทำการเพาะปลูกในพื้นที่จังหวัดระยอง เมื่อถึงกำหนดตามระยะเวลาที่กำหนดไว้ จึงทำการเก็บส่วนต่าง ๆ ของต้นมันสำปะหลัง เพื่อนำมาแยกและศึกษาเอนโดไฟท์ที่เจริญในส่วนต่าง ๆ ของมันสำปะหลัง จากนั้นจึงนำเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปแบบต่าง ๆ รวมถึงสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังมาทำการศึกษา

เนื้อเรื่อง (Main Body)

การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพก่อโรค

วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & Methods)

1. การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์

1.1 เขี่ยเชื้อเอนโดไฟท์แบคทีเรียลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากเลี้ยงเอนโดไฟท์แบคทีเรียเรียบร้อยแล้ว ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคต่อไป

1.2 เขี่ยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Bacillus subtilis* และ *Psuedomonas aeruginosa* ลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและทำการปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียก่อโรคให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2

1.3 นำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2 มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเชื้อ จากนั้นใช้ cock borer เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นหลุม สำหรับหยดน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์แบคทีเรียลงไป

1.4 นำน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงไปตรงบริเวณหลุมตามข้อ 5.3 โดยใช้อาหารเหลว NB ที่ผสมกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมบวกและอาหารเหลว NB เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเช่นเดียวกัน ต่อมานำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจสอบการสร้าง Inhibition zone

2. การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในพืช

2.1 เขี่ยเชื้อเอนโดไฟท์แบคทีเรียลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากเลี้ยงเอนโดไฟท์แบคทีเรียเรียบร้อยแล้ว ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคต่อไป

2.2 เขี่ยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช *Xanthomonas axonopodis* ลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและทำการปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียก่อโรคให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2

2.3 นำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2 มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเชื้อ จากนั้นใช้ cock borer เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นหลุม สำหรับหยดน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์แบคทีเรียลงไป

2.4 นำน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงไปตรงบริเวณหลุมตามข้อ 5.3 โดยใช้อาหารเหลว NB ที่ผสมกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมบวกและอาหารเหลว NB เป็นตัวควบคุมลบ โดยใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเช่นเดียวกัน ต่อมานำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจสอบการสร้าง Inhibition zone

3. การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช

3.1 เขี่ยเอนโดไฟท์แบคทีเรียลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ต่อมานำเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่เจริญแล้วมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และทำการปรับปริมาณเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2

3.2 เขี่ยชิ้นวุ้นของราก่อโรคพืชจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides Fusarium moniliformis Fusarium proliferatum* และ *Fusarium solani* ลงบนอาหารแข็ง NA ที่มีการแบ่งออกเป็นสองด้าน โดยวางชิ้นวุ้นของราก่อโรคพืชไว้ทางด้านใดด้านหนึ่งของอาหาร

3.3 นำเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่ทำการปรับปริมาณเซลล์เรียบร้อยแล้วมาขีดเป็นเส้นตรง ลงบนอาหารแข็ง NA ที่ได้ทำการวางชิ้นวุ้นของราก่อโรคพืชไว้ดังข้อ 3.2 โดยให้มีความยาวของขีด 5 เซนติเมตรและอยู่ห่างจากชิ้นวุ้นของราก่อโรคพืช 3 เซนติเมตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจสอบการความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช

4. การสกัดสาร Lipopeptide ของเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 และความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและราก่อโรคพืชของ Lipopeptide

4.1 เลือกเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและราก่อโรคพืช จำนวน 1 สายพันธุ์ นั่นคือ สายพันธุ์ KUs6 เขี่ยเชื้อดังกล่าวลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ต่อมาทำ

การถ่ายเชื้อเอนโดไฟท์แบคทีเรียลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน

4.2 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ นำไปเติมกรด HCl ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 2 หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาทำการเก็บส่วนที่ตกตะกอน โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3 นำตะกอนที่แยกได้จากข้อ 4.2 มาสกัด Lipopeptide ด้วยเมทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการสกัดทั้งหมด 2 ครั้ง ต่อมานำส่วนใสที่สกัดได้ทั้งหมดมาระเหยเอาเมทานอลออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนเหลือเมทานอลเพียงเล็กน้อย จากนั้นดูดเมทานอลที่เหลือมาใส่หลอด microcentrifuge และทำการระเหยเอาเมทานอลส่วนที่เหลือออกด้วยเครื่อง Heat box ที่ตั้งอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ต่อมาทำการชั่งน้ำหนักสารที่ได้จากการสกัด เพื่อคำนวณความเข้มข้นของสารที่สกัดได้และนำมาละลายด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8

4.4 นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 4.3 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและราก่อโรคพืช

โดยในส่วนของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจะมีขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 2 ในขณะที่การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช โดยทำการเลี้ยงราก่อโรคพืชบนอาหาร NA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เมื่อมีการเจริญของราก่อโรคพืชใช้ cock borer เจาะชิ้นอาหารให้เป็นหลุม โดยห่างจากเส้นใยราก่อโรคพืชประมาณ 3 เซนติเมตร จากนั้นหยดสารละลาย Lipopeptide ที่สกัดได้และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นตรวจสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชและตรวจดูลักษณะเส้นใยของราก่อโรคพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุติยภูมิของเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 และความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและราก่อโรคพืชของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุติยภูมิ

5.1 นำเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 เขี่ยเชื้อลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ต่อมาทำการถ่ายเชื้อเอนโดไฟท์แบคทีเรียลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5.2 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ นำไปเติมกรด HCl ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 2 หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาทำการเก็บส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยกรด HCL โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.3 นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่แยกได้จากข้อ 5.2 มาสกัดสารออกฤทธิ์ด้วยสารละลาย Ethylacetate, Dichloromethane และ Butanol ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยใช้กรวยแยก ทำการสกัดทั้งหมด 2 ครั้ง ต่อมานำส่วนใสที่สกัดได้ทั้งหมดมาระเหยเอาสารละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนเหลือสารละลายเพียงเล็กน้อย จากนั้นดูดสารที่เหลือมาใส่หลอด microcentrifuge และทำการระเหยเอาสารละลายส่วนที่เหลือออกด้วยเครื่อง Centrivap ต่อมาทำการชั่งน้ำหนักสารที่ได้จากการสกัด เพื่อคำนวณความเข้มข้นของสารที่สกัดได้และนำมาละลายด้วยสารละลาย DMSO

5.4 นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 5.3 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืชด้วยวิธี Agar Diffusion โดยผสมสารสกัดลงในอาหาร NB ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดสุดท้ายเป็นความเข้มข้น 500 1,000 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยอดลงไปในหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทำการวัดขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น

ในขณะที่การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช ทำการเลี้ยงราก่อโรคพืช จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. gloconosporioides*, *F. monilifomis*, *F. periferatum* และ *F. solani* บนอาหาร NA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เมื่อมีการเจริญของราก่อโรคพืชใช้ cock borer เจาะชิ้นอาหารให้เป็นหลุม โดยห่างจากเส้นใยราก่อโรคพืชประมาณ 3 เซนติเมตร จากนั้นหยดสารละลายที่สกัดได้และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นตรวจสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชและตรวจดูลักษณะเส้นใยของราก่อโรคพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืชบนใบของต้นถั่วเขียว

6.1 นำเมล็ดถั่วเขียวมาแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวางไว้บนก้อนสำลีที่ผ่านการชุบน้ำให้ชุ่มและรดน้ำทุกวันจนเมล็ดถั่วเขียวงอกกลายเป็นต้นถั่วเขียว โดยให้ต้นถั่วเขียวมีอายุประมาณ 5-7 วันหรือจนกว่ามีใบของต้นถั่วเขียวเจริญเกิดขึ้น

6.2 เลี้ยงเอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 ลงในอาหาร NB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ

8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนตะกอนเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากกัน โดยส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ทำการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปใช้ในการทดสอบบนใบพืชต่อไป

สำหรับส่วนของตะกอนเซลล์แบคทีเรียทำการล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลาย 1X PBS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 2 รอบ ต่อมาเมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จเรียบร้อยแล้วนำตะกอนเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลาย 1X PBS ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและทำการปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 OD และนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืชต่อไป

6.3 เลี้ยง *X. axonopodis* โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียดังกล่าวลงในอาหาร NB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ทำการล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลาย 1X PBS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 2 รอบ ต่อมาเมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จเรียบร้อยแล้วนำตะกอนเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลาย 1X PBS ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและทำการปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 OD และใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืชบนใบของต้นถั่วเขียว

6.4 แบ่งกลุ่มของใบต้นถั่วเขียวออกเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ใบ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หยดสารละลาย *X. axonopodis* ตามด้วยหยดสารละลายเอนโดไฟท์ KUs6

กลุ่มที่ 2 หยดสารละลาย *X. axonopodis* ตามด้วยหยดสารละลาย 1X PBS

กลุ่มที่ 3 หยดสารละลาย *X. axonopodis* ตามด้วยอาหารเลี้ยงแอนโดไฟท์ KUs6

กลุ่มที่ 4 หยดสารละลาย *X. axonopodis* ตามด้วยอาหาร NB

กลุ่มที่ 5 หยดสารละลายเอนโดไฟท์ KUs6 ตามด้วยหยดสารละลาย *X. axonopodis*

กลุ่มที่ 6 หยดสารละลาย 1X PBS ตามด้วยหยดสารละลาย *X. axonopodis*

กลุ่มที่ 7 หยดอาหารเลี้ยงเอนโดไฟท์ KUs6 ตามด้วยหยดสารละลาย *X. axonopodis*

กลุ่มที่ 8 หยดอาหาร NB ตามด้วยหยดสารละลาย *X. axonopodis*

นำเข็มเขี่ยบริเวณใบของต้นถั่วเขียวให้เกิดบาดแผลและหยดสารละลายอันดับแรกตามกลุ่มข้างต้น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนใบของต้นถั่วเขียว บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยดสารละลายอันดับที่สองลงบนใบของต้นถั่วเขียว โดยหยดตรงบริเวณบาดแผลเดียวกันที่หยดสารละลายอันดับแรก ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเช่นเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองโดย

พิจารณาความสามารถของเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในการยับยั้งการเกิดโรคของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis*

7. การทดสอบประสิทธิภาพของเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช

7.1 เลี้ยงราก่อโรคพืช จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. gloconosporioides, F. monilifomis, F. periferatum* และ *F. solani* บนอาหาร PDA จนราก่อโรคพืชเจริญและมีการสร้างสปอร์ของรา จากนั้นทำการแขวนลอยสปอร์ของราก่อโรคพืชทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยสารละลาย 0.2% Tween 20 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารละลายสปอร์ตั้งต้น จากนั้นทำการนับสปอร์ของราก่อโรคพืชโดยให้มีความเข้มข้นของสปอร์ราก่อโรคพืชเท่ากับ 10^3 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และมีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 50 มิลลิลิตร เพื่อนำมาใช้ในการสังเกตการเจริญของราก่อโรคพืชบนเมล็ดถั่วเขียว

7.2 นำเมล็ดถั่วเขียว จำนวน 100 เมล็ด มาล้างด้วยสารละลาย 1% โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำเมล็ดที่ได้ล้างทำความสะอาดแล้วนำมาใช้ในการปลูกเชื้อต่อไป

7.3 เลี้ยงเอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวลงในอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการแยกส่วนของตะกอนเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ออกจากกัน โดยส่วนของตะกอนเซลล์นำมาล้างด้วยสารละลาย 1X PBS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 2 รอบ เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จเรียบร้อยแล้วนำตะกอนเซลล์มาแขวนลอยในสารละลาย 1X PBS และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและทำการปรับให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 OD โดยให้มีปริมาตรของตะกอนเซลล์ที่แขวนลอยมีปริมาตรสุทธิ 50 มิลลิลิตร

7.4 เทสารละลายตะกอนเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตรที่ได้จากข้อ 7.2 ลงในเมล็ดถั่วเขียวที่ผ่านการทำความสะอาดจากข้อ 7.1 จำนวน 50 เมล็ด และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน

7.5 เทสารละลาย 1X PBS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในเมล็ดถั่วเขียวที่ผ่านการทำความสะอาดจากข้อ 7.1 จำนวน 50 เมล็ด และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมลบ

7.6 เทสารละลายเอนโดไฟท์แบคทีเรียและสารละลาย 1X PBS ทิ้ง จากนั้นเทสารละลายสปอร์ของราก่อโรคพืชที่มีความเข้มข้นของสปอร์ราเท่ากับ 10^3 สปอร์ต่อมิลลิลิตรลงบนเมล็ดถั่วเขียวและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

7.7 เทสารละลายสปอร์ของราก่อโรคพืชทิ้งและนำเมล็ดถั่วเขียวที่ได้มาวางบนจานเพาะเชื้อที่มีแผ่นสำลีที่ปลอดเชื้อ โดยวางเมล็ดถั่วเขียวจำนวน 5 เมล็ดต่อจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วันและ 7 วัน สังเกตการเจริญของราก่อโรคพืชบนเมล็ดถั่วเขียวและบันทึกผล

8. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA (16S rDNA sequencing)

8.1 เขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหาร Nutrient agar (NA) ใส่สารละลาย DNAzol (Invitrogen, UK) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่และเติม 100% เอทานอล (เย็น) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาทีและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อมาเติมสารละลาย 75% เอทานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปเป็นต้นแบบสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

8.2 เตรียม Master mix สำหรับทำ Polymerase chain reaction (PCR) มีส่วนประกอบดังนี้

น้ำ	9.3	ไมโครลิตร
10X Taq buffer	2	ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	1	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.2	ไมโครลิตร
10 µM Forward primer (27F)	0.2	ไมโครลิตร
10 µM Reverse primer (1492R)	0.2	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 Units/µl)	0.1	ไมโครลิตร
สารละลายดีเอ็นเอ (ข้อ 8.1)	7	ไมโครลิตร

จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โดยมีสภาวะดังนี้

94 องศาเซลเซียส	3 นาที	1	รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	35	รอบ
57 องศาเซลเซียส	30 วินาที		
72 องศาเซลเซียส	2 นาที		
72 องศาเซลเซียส	6 นาที	1	รอบ
25 องศาเซลเซียส	ไปเรื่อย ๆ		

8.3 ทำการตกตะกอนผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย 1/10 Volume ของ 3 M NaOAc และ 2 Volume ของ Ethanol แช่ทิ้งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

8.4 นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใส (supernatant) ทิ้ง และล้างด้วย 75% Ethanol 750 ไมโครลิตร ตากตะกอนให้แห้ง เมื่อตะกอนแห้งสนิทแล้ว เติมน้ำ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

8.5 นำตัวอย่างมาตรวจสอบด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล (Agarose Gel Electrophoresis) และนำไปทำให้บริสุทธิ์ ก่อนส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพร์เมอร์ 27F, 800R และ 1492R

8.6 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ผลโดยเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

ผลการวิจัย (Results)

การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์

จากการนำเอนโดไฟท์แบคทีเรียจำนวน 42 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli S. aureus B. subtilis* และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี Agar diffusion พบว่าเอนโดไฟท์แบคทีเรียบางสายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ นอกจากนี้เอนโดไฟท์แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้มากกว่า 2 สายพันธุ์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์

สายพันธุ์	ไอโซเลท	*E. coli*	*S. aureus*	*B. subtilis*	*P. aeruginosa*
ห้วยบง 60	HB_L – 1	-	-	-	-
(HB)	HB_L – 2	-	-	-	-
HB_L ใบ	HB_L – 3	-	-	-	-
(3 เดือน)	HB_L – 4	-	-	-	-
	HB_L - 5	-	-	-	-
ห้วยบง 60	HB_L – 6	-	-	++	-
(HB)	HB_L – 7	-	+	-	-
HB_L ใบ	HB_L – 8	-	-	++	-
(6 เดือน)	HB_L – 9	-	-	+	-
	HB_L – 10	-	-	+	-
ห้วยบง 60	HB_r – 1	+	+	-	-
(HB)	HB_r – 2	-	-	-	-
HB_r หัวมันสำปะหลัง	HB_r – 3	-	+	-	-
(12 เดือน)	HB_r – 4	-	-	-	-
	HB_r – 5	-	-	-	-
	HB_r – 6	-	-	-	-
	HB_r – 7	+	+	-	-
	HB_r – 8	-	-	-	-
	HB_r – 9	-	-	-	-
ห้วยบง 60	HB_S – 1	+	-	+	-
(HB)	HB_S – 2	-	-	+	-
HB_S ลำต้น	HB_S – 3	-	-	-	-
(12 เดือน)					
เกษตรศาสตร์ 50	KU_S – 1	-	+	+	-
(KU)	KU_S – 2	-	+	+	-
KU_S ลำต้น	KU_S – 3	-	-	-	-

(0 เดือน)	KU_S – 4	-	-	-	-
เกษตรศาสตร์ 50 (KU) KU_S ลำต้น (3 เดือน)	KU_s – 6	++	++	+	-
เกษตรศาสตร์ 50 (KU) KU_S ลำต้น (9 เดือน)	KU_s – 1	-	-	+	-
	KU_s – 2	-	-	+	-
	KU_s – 3	-	-	+	-
	KU_s – 4	-	-	++	-
พิรุณ 1 (PR1) $PR1_r$ หัวมันสำปะหลัง (9 เดือน)	$PR1_r$ – 1	-	++	-	-
	$PR1_r$ – 2	-	++	-	-
	$PR1_r$ – 3	-	++	-	-
	$PR1_r$ – 4	-	+	-	-
	$PR1_r$ – 5	-	+	+	-
พิรุณ 1 (PR1) $PR1_s$ ลำต้น (0 เดือน)	$PR1_s$ – 1	+	-	-	-
	$PR1_s$ – 2	+	-	-	-
พิรุณ 1 (PR1) $PR1_s$ ลำต้น (9 เดือน)	$PR1_s$ – 1	-	-	++	-
	$PR1_s$ – 2	+	++	++	-
	$PR1_s$ – 3	-	++	+	-
	$PR1_s$ – 4	-	+	++	-

กำหนดให้ – แทนเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้

+ แทนเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยมีวงใส 0.5-1 เซนติเมตร

++ แทนเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยมีวงใส 1-2 เซนติเมตร

+++ แทนเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช โดยมีวงใส 2-3 เซนติเมตร

จากผลการทดลองพบว่า ความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ พบว่าเอนโดไฟท์แบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้บางส่วน และโดยส่วนใหญ่เอนโดไฟท์แบคทีเรียที่ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจะเป็นผลลบหรือเพียงลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคนั้น

การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์

ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* ร่วมด้วย ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่

ตารางที่ 2 ความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช

สายพันธุ์	ไอโซเลท	*X. axonopodis*
ห้วยบง 60	HB_L – 1	-
(HB)	HB_L – 2	-
HB_L ใบ	HB_L – 3	-
(3 เดือน)	HB_L – 4	-
	HB_L - 5	-
ห้วยบง 60	HB_L – 6	+++
(HB)	HB_L – 7	+++
HB_L ใบ	HB_L – 8	+++
(6 เดือน)	HB_L – 9	อยู่ระหว่างดำเนินการ
	HB_L – 10	อยู่ระหว่างดำเนินการ
ห้วยบง 60	HB_r – 1	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(HB)	HB_r – 2	อยู่ระหว่างดำเนินการ
HB_r หัวมันสำปะหลัง	HB_r – 3	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(12 เดือน)	HB_r – 4	อยู่ระหว่างดำเนินการ
	HB_r – 5	อยู่ระหว่างดำเนินการ
	HB_r – 6	อยู่ระหว่างดำเนินการ
	HB_r – 7	-
	HB_r – 8	อยู่ระหว่างดำเนินการ
	HB_r – 9	อยู่ระหว่างดำเนินการ
ห้วยบง 60	HB_s – 1	+++
(HB)	HB_s – 2	-
HB_s ลำต้น	HB_s – 3	-
(12 เดือน)	HB_s – 4	+++
เกษตรศาสตร์ 50	KU_s – 1	-
(KU)	KU_s – 2	-
KU_S ลำต้น	KU_S – 3	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(0 เดือน)	KU_S – 4	-
เกษตรศาสตร์ 50	KU_s – 6	+++
(KU)		
KU_S ลำต้น		
(3 เดือน)		

เกษตรศาสตร์ 50	KU_S – 1	+
(KU)	KU_S – 2	อยู่ระหว่างดำเนินการ
KU_S ลำต้น	KU_S – 3	+++
(9 เดือน)	KU_S – 4	อยู่ระหว่างดำเนินการ
พิรุณ 1	$PR1_r$ – 1	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(PR1)	$PR1_r$ – 2	อยู่ระหว่างดำเนินการ
$PR1_r$ หัวมันสำปะหลัง	$PR1_r$ – 3	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(9 เดือน)	$PR1_r$ – 4	อยู่ระหว่างดำเนินการ
	$PR1_r$ – 5	-
พิรุณ 1	$PR1_s$ – 1	-
(PR1)	$PR1_s$ – 2	-
$PR1_s$ ลำต้น		
(0 เดือน)		
พิรุณ 1	$PR1_s$ – 1	+++
(PR1)	$PR1_s$ – 2	+++
$PR1_s$ ลำต้น	$PR1_s$ – 3	-
(9 เดือน)	$PR1_s$ – 4	+++

กำหนดให้ – แทนเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืชได้

+ แทนเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช โดยมีวงใส 0.5-1 เซนติเมตร

++ แทนเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช โดยมีวงใส 1-2 เซนติเมตร

+++ แทนเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช โดยมีวงใส 2-3 เซนติเมตร

จากผลการทดลองพบว่าเอนโดไฟท์แบคทีเรียมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* โดยมีวงใสประมาณ 2-3 เซนติเมตร แสดงให้เห็นว่าเอนโดไฟท์แบคทีเรียมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืชได้ดีกว่าแบคทีเรียก่อโรคในคน จึงได้เน้นทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืชต่อไป

การศึกษาความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช

จากการทดสอบความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. gloeosporioides F. moniliformis F. proliferatum F. solani* ด้วยวิธี Dual cultivation พบว่ามีเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช

สายพันธุ์	ไอโซเลท	*C. gloeosporioides*	*F. moniliformis*	*F. proliferatum*	*F. solani*
ห้วยบง 60	HB_L – 1	-	-	-	-
(HB)	HB_L – 2	-	-	-	-
HB_L ใบ	HB_L – 3	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(3 เดือน)	HB_L – 4	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
	HB_L - 5	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่รหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
ห้วยบง 60	HB_L – 6	+	+	+	+
(HB)	HB_L – 7	+	+	+	+
HB_L ใบ	HB_L – 8	-	-	-	-
(6 เดือน)	HB_L – 9	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
	HB_L – 10	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
ห้วยบง 60	HB_r – 1	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(HB)	HB_r – 2	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
HB_r หัวมัน	HB_r – 3	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
สำปะหลัง	HB_r – 4	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(12 เดือน)	HB_r – 5	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
	HB_r – 6	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
	HB_r – 7	-	-	-	-
	HB_r – 8	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
	HB_r – 9	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
ห้วยบง 60	HB_s – 1	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(HB)	HB_s – 2	-	-	-	-
HB_s ลำต้น	HB_s – 3	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(12 เดือน)					
เกษตรศาสตร์ 50	KU_s – 1	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(KU)	KU_s – 2	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
KU_S ลำต้น	KU_S – 3	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(0 เดือน)	KU_S – 4	-	-	-	-
เกษตรศาสตร์ 50	KU_s – 6	+	+	+	+
(KU)					
KU_S ลำต้น					
(3 เดือน)					
เกษตรศาสตร์ 50	KU_s – 1	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(KU)	KU_s – 2	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
KU_S ลำต้น	KU_s – 3	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(9 เดือน)	KU_s – 4	+	+	+	+

พิรุณ 1	$PR1_r$ – 1	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(PR1)	$PR1_r$ – 2	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
$PR1_r$ หัวมัน	$PR1_r$ – 3	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
สำปะหลัง	$PR1_r$ – 4	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(9 เดือน)	$PR1_r$ – 5	+	+	+	+
พิรุณ 1	$PR1_s$ – 1	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
(PR1)	$PR1_s$ – 2	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
$PR1_s$ ลำต้น					
(0 เดือน)					
พิรุณ 1	$PR1_s$ – 1	+	+	+	+
(PR1)	$PR1_s$ – 2	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ	อยู่ระหว่างดำเนินการ
$PR1_s$ ลำต้น	$PR1_s$ – 3	-	-	-	-
(9 เดือน)	$PR1_s$ – 4	+	+	+	+

การสกัดสาร Lipopeptide ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืช

หลังจากได้ทำการศึกษาเบื้องต้นของความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืช จึงได้ทำการคัดเลือกเอนโดไฟท์แบคทีเรียมา 1 สายพันธุ์ นั่นคือ KUs6 เพื่อนำมาศึกษาสารสกัด Lipopeptide ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืชด้วยวิธี Acid precipitation จากนั้นทำการสกัดตะกอนที่ได้ด้วยเมทานอลและระเหยเมทานอลออก ต่อมาละลายสาร Lipopeptide ด้วย 50 mM Tris-HCL, pH 8 นำมากรองด้วย Filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืช ด้วยวิธี Agar diffusion โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของสาร Lipopeptide ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืช ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1 และ 2

รูปที่ 1 ความสามารถของสาร Lipopeptide ที่สกัดได้จากเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* โดยทำการแปรความเข้มข้นของสาร Lipopeptide ที่สกัดได้

แถวบน : Positive control (50 mM Tris-HCL, pH 8 ผสมด้วยกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

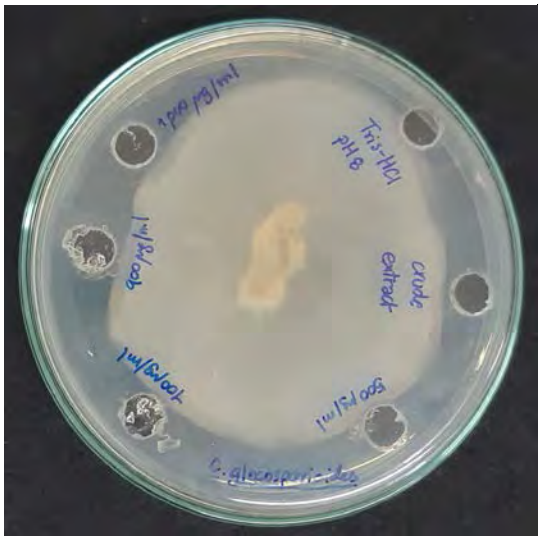
: Negative control (50 mM Tris-HCL, pH 8)

แถวกลาง : Lipopeptide ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

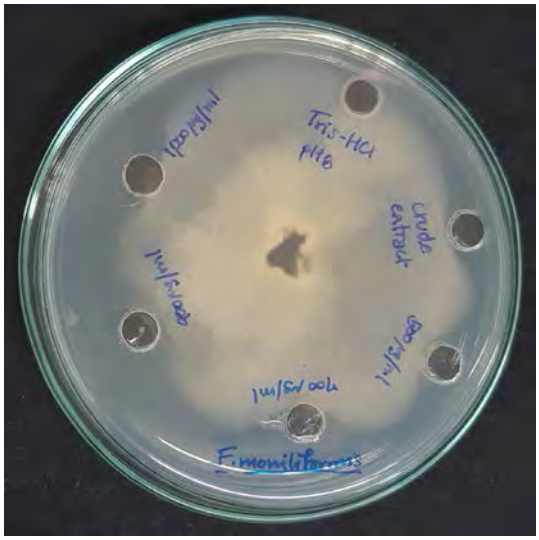
: Lipopeptide ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

แถวล่าง : Lipopeptide ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

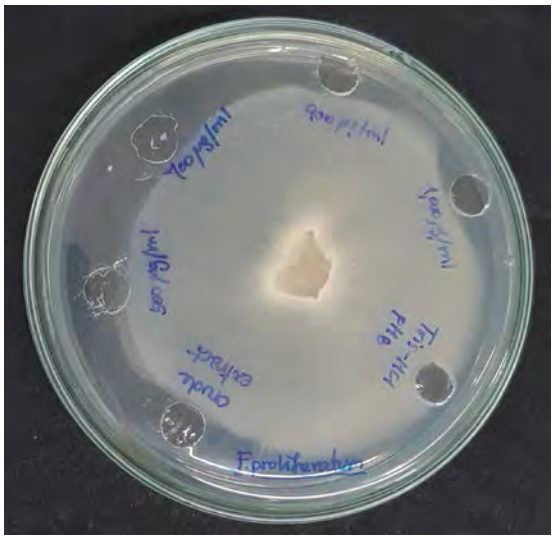
: Lipopeptide ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



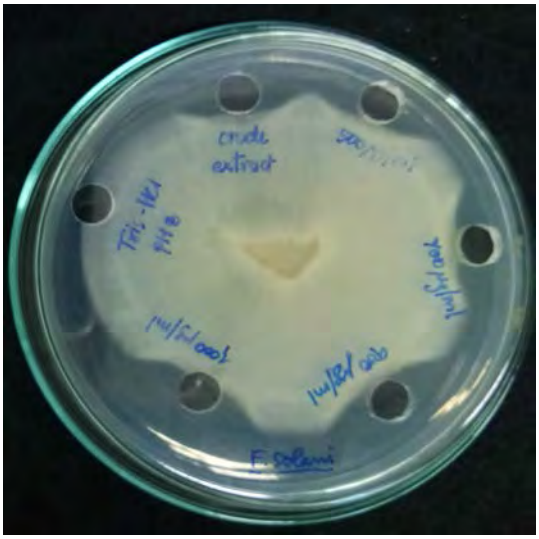
A) รา *C. glocosporioides*



B) รา *F. moniliformis*



C) รา *F. proliferatum*



D) รา *F. solani*

รูปที่ 2 ความสามารถของสาร Lipopeptide ที่สกัดได้จากเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์ ได้แก่ A) *C. glocosporioides* B) *F. moniliformis* C) *F. proliferatum* และ D) *F. solani* โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของสาร Lipopeptide ที่สกัดได้

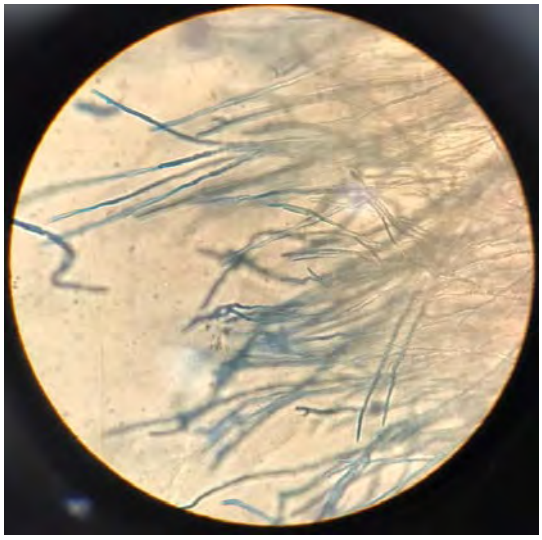
Positive control : Crude Extract (ก่อนสกัดด้วย Methanol)

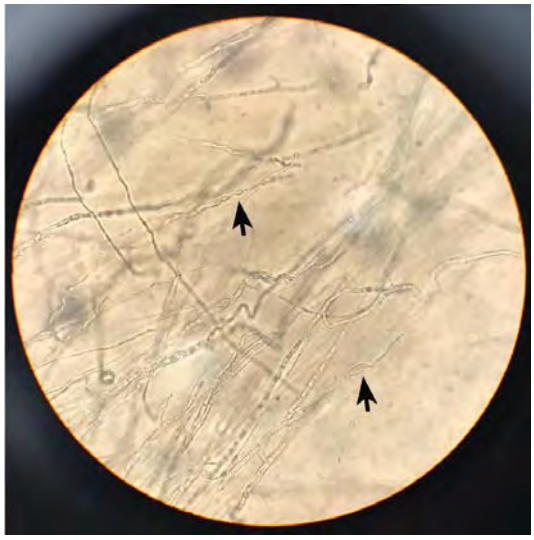
Negative control : 50 mM Tris-HCL, pH 8

Lipopeptide : ความเข้มข้น 500, 700, 900 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

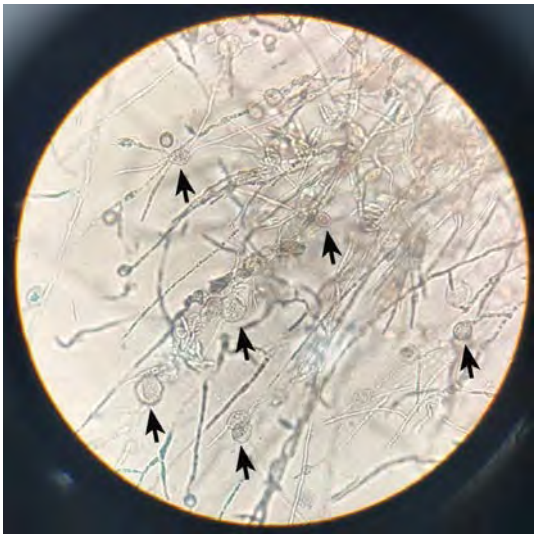
จากผลการทดลองพบว่าสาร Lipopeptide ที่สกัดได้จากเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* โดยสามารถเห็นวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพืชได้อย่างชัดเจนตั้งแต่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Lipopeptide เป็นความเข้มข้น 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าขนาดของวงใสมีขนาดเพิ่มมากขึ้นโดยแปรผันตามความเข้มข้นของ Lipopeptide ในขณะที่เมื่อทำการศึกษาความสามารถของสาร Lipopeptide ที่สกัดได้จากเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. gloeosporioides F. moniliformis F. proliferatum* และ *F. solani* โดยแปรความเข้มข้นของสาร Lipopeptide จากผลการทดลองพบว่าสาร Lipopeptide ที่สกัดได้สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชทั้ง 4 สายพันธุ์และเมื่อทำการแปรความเข้มข้นของสาร Lipopeptide พบว่าการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้เมื่อทำการสังเกตความผิดปกติของเส้นใยของราก่อโรคพืชในตัวอย่าง Lipopeptide เปรียบเทียบกับ control ที่มีการเติม 50 mM Tris-HCL, pH 8 พบว่าเส้นใยของราก่อโรคพืชทั้ง 4 สายพันธุ์มีความปกติ โดยบางสายพันธุ์จะมีการหงิกงอของเส้นใย ทำให้ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ในขณะที่ราก่อโรคพืชบางสายพันธุ์เมื่อบ่มด้วยสาร Lipopeptide พบว่ามีการโป่งพองของปลายเส้นใย ทำให้ไม่สามารถเจริญต่อไปได้เช่นเดียวกัน ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3A-3D

A) รา *C. glocosporioides*

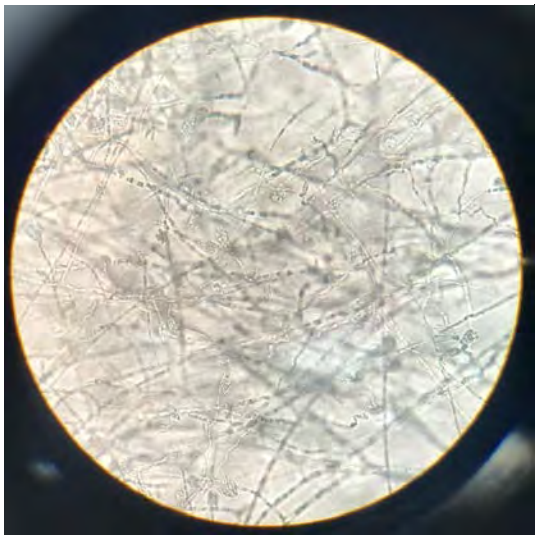




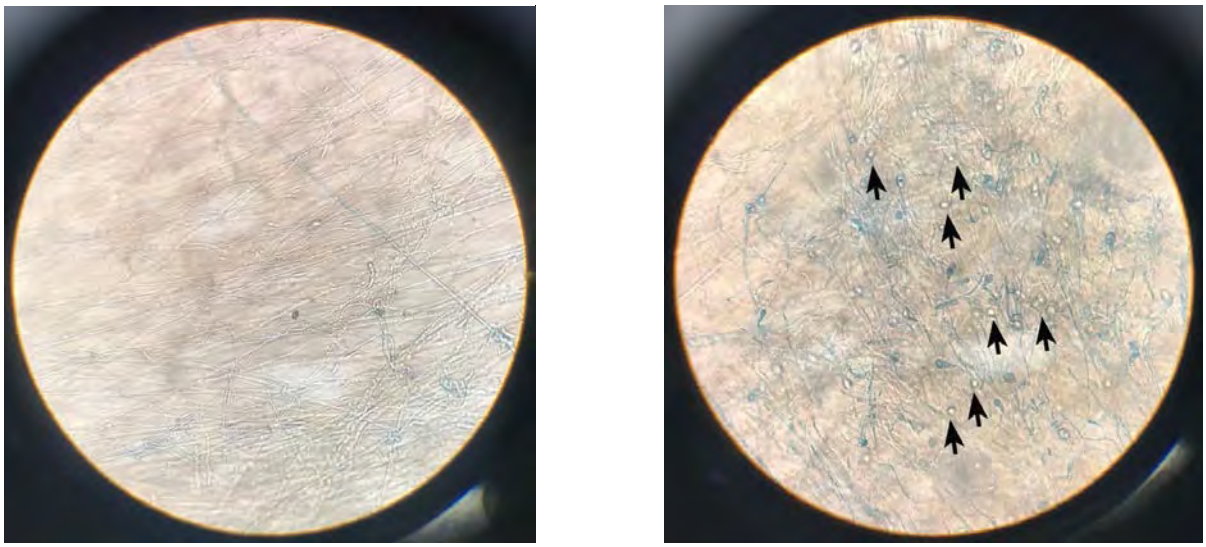
B) รา *F. moniliformis*



C) รา *F. proliferatum*



D) รา *F. solani*



รูปที่ 3 ลักษณะของเส้นใยของราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์ ได้แก่ A) *C. glocosporioides* B) *F. moniliformis* C) *F. proliferatum* และ D) *F. solani* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40X เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มที่มี Lipopeptide ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพซ้าย : เส้นใยของราก่อโรคพืชในกลุ่ม control

ภาพขวา : เส้นใยของราก่อโรคพืชในกลุ่มที่มี Lipopeptide ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(ลูกศรชี้แสดงลักษณะที่ผิดปกติของเส้นใยราก่อโรคพืช)

จากผลการศึกษาความสามารถเบื้องต้นของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคในพืช และคัดเลือกมา 1 สายพันธุ์ในการสกัดสาร Lipopeptide พบว่าสารสกัด Lipopeptide ที่สกัดได้จากไอโซเลท KUs6 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคพืช *X. axonopodis* และราที่ก่อให้เกิดโรคพืชได้ *C. glocosporioides*, *F. moniliformis*, *F. proliferatum* และ *F. solani* ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พบว่า เอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ PgBE240 (Accesion No. MH144310.1) โดยมีความคล้ายคลึงกัน 99% และสารสกัด Lipopeptide จะถูกทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาขั้นตอนต่อไป

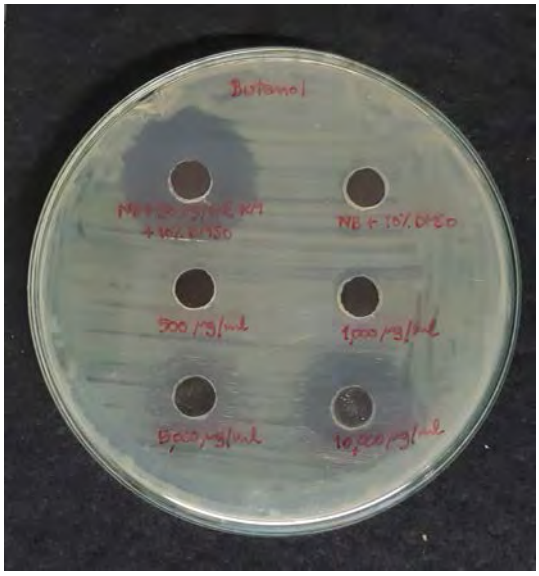
การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุติยภูมิของเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 และความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและราก่อโรคพืชของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุติยภูมิ

จากการทดลองสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุติยภูมิที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช โดยใช้ตัวทำละลายทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ Ethylacetate Dichloromethane และ Butanol ที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 ด้วยวิธี Agar Diffusion สารที่สกัดได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดจะมีการชั่งน้ำหนักและนำมาละลายด้วยสารละลาย DMSO จากนั้นทำการแปรความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 500 1,000 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุติยภูมิที่สามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* สามารถสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย Butanol (รูปที่ 4) และให้ขนาดของวงใสที่ความเข้มข้นของสารสกัด 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 14 และ 22.33 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นของสารสกัด 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เกิดวงใสเกิดขึ้น นั่นแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืชได้ (ตารางที่ 4) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่นจะเห็นได้ว่าสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลาย Ethylacetate และ Dichloromethane ในการสกัดสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพืช พบว่าไม่เกิดวงใสเกิดขึ้นในทุกความเข้มข้นของสารสกัด แสดงว่าตัวทำละลาย Ethylacetate และ Dichloromethane ไม่สามารถสกัดสารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการเลือกตัวทำละลาย Butanol เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช นอกจากนี้จึงได้นำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย Butanol นำมายับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชต่อไป

(ก)

(ข)

(ค)



รูปที่ 4 ความสามารถของสารสกัดจากเอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* ที่ความเข้มข้น 500 1,000 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(ก) สารสกัดจากตัวทำละลาย Ethylacetate

(ข) สารสกัดจากตัวทำละลาย Dichloromethane

(ค) สารสกัดจากตัวทำละลาย Butanol

ตารางที่ 4 ขนาดของวงใสที่วัดได้จากสารสกัดจากเอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ Ethylacetate Dichloromethane และ Butanol ที่ความเข้มข้น 500 1,000 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

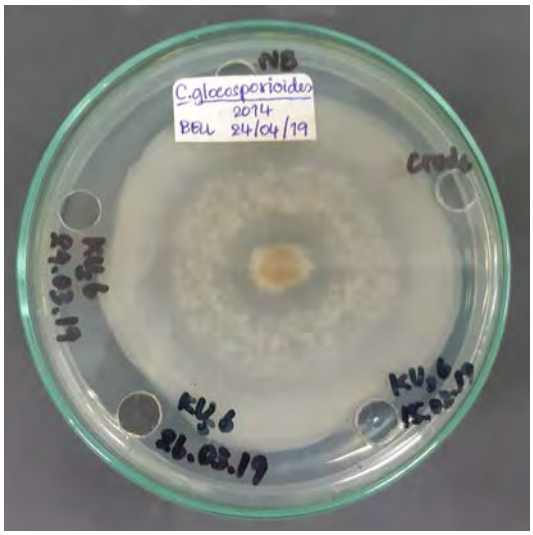
ตัวอย่าง	ขนาดของวงใส (มิลลิเมตร)			
	จานเพาะเชื้อที่ 1	จานเพาะเชื้อที่ 2	จานเพาะเชื้อที่ 3	ขนาดวงใสเฉลี่ย
1. ตัวทำละลาย Ethylacetate				
- ตัวควบคุมบวก*	20	22	21	21
- ตัวควบคุมลบ**	-	-	-	-
- ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	-	-	-	-
- ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	-	-	-	-
- ความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	-	-	-	-
- ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	-	-	-	-
2. ตัวทำละลาย Dichloromethane				
- ตัวควบคุมบวก*	22	22	24	22.67
- ตัวควบคุมลบ**	-	-	-	-
- ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	-	-	-	-
- ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	-	-	-	-
- ความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	-	-	-	-
- ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	-	-	-	-
3. ตัวทำละลาย Butanol				
- ตัวควบคุมบวก*	22	24	25	23.67
- ตัวควบคุมลบ**	-	-	-	-
- ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	-	-	-	-
- ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	-	-	-	-
- ความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	15	14	13	14
- ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	22	21	24	22.33

* ตัวควบคุมบวก จะใช้อาหาร NB ที่ผสมสารละลาย 10% DMSO และยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

** ตัวควบคุมลบ จะใช้อาหาร NB ที่ผสมสารละลาย 10% DMSO

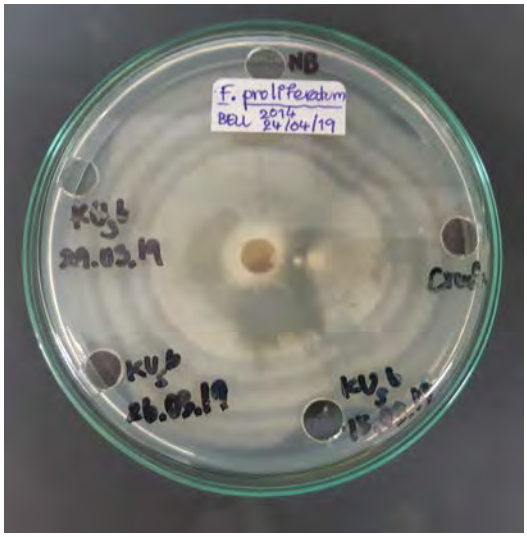
สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. gloconosporioides F. monilifomis F. periferatum* และ *F. solani* ได้ทำการคัดเลือกสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย Butanol มายับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี Agar Diffusion จากนั้นนำมาส่องดูลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย Butanol มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. gloconosporioides F. monilifomis* และ *F. periferatum* โดยพบว่าไม่มีการเจริญของราก่อโรคพืชในขณะที่ตัวควบคุมลบ (อาหาร NB) มีการเจริญของราก่อโรคพืชอย่างชัดเจน (รูปที่ 5) อย่างไรก็ตามได้มีการทดลองประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *F.solani* แต่เนื่องจากมีการเจริญของเชื้ออื่นเกิดขึ้น ทำให้ไม่สามารถมองเห็นประสิทธิภาพของสารสกัดอย่างชัดเจน อย่างไรก็ดี ผลการทดลองข้างต้นพบว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย Butanol มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา *F. monilifomis* และ *F. periferatum* ซึ่งเป็นราที่อยู่ในจีนัสเดียวกันกับ *F. solani* ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย Butanol น่าจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของรา *F. solani* ได้เช่นเดียวกัน เมื่อทำการส่องความผิดปกติของเส้นใยของราก่อโรคพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยของราก่อโรคพืชที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากตัวทำละลาย Butanol มีความผิดปกติ โดยมีการหงิกงอของเส้นใยและกระจุกอยู่รวมกัน ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับเส้นใยที่ทดสอบด้วยอาหาร NB ที่ผสม 10% DMSO พบว่าเส้นใยมีลักษณะการเจริญที่ปกติคือมีลักษณะยืดยาว เป็นเส้นตรง ไม่มีอาการหงิกงอหรือเป็นกระจุก (รูปที่ 6)

(ก) *C. gloconosporioides*



(ข) *F. moniliformis*

(ค) *F. periferatum*



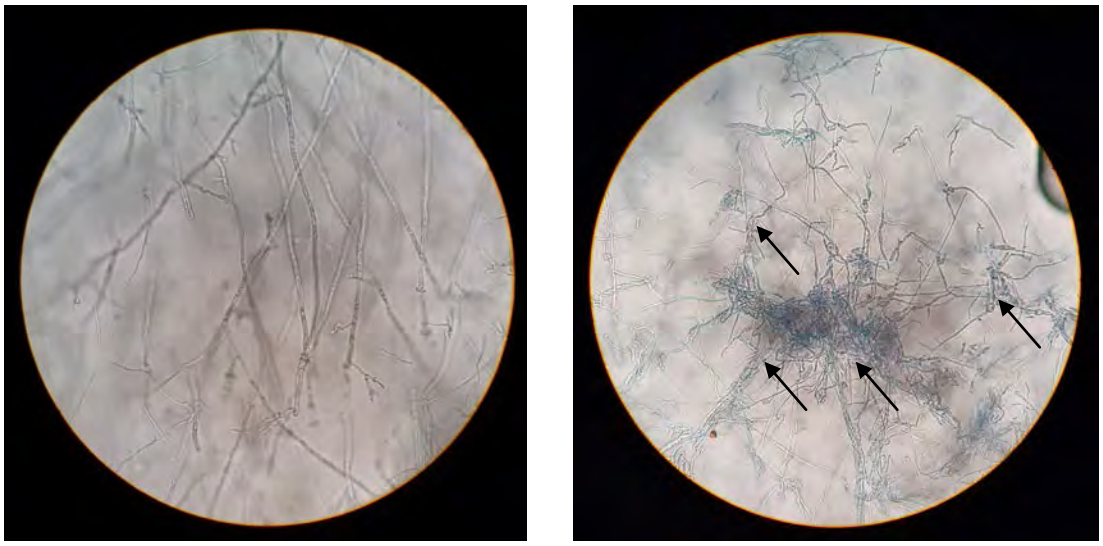
รูปที่ 5 ประสิทธิภาพจากสารสกัดที่ได้จากเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6 โดยใช้ตัวทำละลาย Butanol ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชบนจานเพาะเชื้อ

NB : อาหารเลี้ยงเชื้อ NB (ตัวควบคุมลบ)

Crude : อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6 ที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร

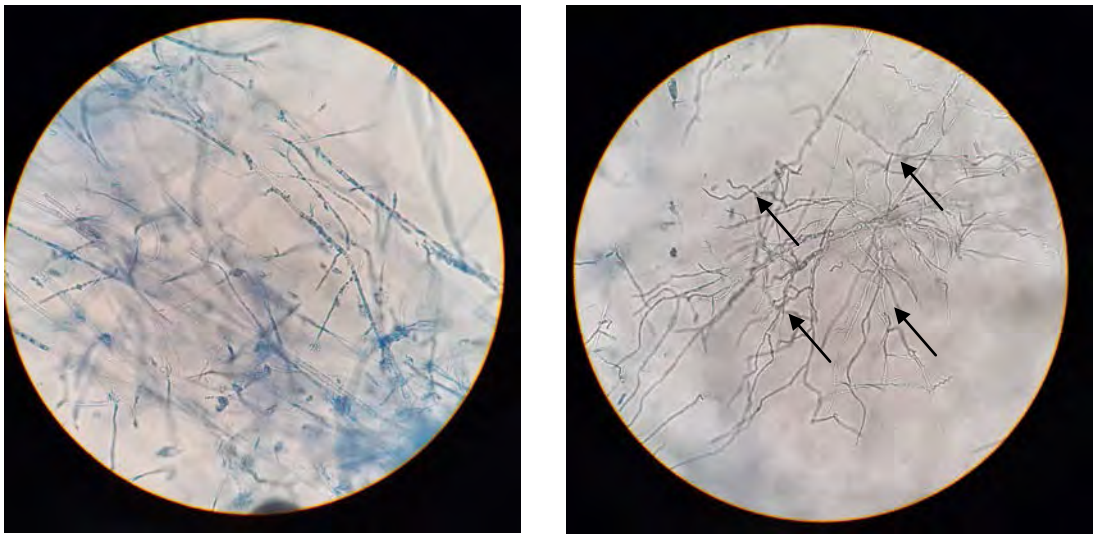
KUs6 : สารสกัดที่ได้จากเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6 โดยใช้ตัวทำละลาย Butanol ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(ก) *C. gloconosporioides*



NB สารสกัดจากเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6

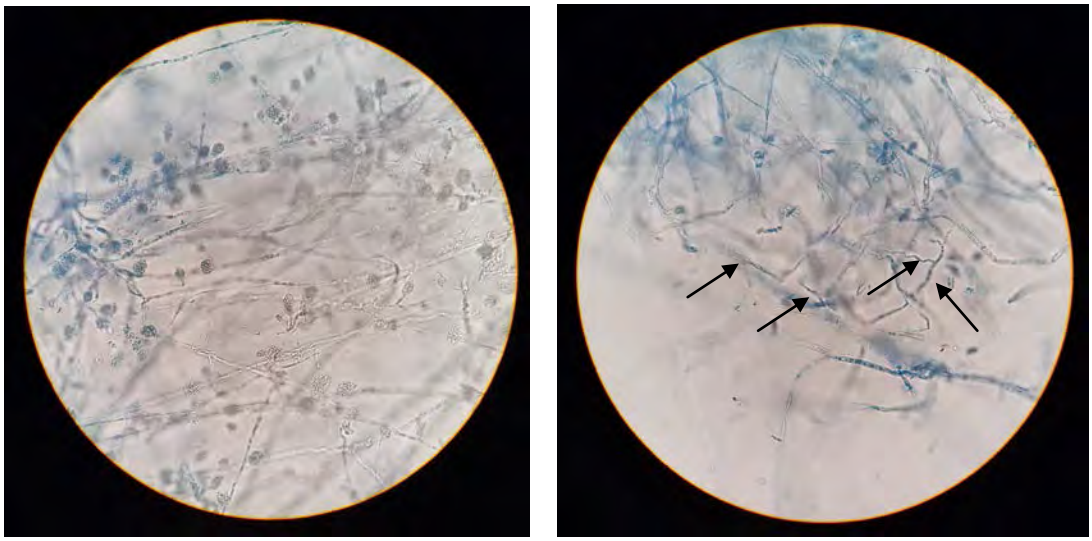
(ข) *F. moniliformis*



NB สารสกัดจากเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6

รูปที่ 6 ลักษณะความผิดปกติของเส้นใยของราก่อโรคพืชที่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดที่ได้จากเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6 โดยใช้ตัวทำละลาย Butanol เปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบ (อาหารเลี้ยงเชื้อ NB)

(ค) *F. periferatum*



NB สารสกัดจากเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6

รูปที่ 6 ลักษณะความผิดปกติของเส้นใยของราก่อโรคพืชที่ผ่านการทดสอบด้วยสารสกัดที่ได้จากเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6 โดยใช้ตัวทำละลาย Butanol เปรียบเทียบกับตัวควบคุมลบ (อาหารเลี้ยงเชื้อ NB) (ต่อเนื่อง)

การทดสอบประสิทธิภาพของเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืชบนใบของต้นถั่วเขียว

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืชบนใบของต้นถั่วเขียวและตรวจสอบการยับยั้งการเกิดโรคบนใบต้นถั่วเขียว โดยเทียบลำดับการหยดของสารละลาย โดยตัวอย่างแรกทำการหยดสารละลายเอนโดไฟท์แบคทีเรีย/อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียก่อนตามด้วยสารละลายแบคทีเรียก่อโรคพืช จากผลการทดลองพบว่าในกลุ่มของสารละลายเอนโดไฟท์แบคทีเรียมีพยาธิสภาพของการเกิดโรคบนใบของต้นถั่วเขียวน้อยกว่ากลุ่มที่หยดสารละลาย 1X PBS (รูปที่ 7 ก และ ข) แสดงให้เห็นว่าเฉพาะตัวอย่างที่หยดด้วยสารละลายเอนโดไฟท์แบคทีเรียเท่านั้นที่สามารถในการยับยั้งการเกิดโรคบนใบของต้นถั่วเขียวได้ ในขณะที่สารละลายที่ใช้ในการแขวนลอยเอนโดไฟท์แบคทีเรียไม่มีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรค จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการเกิดการยับยั้งการเกิดโรคบนใบของต้นถั่วเขียวนั้นเป็นผลมาจากเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียโดยที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับสารละลายที่ใช้ในการแขวนลอย ต่อมาเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NB พบว่ามีพยาธิสภาพของการเกิดโรคบนใบของต้นถั่วเขียวที่มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากในระหว่างการเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย เซลล์แบคทีเรียอาจมีการผลิตสารบางอย่าง เช่น เอนไซม์ กรด

อินทรีย์ เป็นต้น ซึ่งอาจมีผลต่อเซลล์ของใบของต้นถั่วเขียว จึงทำให้เกิดพยาธิสภาพที่มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (รูปที่ 7 ค และ ง)

เมื่อทำการพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียกับอาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเกิดโรคบนใบของต้นถั่วเขียว (รูปที่ 7 ข และ ง) พบว่าสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย พบพยาธิสภาพของโรคบนใบของต้นถั่วเขียวน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่าสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าในการยับยั้งการเกิดโรคของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* ด้วยเอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 ควรใช้เซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียจะให้ประสิทธิภาพดีกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคบนใบของต้นถั่วเขียวโดยการหยดแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* ก่อนตามด้วยการหยดสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย/อาหารเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย พบว่ามีพยาธิสภาพของการเกิดโรคใกล้เคียงกันระหว่างสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย/อาหารเลี้ยงเซลล์กับตัวควบคุมลบ (สารละลาย 1X PBS และอาหารเลี้ยงเชื้อ NB) นั่นแสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการหยดสารละลายเอนโดไฟท์แบคทีเรีย หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย หลังจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืชแล้วนั้นจะไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ (รูปที่ 8 ก-ง) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 นั้นมีความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียก่อโรค *X. axonopodis* ได้ดีกว่าการรักษาพืชที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนี้แล้ว ซึ่งประโยชน์ที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำเอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 นั้นนำไปพัฒนาเป็นยาน้ำหรือปุ๋ยน้ำชีวภาพ นอกจากนี้เนื่องจากเอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในสกุลของ *Bacillus* ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถสร้างสปอร์ เพื่อใช้สำหรับการสืบพันธุ์หรือเพิ่มจำนวนในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ดังนั้นอาจพัฒนาผลิตเป็นสปอร์อบแห้ง เพื่อนำมาใช้ในการป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *X. axonopodis* ได้

(ก) (ข)

(ค) (ง)

รูปที่ 7 ประสิทธิภาพของสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย/อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเกิดโรคบนใบต้นถั่วเขียว โดยทำการหยดสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย/อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียก่อนตามด้วยหยดสารละลายเซลล์แบคทีเรียก่อโรคพืช

(ก) หยดสารละลาย 1X PBS ตามด้วยสารละลายแบคทีเรีย *X. axonopodis*

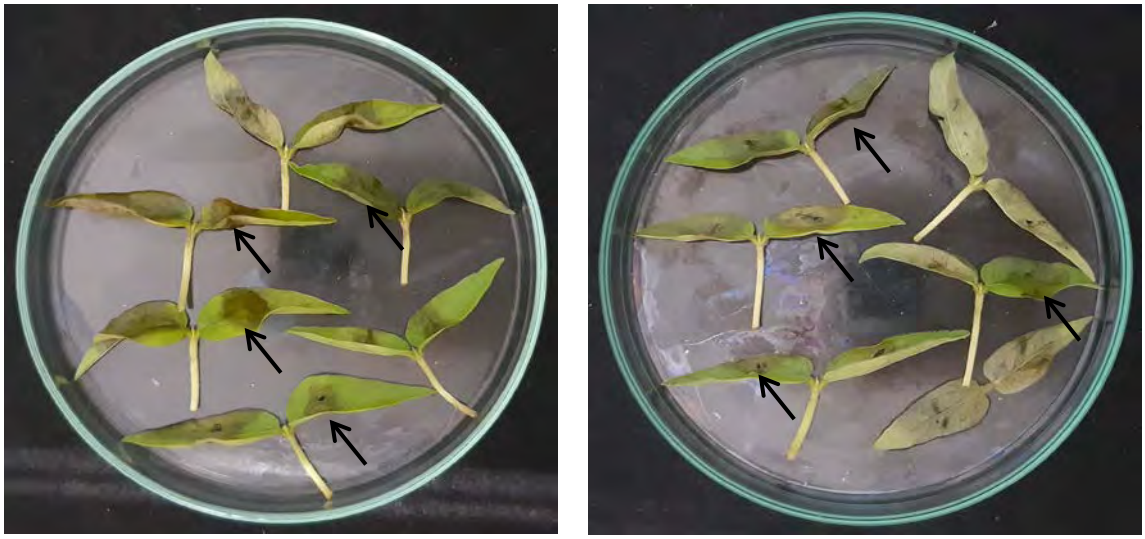
(ข) หยดสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย Kus6 ตามด้วยสารละลายแบคทีเรีย *X. axonopodis*

(ค) หยดอาหาร NB ตามด้วยสารละลายแบคทีเรีย *X. axonopodis*

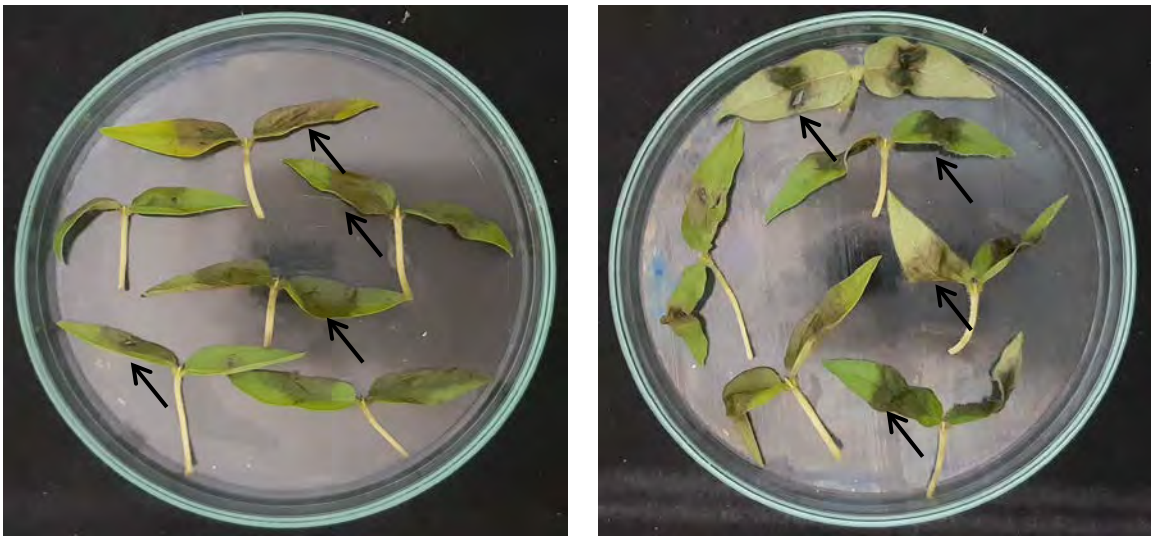
(ง) หยดอาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย Kus6 ตามด้วยสารละลายแบคทีเรีย *X. axonopodis*

หมายเหตุ บริเวณลูกศรชี้ คือ บริเวณที่เกิดพยาธิสภาพของโรค

(ก) (ข)



(ค) (ง)



รูปที่ 8 ประสิทธิภาพของสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย/อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเกิดโรคบนใบต้นถั่วเขียว โดยทำการหยดสารละลายเซลล์แบคทีเรียก่อโรคพืชก่อนตามด้วยสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย/อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย

(ก) หยดสารละลายแบคทีเรีย *X. axonopodis* ตามด้วยสารละลาย 1X PBS

(ข) หยดสารละลายแบคทีเรีย *X. axonopodis* ตามด้วยสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย Kus6

(ค) หยดสารละลายแบคทีเรีย *X. axonopodis* ตามด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB

(ง) หยดสารละลายแบคทีเรีย *X. axonopodis* ตามด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6

หมายเหตุ บริเวณลูกศรชี้ คือ บริเวณที่เกิดพยาธิสภาพของโรค

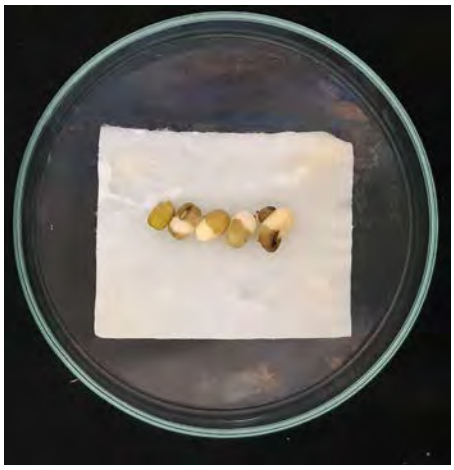
การทดสอบประสิทธิภาพของเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชบนผิวเมล็ดถั่วเขียว

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชบนเมล็ดถั่วเขียว โดยเปรียบเทียบระหว่างสารละลาย 1x PBS และ/หรือสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. gloconosporioides*, *F. monilifomis*, *F. periferatum* และ *F. solani* พบว่าเมื่อบ่มเมล็ดถั่วเขียวด้วยสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียตามด้วยสปอร์ของราก่อโรคพืชทั้ง 4 สายพันธุ์ จะไม่พบการงอกของสปอร์หรือเส้นใยของราก่อโรคพืชบนเมล็ดถั่วเขียวเมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 และ 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลาย 1X PBS พบว่ามีการงอกของสปอร์หรือเส้นใยของราก่อโรคพืชในราทุกสายพันธุ์ (รูปที่ 9 ก-ง) ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* และการงอกของราก่อโรคพืชหลายชนิด ได้แก่ *C. gloconosporioides* *F. monilifomis* *F. periferatum* และ *F. solani* ดังนั้นเอนโดไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 สามารถนำไปพัฒนาและใช้ประโยชน์ในเกษตรกรรม เพื่อลดการแพร่ระบาดของโรคพืชและเพิ่มรายได้ให้เกษตรกรได้อีกทางหนึ่ง

(ก) *C. gloconosporioides*

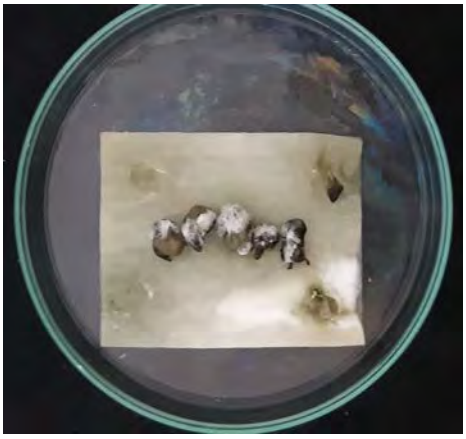
- วันที่ 3

1X PBS

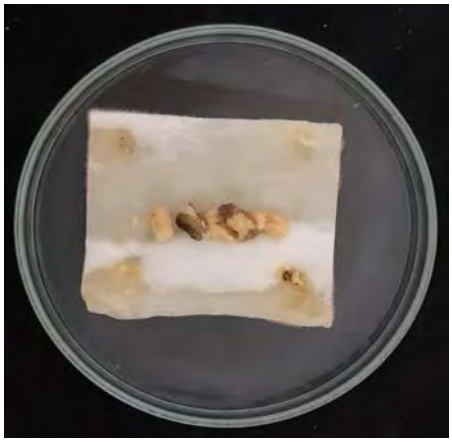


สารละลายเซลล์เอนโดไฟท์ KUs6

- วันที่ 5



1X PBS



สารละลายเซลล์เอนโดไฟท์ KUs6

รูปที่ 9 ประสิทธิภาพของสารละลายเซลล์เอนไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์ ได้แก่ (ก) *C. gloconosporioides* (ข) *F. monilifomis* (ค) *F. periferatum* และ (ง) *F. solani* หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 และ 5 วัน

(ข) *F. monilifomis*

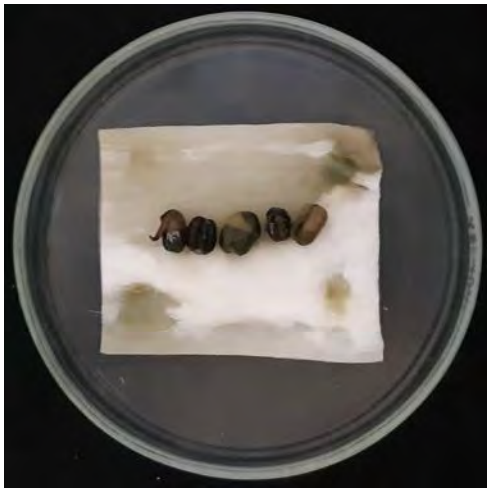
- วันที่ 3

1X PBS

สารละลายเซลล์เอนโดไฟท์ KUs6

- วันที่ 5

1X PBS

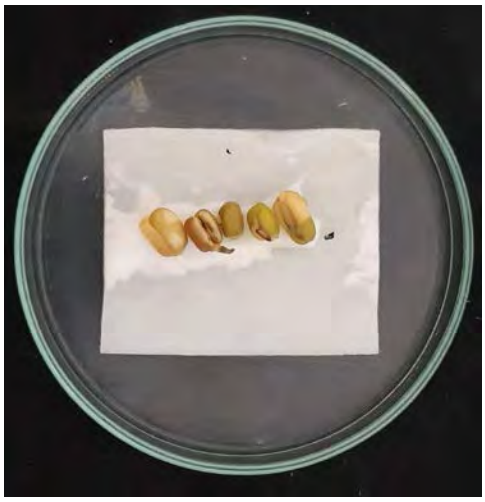


สารละลายเซลล์เอนโดไฟท์ KUs6

รูปที่ 9 ประสิทธิภาพของสารละลายเซลล์เอนไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์ ได้แก่ (ก) *C. gloconosporioides* (ข) *F. monilifomis* (ค) *F. periferatum* และ (ง) *F. solani* หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 และ 5 วัน (ต่อเนื่อง)

(ค) *F. periferatum*

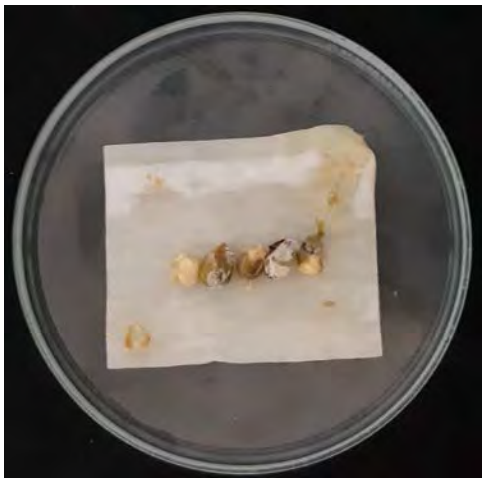
- วันที่ 3



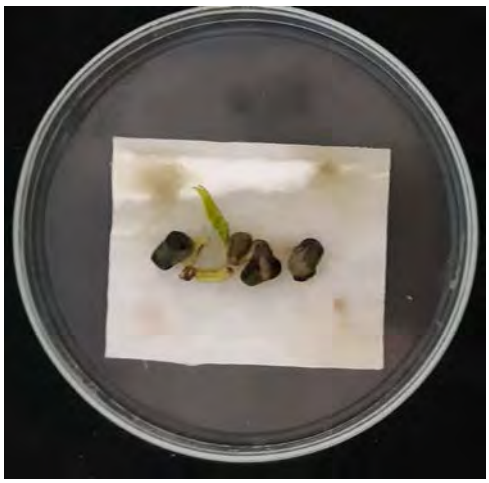
1X PBS

สารละลายเซลล์เอนโดไฟท์ KUs6

- วันที่ 5



1X PBS



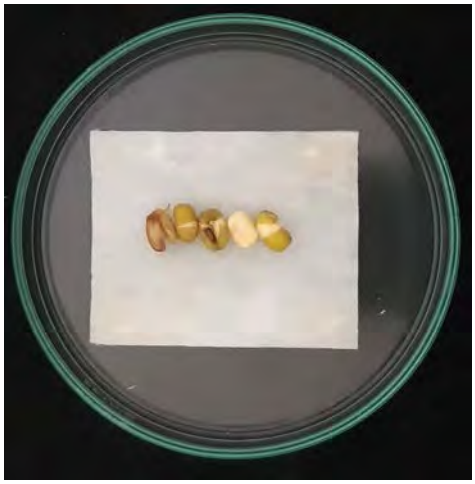
สารละลายเซลล์เอนโดไฟท์ KUs6

รูปที่ 9 ประสิทธิภาพของสารละลายเซลล์เอนไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์ ได้แก่ (ก) *C. gloconosporioides* (ข) *F. monilifomis* (ค) *F. periferatum* และ (ง) *F. solani* หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 และ 5 วัน (ต่อเนื่อง)

(ง) *F. solani*

- วันที่ 3

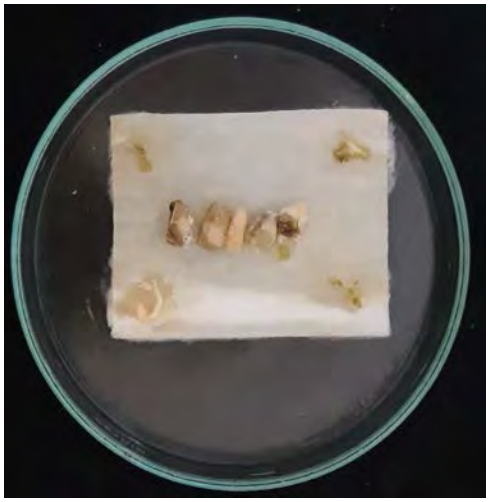
1X PBS



สารละลายเซลล์เอนโดไฟท์ KUs6

- วันที่ 5

1X PBS



สารละลายเซลล์เอนโดไฟท์ KUs6

รูปที่ 9 ประสิทธิภาพของสารละลายเซลล์เอนไฟท์แบคทีเรียรหัส KUs6 ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์ ได้แก่ (ก) *C. gloconosporioides* (ข) *F. monilifomis* (ค) *F. periferatum* และ (ง) *F. solani* หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 และ 5 วัน (ต่อเนื่อง)

อภิปราย / วิจารณ์ (Discussion) ผลการวิจัย

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุติยภูมิที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืช

แบคทีเรียก่อโรคพืชในจีนัส *Xanthomonas* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในพืชได้ประมาณ 400 ชนิด ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นพืชทางเศรษฐกิจ เช่น ข้าว มะเขือ-เทศ มะนาว กล้วย กะหล่ำปลี พริกไทย รวมทั้งพืชตระกูลถั่ว (Ryan et al., 2011; Puric et al., 2018) สำหรับในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช *X. axonopodis* ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ชนิดดังกล่าวสามารถทำให้เกิดโรคได้ในพืช เช่น ถั่วเหลือง (Athinuwat and Brooks, 2019) มะนาว (Zhao et al., 2019) มันสำปะหลัง (Liu et al., 2018) นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช ได้แก่ *C. gloconosporioides F. miniliformis F. periferatum* และ *F. solani* ซึ่งราสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคในพืชได้หลายชนิดเช่นเดียวกัน เช่น แอปเปิ้ล (Yan et al., 2018) ยางพารา (Liu et al., 2018) กล้วย (Bubici et al., 2019) จึงเห็นได้ว่าแบคทีเรียและราก่อโรคพืชดังกล่าวมีความสำคัญ เนื่องจากถ้ามีการแพร่กระจายของแบคทีเรียและราก่อโรคพืชจะสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เพาะปลูกและอาจจะเกิดการสูญเสียรายได้ทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก

ในปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้ในการยับยั้งการแพร่กระจายของแบคทีเรียและราก่อโรคพืช คือ การใช้สารเคมี โดยวิธีการนี้สามารถป้องกันการแพร่กระจายของแบคทีเรียและราก่อโรคพืชได้ดีและนิยมใช้ในภาคเกษตรกรรม แต่วิธีการดังกล่าวมีข้อเสียคือสารเคมีส่วนใหญ่เป็นพิษต่อเกษตรกร เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม และยังส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค (Sowanpreecha and Rerngsamran, 2018) การใช้วิธีทางชีวภาพ (Biological control) เป็นวิธีการหนึ่งที่ปลอดภัย ไม่มีสารตกค้างในสิ่งแวดล้อมและไม่เป็นอันตรายต่อเกษตรกรและผู้บริโภค ในการป้องกันแบคทีเรียและราก่อโรคพืช (Sowanpreecha and Rerngsamran, 2018; Bubici et al., 2019) ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในพืชหลายชนิดสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืช (Tan et al., 2015; Daungfu et al., 2019; Romero et al., 2019) ดังนั้นในงานวิจัยสนใจในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทุติยภูมิในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืชของเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในต้นมันสำปะหลัง โดยได้ทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารละลายอินทรีย์ที่มีความแตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ Ethylacetate Dichloromethane และ Butanol โดยอาศัยความแตกต่างของความมีขั้วของสารละลายอินทรีย์แต่ละชนิดในการสกัด ซึ่งจากการทดลองพบว่าสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลาย Butanol มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืช ในขณะที่ตัวทำละลายชนิดอื่นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืชได้ โดยทั่วไปสารละลายอินทรีย์ Butanol สามารถใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด เช่น bacteriocin (De Giani et al., 2019) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่ทำการ

สกัดสารยับยั้งการเจริญของรา โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ Hexane, Ethylacetate Dichloromethane และ Butanol ซึ่งผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย Butanol ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้ดีที่สุด (Lahoum et al., 2016) ดังนั้นจากการทดลองนี้พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืชจากเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6 สามารถสกัดออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ โดยใช้ Butanol เป็นตัวทำละลาย

การทดสอบประสิทธิภาพของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืชบนใบและเมล็ดของถั่วเขียว

การทดสอบความสามารถของเอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช โดยวิธี Agar Diffusion พบว่าเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืชได้ จึงได้ทำการทดลองทดสอบประสิทธิภาพของ สารละลายเซลล์ หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพืช โดยใช้ใบของต้นถั่วเขียวเป็นต้นแบบในการศึกษา ทั้งในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียหรือการรักษาที่มีการติดแบคทีเรียดังกล่าวแล้ว ผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการหยดสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียก่อนตามด้วยหยดสารละลายแบคทีเรีย *X.axonopodis* จะพบพยาธิสภาพในการเกิดโรคบนใบของต้นถั่วเขียวได้น้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้รายงานของ Li et al., (2008) ในการหยดสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก *Euphorbia pulcherrima* ในการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *X. axonopodis pv. Poinsettiicola* โดยการหยดสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียตามด้วยสารละลายแบคทีเรียก่อโรค พบว่าสารละลายเซลล์ของเอนโดไฟท์แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *X. axonopodis* ได้ดีและมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ได้มีการคัดแยกเอนโดไฟท์แบคทีเรียจากมะนาว และนำมาใช้ในการยับยั้งแบคทีเรีย *X.citri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในต้นมะนาว พบว่า เมื่อหยดสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย (*Bacillus* spp.) ก่อน ตามด้วยหยดสารละลายแบคทีเรีย *X.citri* จะพบพยาธิสภาพของโรคน้อยที่สุด (Daungfu et al., 2019)

สำหรับในกลุ่มการทดลองที่หยดสารละลายแบคทีเรียก่อโรคพืช *X.axonopodis* จากนั้นตามด้วยสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย พบว่าเกิดพยาธิสภาพของโรคไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ (สารละลาย 1X PBS / อาหารเลี้ยงเชื้อ NB) แสดงให้เห็นว่าเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 มีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *X.axonopodis* ได้ดีกว่าการรักษาต้นพืชที่ติดเชื้อแบคทีเรียแล้ว

ดังนั้นจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 ควรนำมาใช้ในการป้องกันก่อนการติดเชื้อแบคทีเรียในพืชจะให้ประสิทธิภาพสูงที่สุด

กรณีของการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชบนเมล็ดถั่วเขียว โดยบ่มเมล็ดถั่วเขียวด้วยสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย จากนั้นบ่มด้วยสารละลายสปอร์ของราก่อโรคพืช เปรียบเทียบกับสารละลาย 1X PBS ที่ใช้สำหรับแขวนลอยสารละลายเซลล์แบคทีเรีย จากผลการทดลองพบว่าสารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้มีประสิทธิภาพดีกว่าสารละลายที่ใช้ในการแขวนลอยเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชเป็นผลมาจากเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย โดยมีรายงานวิจัยได้ทำการทดลองใช้สารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชหลายชนิด เช่น สารละลายเอนโดไฟท์แบคทีเรีย *B. tequilensis* GYLH001 สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *Magnaporthe oryzae* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ของข้าว (Li et al., 2018) สารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรีย *Pseudomonas protegens* MP12 พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชบนใบขององุ่นได้ (Andreolli et al., 2019) นอกจากนี้สารละลายเซลล์เอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ SCB-1 ที่สามารถผลิตสารในกลุ่ม Lipopeptide ยับยั้งการเจริญของรา *F. oxysporum* SC7.1 *F. verticillioides* SC8.1 และ *Fusarium* sp. SC9.1 ที่เจริญบนเมล็ดถั่วเขียวและเมล็ดถั่วเขียวสามารถเจริญต่อไปได้ ซึ่งเมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ดังกล่าวพบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* (Hazarika et al., 2019) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืช นอกจากนี้เนื่องจากเมื่อทำการจัดจำแนกเอนโดไฟท์แบคทีเรียสายพันธุ์ KUs6 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *B. amyloliquefaciens* ซึ่งโดยส่วนใหญ่แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* สามารถสร้างสปอร์ เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวจึงมีความน่าจะเป็นในการผลิตปุ๋ยน้ำชีวภาพของเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6 หรือผลิตสปอร์ของเอนโดไฟท์แบคทีเรีย KUs6 อบแห้ง เพื่อนำไปใช้ในภาคการเกษตรต่อไป

การคัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากดินที่ปลูกมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง *Manihot esculenta* (L.) *Crantz* ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อสามัญ Cassava, Tapioca, Manioc, Mandioca หรือ Yuca และมีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้ โดยมันสำปะหลังนั้นมีการปลูกอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนประมาณ 105 ประเทศทั่วโลก มันสำปะหลังถูกจัดให้เป็นพืชเศรษฐกิจในศตวรรษที่ 21 เนื่องจากเป็นพืชที่เป็นแหล่งอาหารให้ประชากรเกือบหนึ่งพันล้านคน (Latif and Muller, 2014) ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังเป็นอันดับ 2 ของโลกรองจากประเทศไนจีเรีย แต่เป็นผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังอันดับ 1 ของโลก เนื่องจากในทวีปแอฟริกาใช้มันสำปะหลังเป็นอาหารหลักเพื่อบริโภคภายในประเทศประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั้งหมด โดยประเทศไทยมีส่วนแบ่งทางการตลาดสำหรับการส่งออกผลิตภัณฑ์แปรรูป ได้แก่ เส้นมันสำปะหลัง, แป้งมันสำปะหลัง และมันสำปะหลังอัดเม็ด ไปยังตลาดโลกประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังของโลก โดยมีจีนเป็นคู่ค้ารายใหญ่ (Hallam et al., 2013; Savelli et al., 2019)

มันสำปะหลังสามารถปลูกได้ในดินเกือบทุกชนิด ยกเว้นดินเกลือ มีความทนทานต่อสภาวะอากาศที่แห้งแล้งได้ดี การปลูกและขยายพันธุ์ทำได้ง่ายและ มีต้นทุนการผลิตไม่สูง (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งชาติ, 2550) แหล่งปลูกมันสำปะหลังของประเทศไทย อันดับหนึ่ง คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมา คือ ภาคกลาง และ ภาคเหนือ ในประเทศไทยมันสำปะหลังมีหลากหลายสายพันธุ์ที่นิยมปลูก อาทิเช่น **เกษตรศาสตร์ 50** เป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างระยอง 1 กับระยอง 90 สามารถปลูกได้ทั่วประเทศ หัวงอกดี ผลผลิตสูง ปริมาณแป้งสูง หัวเป็นกลุ่มขุดเก็บเกี่ยวสะดวก ในช่วงปี 2545-2546 เป็นพันธุ์ที่นิยมมากที่สุดในประเทศ (วิจารณ์ และคณะ, 2545), **ห้วยบง 60** เป็นพันธุ์ผสมระหว่างเกษตรศาสตร์ 50 และระยอง 5 มีผลผลิตหัวสดเฉลี่ยที่ได้สูงกว่าพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และมีปริมาณแป้งในหัวสูงกว่าพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 อยู่เล็กน้อย (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลัง, 2558), **พิรุณ 1** เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ห้วยบง 60 และพันธุ์ห้านาที ให้ผลผลิตหัวสดสูง ตัดหัวง่าย ใช้ปุ๋ยน้อยกว่าพันธุ์รับรองทั่วไป (สถาบันการจัดการเทคโนโลยีและนวัตกรรมเกษตร)

ในการวิเคราะห์โครงสร้างของต้นมันสำปะหลังพบว่ามีเซลลูโลสประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 44 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 24 เปอร์เซ็นต์ (Pattiya, 2011) มันสำปะหลังโดยปกติจะมีการเก็บเกี่ยว 8-12 เดือนหลังการปลูก (กรมวิชาการเกษตร, 2537) สำหรับอายุการเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังอาจแตกต่างไปจากนี้ได้ขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ราคามันสำปะหลังในท้องตลาด, ความต้องการใช้เงินของเกษตรกร เป็นต้น เมื่อทำการเก็บเกี่ยวส่วนหัวไปแล้วจะทิ้งส่วนที่เหลือลงบนแปลง ได้แก่ ใบ, ลำต้น และ เหง้า ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรจำนวนมาก เกษตรกรยังคงไถกลบเข้าไปผสมในแปลงสำหรับเตรียมการปลูกในรอบต่อไป เพื่อเป็นการ

ย่อยสลายวัสดุเหลือทางการเกษตรโดยธรรมชาติโดยปกติจะมีการพักแปลงก่อนลงปักท่อนพันธุ์ลงบนแปลง ประมาณ 1 เดือน อย่างไรก็ดีวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรดังกล่าวใช้เวลาที่ย่อยสลายนาน ปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคโนโลยีทางชีวภาพ โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ เพื่อช่วยในการกระตุ้นการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ในดินเพื่อทำหน้าที่ย่อยสลายได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณหรือจำนวนจุลินทรีย์ดินมีผลช่วยลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคพืชบางชนิดได้น้อยลง (กรมพัฒนาที่ดินกระทรวงเกษตรและสหกรณ์)

ในรายงานนี้ได้เพิ่มเติมเกี่ยวกับ การคัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากดินที่ปลูกมันสำปะหลัง เซลลูเลส แบ่งตามหลักการทำงาน สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ Endoglucanase หรือ Carboxy-methycellulase ซึ่งจำเพาะต่อซับสเตรตที่มีโครงสร้างในลักษณะรูปร่างไม่เป็นระเบียบ เช่น β-glucan carboxymethylcellulose จึงมีความจำเพาะต่อซับสเตรต CMC (Carboxyl Methyl Cellulose) Exoglucanase จำเพาะต่อซับเสรตที่มีโครงสร้างในลักษณะเรียงตัวเป็นระเบียบ (crystalline cellulose) ได้แก่ Avicel, p-nitrophenyl-β-D-cellobioside และ Beta-glucosidase สามารถย่อยซับสเตรต เช่น cellobiose, p-nitrophenyl glucoside (Arantes and Saddler, 2010)

วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & Methods)

แบคทีเรียบริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรียที่แยกได้ ได้แก่ สี ขนาด ลักษณะการเจริญขอบของโคโลนี จากตัวอย่างดินบริเวณรากมันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ จ.ระยอง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 , พันธุ์พิรุณ 1 และ พันธุ์ห้วยบง 60 ทุก 3 เดือน เป็นเวลา 12 เดือน ได้นำมาคัดกรองและแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ตามวิธีการดังนี้

1. คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ลงบนอาหารแข็งคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC agar : 0.5 (w/v) % Carboxyl Methyl Cellulose, 0.05 (w/v) % yeast extract, 0.1 (w/v) % KCl, 0.05 (w/v) % $MgSO_4$, 0.1 (w/v) % K_2HPO_4, 0.1 (w/v) % $NaNO_3$, 1.5 (w/v) % agar) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเท 1 % คองโกเรด 8 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็งทิ้ง ไว้ 15 นาที ตามด้วย 1 M โซเดียมคลอไรด์ 8 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที สังเกตโคโลนีที่เกิดบริเวณใส ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และบริเวณใสที่เกิดขึ้น

นอกจากใช้ CMC เป็นซับสเตรตแล้ว จะแทน CMC ด้วย Avicel และ Cellobiose (Kiio et al., 2016) มาศึกษาเซลลูเลสชนิดอื่น เนื่องจาก Avicel เป็นซับสเตรตที่จำเพาะต่อการผลิตเอกโซกลูคาเนส และ Cellobiose เป็นซับสเตรตที่จำเพาะต่อการผลิตเบต้า – กลูโคซิเดส เช่นเดียวกับ CMC ที่เป็นซับสเตรตที่จำเพาะต่อเอนโดกลูคาเนส

2. คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูง

ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์คัดเลือกแบคทีเรียที่เกิดบริเวณใสบนซับสเตรต 2 ใน 3 ซับสเตรต หรือ 3 ใน 3 ของซับสเตรต Avicel , CMC และ Cellobiose โดยเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบริเวณใสได้ดีที่สุดบนซับสเตรตนั้น มาถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวของซับสเตรตนั้น 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (140 รอบ/ นาที) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่เจริญมา 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง ที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนที่เป็นส่วนใสด้านบนเก็บไว้เป็น crude enzyme ต่อไป นำ crude enzyme ที่เก็บไว้มา 250 ไมโครลิตร เติม 1 % (w/v) ซับสเตรตใน 0.1 M โซเดียมอะซีเทต บัฟเฟอร์ pH 5.5 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เติม 625 ไมโครลิตร กรด-3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก เพื่อวัดค่าน้ำตาลรีดิวซ์ จากนั้นนำไปต้ม 5 นาที และทำให้เย็น นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader แล้วนำค่า OD ของตัวอย่างไปลบกับค่า OD ของ blank โดย blank คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเปล่า จากนั้นนำผลต่างที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานกลูโคส โดย 1 หน่วย กิจกรรมเอนไซม์มีค่าเท่ากับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงไปหนึ่งโมลต่อนาทีที่ 65 องศาเซลเซียส

Enzyme Unit Activity (Unit/mL) =

$$\frac{\text{ปริมาณของกลูโคส}}{\text{น้ำหนักมวลโมเลกุลของกลูโคส (180 กรัม/โมล)}} \times \frac{1}{\text{5 นาที}} \times \frac{1}{\text{ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

นำไปพิจารณาร่วมกับแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเซลลูเลสได้ในปริมาณที่สูง อัตราส่วนมากกว่า 4 โดยคำนวณจากค่า hydrolysis capacity (HC) จากข้อ 1 รวมถึงค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. หาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญจากไร่มันสำปะหลังในการผลิตเซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แปรผันอุณหภูมิและ pH ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสได้

หาภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสได้ในปริมาณสูงจากดินบริเวณที่ปลูกมันสำปะหลัง ซึ่งผู้วิจัยได้คัดเลือกมา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* โดยใช้ อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสในปริมาณสูงมาทดสอบในอาหารแข็ง Avicel, Cellobiose และ CMC ที่ปรับ pH ในอาหารเป็น 5, 6, 7 และ 8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณส่วนใสที่เกิดขึ้น แล้วทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสตามข้อ 1

4. ทดสอบความสามารถในการย่อย Filter paper และ ใบมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

4.1 ทดสอบความสามารถในการย่อย Filter paper โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่ 140 รอบ/นาที ในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนของเชื้อที่ได้ละลายด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เพื่อปรับจำนวนของเชื้อให้ได้เท่ากับ 10^6 CFU/ml จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว CFMM + 0.5% (w/v) CMC ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและมี filter paper ขนาด 1.5 cm.* 1.5 cm. ที่ทำการชั่งน้ำหนักแล้วอยู่ในหลอดทดลอง โดยมีการแบ่งชุดการทดลองเป็น 8 การทดลอง (ตารางที่ 5) ดังนี้

ตารางที่ 5 กลุ่มการทดลองในการย่อยสลาย Filter paper

ชุดการทดลอง	**อาหาร CFMM + 0.5% (w/v) CMC**	***Bacillus amyloliquefaciens* 10^6 CFU**	***Bacillus pumilus* 10^6 CFU**	***Paenibacillus kribbensis* 10^6 CFU**	**filter paper 2 ชิ้น**
ชุดควบคุม	✓				✓
1	✓	✓			✓
2	✓		✓		✓
3	✓			✓	✓
4	✓	✓	✓		✓
5	✓	✓		✓	✓
6	✓		✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓

บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (140 รอบ/ นาที) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน เพื่อทดสอบการย่อย filter paper โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลว จากนั้นนำ filter paper ไปอบให้แห้ง ทำการชั่งน้ำหนัก และดูการเปลี่ยนแปลงของ filter paper ภายใต้กล้อง Scanning electron microscope (SEM) จากนั้นนำอาหาร CFMM ของแต่ละชุดการทดลองมา spread ลงบนอาหารแข็ง NA เพื่อนับจำนวนเชื้อที่เกิดขึ้นหลังการทดลอง ศึกษาโดยทำการทดลอง 3 ครั้งและแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

4.2 ย่อยสลายใบมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำดินจากบริเวณที่ปลูกมันสำปะหลัง 2.5 กิโลกรัม มาอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำใบมันปะหลัง มาอบให้แห้งที่ 65 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งดินใส่ภาชนะทดลองกล่องละ 100 กรัม นำเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* ในอาหารเหลว NB บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนของเชื้อที่ได้ละลายด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ เพื่อปรับจำนวนของเชื้อให้ได้เท่ากับ 10^6 CFU/mL แล้วใส่ลงไปในดินคลุกเคล้าให้เข้ากัน (ตามตารางที่ 6) โดยให้ดินมีความชื้นที่ 30% (Devevre และคณะ, 2000) ด้วยการนำดิน 100 กรัมที่อบแห้งแล้วใส่ลงใน filter paper ที่พับเป็นรูปกรวย ค่อย ๆ หยดน้ำลงไป ดูปริมาตรที่ใส่ลงไป จนทำให้ดินอิ่มตัว แล้วคำนวณกลับจนได้ความชื้นที่ 30% จากนั้นนำใบมันสำปะหลังที่อบแห้งแล้วนำมาตัดให้มีขนาดความยาว 10 เซนติเมตร ใส่ลงไปในดิน 1 ชิ้น โดยให้ดินปกคลุมใบมันสำปะหลังทั้งหมดโดยมีการแบ่งชุดการทดลองเป็น 8 การทดลอง (ตารางที่ 6) ดังนี้

ตารางที่ 6 กลุ่มการทดลองในการย่อยสลายใบมันสำปะหลัง

ชุดการทดลอง	**ดิน 100 กรัม**	***Bacillus amyloliquefaciens*** **10^6 CFU**	***Bacillus pumilus*** **10^6 CFU**	***Paenibacillus kribbensis*** **10^6 CFU**	**ใบมันสำปะหลัง 1 ชิ้น**
ชุดควบคุม*	✓				✓
1	✓	✓			✓
2	✓		✓		✓
3	✓			✓	✓
4	✓	✓	✓		✓
5	✓	✓		✓	✓
6	✓		✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓

***** ใส่โซเดียมคลอไรด์ 0.85% แทนปริมาตรเชื้อ

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทุก ๆ 4 วันจะมีการเติมน้ำลงไปเพิ่ม 50 % จากการคำนวณปริมาตรของน้ำด้านบน เพื่อเป็นรักษาความชื้นในดิน จนครบ 28 วัน จากนั้น

1) นำดินส่งวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน โดยพารามิเตอร์ที่วิเคราะห์ ได้แก่ ค่า pH, ค่าการนำไฟฟ้า, ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน, ปริมาณอินทรีย์คาร์บวนรวมในดิน และ ปริมาณ ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, โพแทสเซียม, แคลเซียม และ แมกนีเซียมในดิน ทั้งหมด 9 พารามิเตอร์ ที่คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2) นำดินที่เหลือมานับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (total count) จากดินที่ใส่ใบมันสำปะหลัง โดยนำไป spread ลงบนอาหารแข็ง NA เพื่อดูอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และ

3) นำใบมันสำปะหลังไปศึกษาภายใต้กล้อง Scanning electron microscope (SEM) โดยทำการทดลอง 3 ครั้งและแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

ผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรากมันสำปะหลัง 3 สายพันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดระยอง เป็นเวลา 12 เดือน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA คัดเลือกลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน พบแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จำนวนทั้งหมด 326 ไอโซเลท ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่ปลูกมันสำปะหลัง 3 สายพันธุ์ ทุก 3 เดือน

	0 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
KU 50	-	81	24	28	21
PR1	-	-	49	27	21
HB 60	7	-	23	24	21

จากนั้นนำแบคทีเรียที่คัดแยกทุกไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตเซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC สังเกตโคโลนีที่เกิดบริเวณใส แล้วคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC นำไปทดสอบในซับสเตรต Avicel และ Cellobiose ได้ผลดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 จำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลส 2 ใน 3 หรือ 3 ใน 3 ซับสเตรต

	0 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
KU 50	-	27	5	11	5
PR1	-	-	15	7	8
HB 60	2	-	2	2	3

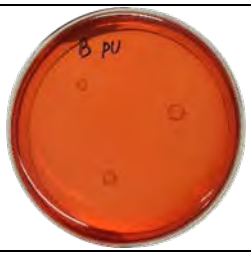
จากผลในตารางเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่สร้างส่วนใสได้กว้าง จะสามารถสร้างได้ในทุกสับสเตรต จึงได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีการสร้างส่วนใสในบริเวณกว้างมาทั้งหมด 3 ไอโซเลท ได้แก่ PR1-P15 (6 เดือน), PR1-N9 (6 เดือน) และ HT-P9 (6 เดือน) เพื่อทำการทดลองต่อไป และจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทที่คัดเลือกมีความคล้ายคลึงกลับ *Paenibacillus kribbensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus pumilus* ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 สายพันธุ์เอนโดไฟท์แบคทีเรียที่คัดแยกได้

ไอโซเลท	สายพันธุ์	Accession no.	Identities
PR1-P15 (6 เดือน)	*Paenibacillus kribbensis*	NR025169.1	99%
PR1-N9 (6 เดือน)	*Bacillus amyloliquefaciens*	KM091696.1	99%
HT-P9 (6 เดือน)	*Bacillus pumilus*	KJ888102.1	99%

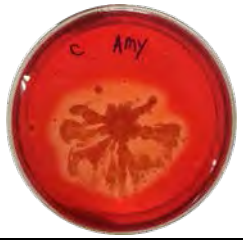
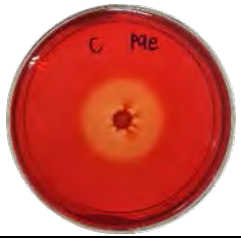
จากนั้นนำทั้ง 3 สายพันธุ์นี้หาภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูเลสได้ในปริมาณสูงจากดินบริเวณที่ปลูกมันสำปะหลัง ที่ อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสในปริมาณสูงมาทดสอบในอาหารแข็ง Avicel, Cellobiose และ CMC ที่ปรับ pH ในอาหารเป็น 5,6,7 และ 8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณส่วนใสที่เกิดขึ้น แล้วทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้ผลดังตารางที่ 10-12 ดังนี้

ตารางที่ 10 ลักษณะวงใสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

	Bacillus amyloliquefaciens	*Bacillus pumilus*	*Paenibacillus kribbensis*
Avicel			
Cellobiose			
CMC			

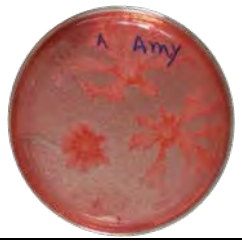
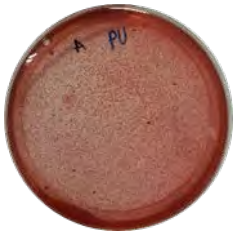
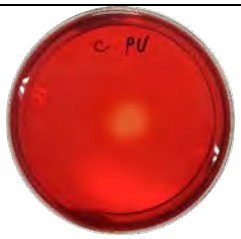
จากตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่า *Bacillus amyloliquefaciens* มีส่วนใสที่เห็นได้ชัดเจนในสับสเตรต Cellobiose และ CMC ในส่วนของ *Bacillus pumilus* นั้นเห็นส่วนใสที่ชัดเจนในสับสเตรต CMC และ *Paenibacillus kribbensis* เห็นส่วนใสเล็กน้อยรอบโคโลนีในสับสเตรต Cellobiose

ตารางที่ 11 ลักษณะวงใสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

	Bacillus amyloliquefaciens	*Bacillus pumilus*	*Paenibacillus kribbensis*
Avicel			
Cellobiose			
CMC			

จากตารางที่ 11 แสดงให้เห็นว่า *Bacillus amyloliquefaciens* มีส่วนใสที่เห็นได้ชัดเจนในสับสเตรต Cellobiose และ CMC ในส่วนของ *Bacillus pumilus* นั้นเห็นส่วนใสที่ชัดเจนในสับสเตรต CMC และ *Paenibacillus kribbensis* เป็นเชื้อที่สามารถสร้างส่วนใสได้ชัดเจนที่สุดในทั้ง 3 สับเสตรต ซึ่งในสับสเตรต CMC มีอัตราส่วนของการเกิดส่วนใสและโคโลนีมากที่สุดใน 3 อุณหภูมิ

ตารางที่ 12 ลักษณะวงใสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

	Bacillus amyloliquefaciens	*Bacillus pumilus*	*Paenibacillus kribbensis*
Avicel			
Cellobiose			
CMC			

จากตารางที่ 12 แสดงให้เห็นว่า *Bacillus amyloliquefaciens* มีส่วนใสที่เห็นได้ชัดเจนในสับสเตรต Cellobiose และ CMC ซึ่งในสับสเตรต CMC เห็นส่วนใสได้ชัดเจนที่สุด ในส่วนของ *Bacillus pumilus* นั้น เห็นส่วนใสที่ชัดเจนในสับสเตรต CMC และ *Paenibacillus kribbensis* สามารถเห็นส่วนใสได้ชัดเจนที่สุดใน สับสเตรต CMC

จากการแปรผันอุณหภูมิ เมื่อทำการเปรียบเทียบกันแล้วจะเห็นได้ว่า *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีการเจริญและสามารถ สร้างส่วนใสได้ได้ไม่เทียบเท่ากับที่เจริญในอุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส จึงนำอุณหภูมิที่ 37 และ 40 มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม Graphpad prism 8.0.1 พบว่า ในสับสเตรต Avicel และ CMC มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในขณะที่สับสเตรต Cellobiose ไม่พบความแตกต่างอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 เมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมแล้ว นำมาทดสอบบนอาหารที่มีการ ปรับ pH เป็น 5, 6, 7, 8 โดยมีซับสเตรต Avicel, Cellobiose และ CMC บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อนำมาทดสอบต่อในอาหารแข็ง Avicel, Cellobiose และ CMC ที่ปรับ pH ในอาหารเป็น 5, 6, 7 และ 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณส่วนใสที่เกิดขึ้น แล้วทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้ผลดังตารางที่ 13-16 นี้

ตารางที่ 13 ลักษณะวงใสบนอาหารที่มีการปรับเป็น pH 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

	Bacillus amyloliquefaciens	*Bacillus pumilus*	*Paenibacillus kribbensis*
Avicel			
Cellobiose			
CMC			

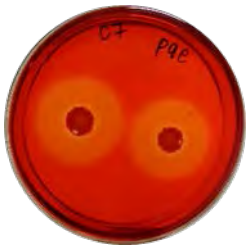
จากตารางที่ 13 แสดงให้เห็นว่า *Paenibacillus kribbensis* มีส่วนใสที่เห็นได้ชัดเจนในทุกสับสเตรต ในขณะที่ *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสได้เล็กน้อยรอบโคโลนีในสับเสตรต Cellobiose และเห็นค่อนข้างชัดเจนในสับสเตรต CMC ส่วน *Bacillus pumilus* นั้นเห็นส่วนใสที่ชัดเจนในสับสเตรต CMC

ตารางที่ 14 ลักษณะวงใสบนอาหารที่มีการปรับเป็น pH 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

	Bacillus amyloliquefaciens	*Bacillus pumilus*	*Paenibacillus kribbensis*
Avicel			
Cellobiose			
CMC			

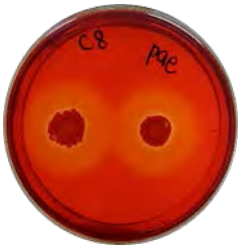
จากตารางที่ 14 *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Paenibacillus kribbensis* มีส่วนใสที่เห็นได้ชัดเจนในสับสเตรต CMC และเห็นส่วนใสเล็กน้อยในสับสเตรต Cellobiose ส่วน *Bacillus pumilus* เห็นส่วนใสได้ค่อนข้างชัดเจนในสับสเตรต Cellobiose และ CMC

ตารางที่ 15 ลักษณะวงใสบนอาหารที่มีการปรับเป็น pH 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

	Bacillus amyloliquefaciens	*Bacillus pumilus*	*Paenibacillus kribbensis*
Avicel			
Cellobiose			
CMC			

จากตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่า *Paenibacillus kribbensis* มีส่วนใสที่เห็นได้ชัดเจนในสับสเตรต Cellobiose และ CMC ส่วนสับสเตรต Avicel เห็นเป็นส่วนใสเล็กน้อยรอบโคโลนี ในขณะที่ *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสได้เล็กน้อยรอบโคโลนีในสับเสตรต Cellobiose และเห็นค่อนข้างชัดเจนในสับสเตรต CMC ส่วน *Bacillus pumilus* นั้นเห็นส่วนใสที่ชัดเจนในทุกสับสเตรต

ตารางที่ 16 ลักษณะวงใสบนอาหารที่มีการปรับเป็น pH 8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

	Bacillus amyloliquefaciens	*Bacillus pumilus*	*Paenibacillus kribbensis*
Avicel			
Cellobiose			
CMC			

จากตารางที่ 16 *Paenibacillus kribbensis* มีส่วนใสที่เห็นได้ชัดเจนในสับสเตรต CMC และเห็นเป็นส่วนใสเล็กน้อยในสับสเตรต Avicel ส่วนของ *Bacillus amyloliquefaciens* เห็นส่วนใสได้เล็กน้อยรอบโคโลนีในสับเสตรต Cellobiose และเห็นค่อนข้างชัดเจนในสับสเตรต CMC ส่วน *Bacillus pumilus* นั้นเห็นส่วนใสที่ชัดเจนในสับสเตรต Cellobiose และ CMC.

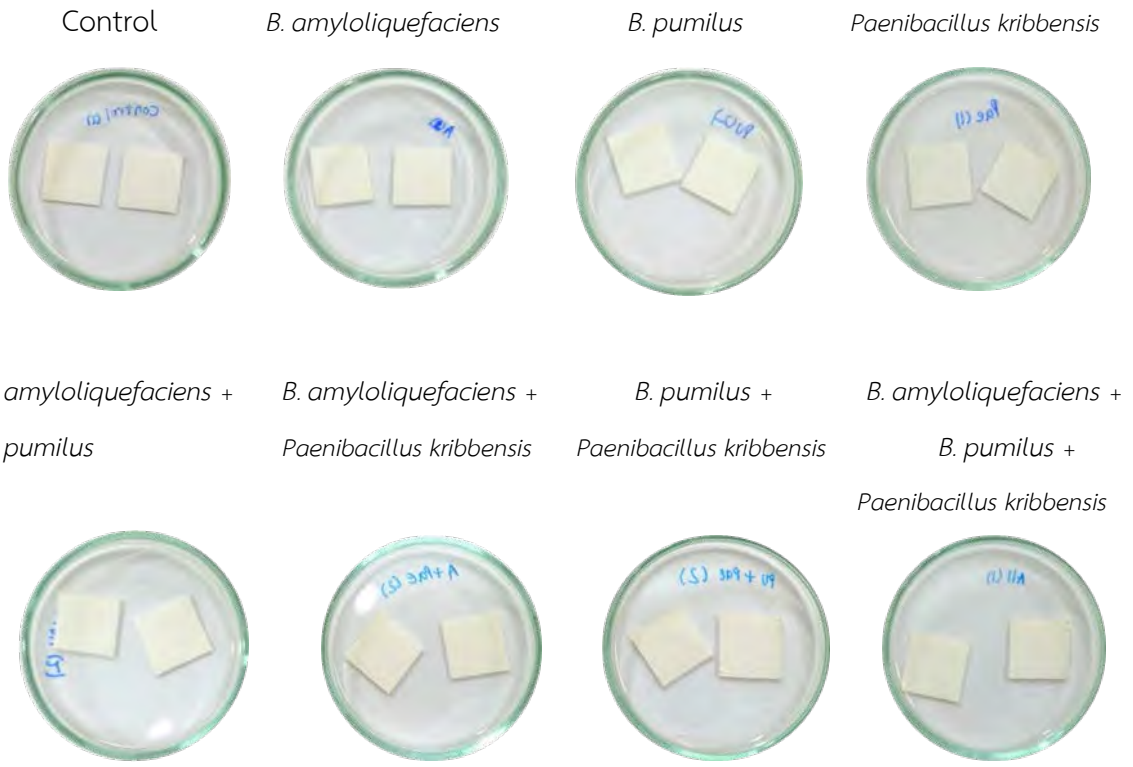
จากการแปรผัน pH เมื่อสังเกตและนำมาเทียบกัน พบว่าที่ pH 7 เกิดการสร้างส่วนใสที่ค่อนข้างชัดเจน สามารถเห็นได้เกือบทุกสับสเตรต เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม Graphpad prism 8.0.1 พบว่าในสับสเตรต Avicel การแปรผันของ pH ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในขณะที่ สับสเตรต Cellobiose และ CMC การแปรผันของ pH มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05.

เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลสในปริมาณที่สูงแล้ว นำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (140 รอบ/ นาที) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน เพื่อทดสอบการย่อย filter paper โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลว ได้ผลดังตารางที่ 17

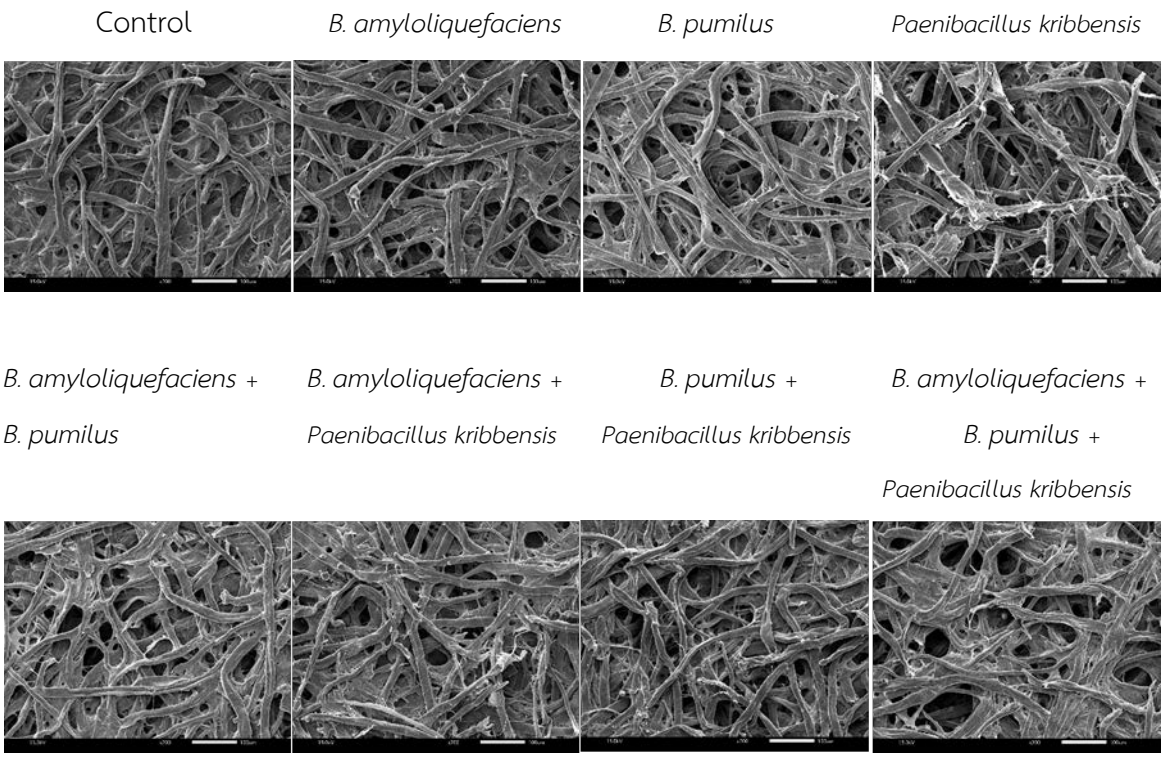
ตารางที่ 17 จำนวนเชื้อและน้ำหนักของ Filter paper ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการบ่ม 30 วัน

ชนิดของแบคทีเรีย	**จำนวนเชื้อ (CFU/ml)**		**น้ำหนัก filter paper (กรัม)**			
	0 วัน	**30 วัน**	**0 วัน**	**0 วัน**	**30 วัน**	**30 วัน**
control	-	ND	.0216	.0220	.0216	.0220
A	$5*10^6$	$1.6*10^6$	.0218	.0217	.0212	.0209
Pu	$6.9*10^6$	10^6	.0208	.0209	.0209	.0209
Pae	10^6	10^6	.0212	.0220	.0212	.0213
A + Pu	$5*10^6$ (A) + $6.9*10^6$ (Pu)	$2*10^6$ (A) + $5*10^6$ (Pu)	.0209	.0208	.0207	.0202
A + Pae	$5*10^6$ (A) + 10^6 (Pae)	$5*10^5$ (A)	.0215	.0214	.0210	.0208
Pu + Pae	$6.9*10^6$ (Pu) + 10^6 (Pae)	$2*10^6$ (Pu) + $2*10^6$ (Pae)	.0201	.0221	.0200	.0212
All*	$5*10^6$ (A) + $6.9*10^6$ (Pu) + 10^6(Pae)	10^6 (A) + $5*10^5$ (Pu) + 10^5 (Pae)	.0214	.0210	.0212	.0208

จากผลในตารางที่ 17 จะเห็นได้ว่าเมื่อผ่านไป 30 วัน จำนวนเชื้อแบคทีเรียในแต่ละการทดลองลดลง ในขณะที่น้ำหนักของ Filter paper มีการลดลงบ้างเล็กน้อย เมื่อเทียบกับที่ 0 วัน เพื่อศึกษาดูความเปลี่ยนแปลงของ Filter paper เพิ่มเติม นำ Filter paper ไปส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) กำลังขยาย 200,000 เท่า (รูปที่11)



รูปที่ 10 Filter paper ที่เลี้ยงกับแบคทีเรียระยะเวลา 30 วัน



รูปที่ 11 Filter paper ที่เลี้ยงกับแบคทีเรียระยะเวลา 30 วันภายใต้กล้อง SEM

จากรูปที่ 10 จะเห็นได้ว่า ลักษณะทางภายนอกของ Filter paper ไม่พบความแตกต่างกัน แต่เมื่อนำไปส่องภายใต้กล้อง SEM พบว่า สภาพเส้นใยของ Filter Paper ที่เลี้ยงกับแบคทีเรีย *Paenibacillus kribbensis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis* มีการเสียสภาพบางส่วน เมื่อเทียบกับ Control ซึ่งสอดคล้องกันกับน้ำหนักของ filter paper ที่ลดลง (ตารางที่ 17) สำหรับผลการทดลองการย่อยใบมันสำปะหลัง และผลวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน ที่คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล อยู่ระหว่างการดำเนินการ

อภิปราย / วิจารณ์ (Discussion) ผลการวิจัย

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสในงานวิจัยนี้มีมากมายหลากหลายสายพันธุ์ เช่น *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus kribbensis*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* เป็นต้น ซึ่งพบว่ามีความคล้ายคลึงกับงานวิจัยอื่น อาทิเช่น งานวิจัยของ Korpole et al., (2011) คัดแยก *Bacillus pumilus* ได้จากดินในประเทศอินเดีย และ Kim et al., (2012) แยกแบคทีเรียจากดินในแปลงการเกษตร ประเทศเกาหลี พบ *Bacillus licheniformis, Bacillus pumilus, Bacillus subtilis, Bacillus amylolicheniformis* ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ ในขั้นตอนแรกของงานวิจัยนี้จึงศึกษาความสามารถในการผลิตเซลลูเลสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ นำมาทดสอบการย่อยใน 3 สับสเตรต ได้แก่ Avicel, เซลโลไบโอส และ CMC คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสับสเตรตได้ 2 ใน 3 หรือ 3 ใน 3 สับสเตรต ดีที่สุด 3 สายพันธุ์ นั่นคือ KU50-N44 รอบ 3 เดือน, HT-N10 รอบ 6 เดือน และ PR1-P15 รอบ 6 เดือน ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์นี้สามารถย่อยได้ทั้ง 3 สับสเตรต หลังจากนำไปเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* ตามลำดับ จากการทดสอบบนอาหารแข็งทั้ง 3 สับสเตรต จะพบว่า บนสับสเตรต Avicel จะไม่ค่อยพบการเปลี่ยนแปลงมากนัก เนื่องจากโดยปกติแล้วเอกโซกลูคาเนสจะทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส (รุสนี , 2552)

แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เป็นเชื้อเดี่ยวนั้น ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* และ *Paenibacillus kribbensis* เมื่อนำไปทดสอบการย่อยใน filter paper แล้วพบว่าสามารถย่อยสลาย filter paper ได้บางส่วน ซึ่งใน *Paenibacillus kribbensis* สามารถย่อยได้ดีที่ที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว จะเห็นได้ว่าเชื้อผสม *Bacillus amyloliquefaciens* + *Paenibacillus kribbensis* มีการย่อยสลายได้ดีรองลงมา ตามด้วย *Bacillus pumilus* + *Paenibacillus kribbensis* ตามลำดับ การใช้แบคทีเรียผสมที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันของแต่ละแบคทีเรีย อาจจะช่วยส่งเสริมและเพิ่มประสิทธิ ภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสเพิ่มขึ้นได้ (Abdel-Rahman et al., 2016; Akhtar et al., 2013)

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย

ตารางสรุปผลการดำเนินการ :

ที่	กิจกรรม	ผลผลิต	ตัวชี้วัด / จำนวน
1	ศึกษาและแยกเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีประโยชน์ต่อการเจริญของมันสำปะหลัง	สารยับยั้งเชื้อจุลชีพที่ก่อโรคในมนุษย์และพืช	สารยับยั้งเชื้อจุลชีพที่ก่อโรคในมนุษย์ 27 ไอโซเลท และพืช 11 ไอโซเลท
2	แยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและศึกษาโครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	ทำการแยกสารยับยั้งเชื้อจุลชีพที่ก่อพืชอย่างหยาบได้
3	วิธีการทดสอบและวิธีการทดลองในการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน *in vitro* และ *in vivo*	ต้นแบบและวิธีการทดลองในการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน *in vitro* และ *in vivo*	ต้นแบบและวิธีการทดลองในการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน *in vitro* และ *in vivo*
4	ศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากดินที่ปลูกมันสำปะหลัง	แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส	แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส
5	ทดสอบความสามารถในการย่อย filter paper และใบมันสำปะหลังของแบคทีเรียที่แยกได้	แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส	แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสย่อย filter paper และ ใบมันสำปะหลัง

บรรณานุกรม (Bibliography)

กรมพัฒนาที่ดินกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ไถกลบตอซัง สร้างดินยั่งยืน ฟื้นสิ่งแวดล้อม (ออนไลน์) แหล่งที่มา www.ldd.go.th/WEB_Bio/PDF/Plow.pdf เข้าล่าสุด 7 สิงหาคม 2562

กรมวิชาการเกษตร. 2537. มันสำปะหลัง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมวิชาการเกษตร, การจำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง, พิมพ์โดย กรมส่งเสริมการเกษตร บริษัท ซัน แพคเกจจิ้ง (2014) จำกัด

ฐานข้อมูลมันสำปะหลัง, สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2562. (http://agknowledge.arda.or.th/cassava/ เข้าล่าสุด 7 สิงหาคม 2562)

ฝ่ายบริหารคลัสเตอร์และโปรแกรมวิจัย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. ยุทธศาสตร์วิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมมันสำปะหลังประเทศไทย (พ.ศ.2555-2559) และโปรแกรมวิจัยและพัฒนามันสำปะหลังภายใต้แผนกลยุทธ์การวิจัยและพัฒนา สวทช. ระยะที่ 2 พ.ศ.2554-2559. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ-ปทุมธานี : สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2554.

มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งชาติ. 2550. การเตรียมดิน. (ออนไลน์) แหล่งที่มา https://www.tapiocathai.org/pdf/Tapioca%20Plan/a_soil.pdf เข้าล่าสุด 7 สิงหาคม 2562

มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย. 2558. มันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/2558

รุสนี โตะกีเล. 2552. คุณสมบัติเพื่อการประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมของเอนไซม์ผสมที่ผลิตจากจุลินทรีย์ สารเร่ง พด.1 โดยใช้ชานอ้อย และเปลือกถั่วลิสง เป็นแหล่งคาร์บอน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิจารณ์ วิชชุกิจ, เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, เอ็จ สโรบล และ ประภาส ช่างเหล็ก. 2545. เกษตรศาสตร์ 50 พันธุ์มันสำปะหลังที่นิยมปลูกมากที่สุดในประเทศไทย. (ออนไลน์) แหล่งที่มา http://agron.agri.kps.ku.ac.th/index.php/th/research-argon/53-kasetsart-50-the-most-popular-cassava-cultivar-in-thailand เข้าล่าสุด 7 สิงหาคม 2562

สถาบันการจัดการเทคโนโลยีและนวัตกรรมเกษตร (สท.). มันสำปะหลังพันธุ์ พิรุณ2. (ออนไลน์) แหล่งที่มา https://www.nstda.or.th/agritec/cassava-plant/261-cassava-pirun2 เข้าล่าสุด 7 สิงหาคม 2562

เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง ฉบับที่ 1001 - Do 46.01, กลุ่มอนุรักษ์ดินและน้ำ, สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน, กรมพัฒนาที่ดิน.

Abdel-Rahman MA, El-Din MN, Refaat BM, Abdel-Shakour EH, Ewais EED, Alrefaey HM. Biotechnological application of thermotolerant cellulose-decomposing bacteria in composting of rice straw. Ann Agric Sci. 2016; 61, 135-143.

Akhtar N, Sharma A, Deka D, Jawed M, Goyal D, Goyal A. Characterization of cellulase producing *Bacillus* sp. for effective degradation of leaf litter biomass. Environ Prog Sustain, 2013; 32, 1195-1201.

Andreolli M, Zapparoli G, Angelini E, Lucchetta G, Lampis S, Vallini G. *Pseudomonas protegens* MP12: A plant growth-promoting endophyticbacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. Microbiol Res. 2019 ; 219: 123-131.

Arantes V, Saddler JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. Biotechnol Biofuels. 2010; 3: 4.

Athinuwat D, Brooks S. The *OmpA* gene of *Xanthomonas axonopodis pv. glycines* is involved in pathogenesis of pustule disease on soybean. Current Microbiology. 2019; 76: 879-887.

Bubici G, Kaushal M, Prigigallo MI, Gómez-Lama Cabanás C, Mercado-Blanco J. Biological control agents against *Fusarium* wilt of Banana. Front Microbiol. 2019; 10: 616.

Clark TN, Ellsworth K, Li H, Johnson JA, Gray CA. Isolation of the plant hormone (+)-abscisic acid as an antimycobacterial constituent of the medicinal plant endophyte *Nigrospora* sp. Nat Prod Commun. 2013; 8: 1673-4.

Chandra S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 95: 47-59.

Daungfu O, Youpensuk S, Lumyong S. Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of *Citrus canker* in lime plants. Trop Life Sci Res. 2019; 30: 73-88.

De Giani A, Bovio F, Forcella M, Fusi P, Sello G, Di Gennaro P. Identification of a bacteriocin-like compound from *Lactobacillus plantarum* with antimicrobial activity and effects on normal and cancerogenic human intestinal cells. AMB Express. 2019; 9: 88.

Devêvre OC, Horwáth WR. Decomposition of rice straw and microbial carbon use efficiency under different soil temperatures and moistures. Soil Biol Biochem. 2000; 32: 1773-85.

Ding X, Liu K, Deng B, Chen W, Li W, Liu F. Isolation and characterization of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata*. World J Microbiol Biotechnol. 2013; 29: 1831-8.

Hallam D, Calpe C, Abbassaian A. Food outlook: Biannual report on global food markets. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 2013.

Hazalin N, Ramasamy K, Lim SM, Wahab I, Cole A, Abdul Majeed AB. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the national park, Pahang, Malaysia. BMC Complem and Altern Med. 2009; 9: 46.

Hazarika DJ, Goswami G, Gautom T, Parveen A, Das P, Barooah M, Boro RC. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. BMC Microbiol. 2019; 19: 71.

Khan AL, Waqas M, Kang SM, Al-Harrasi A, Hussain J, Al-Rawahi A, Al-Khiziri S, Ullah I, Ali L, Jung HY, Lee IJ. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. J Microbiol. 2014; 52: 689-95.

Kiio IK, Jackim MF, Munyali WB, Muge EK. Isolation and characterization of a thermostable cellulase from *Bacillus licheniformis* strain vic isolated from geothermal wells in the Kenyan Rift valley. Open Biotechnol J. 2013; 10: 198-207.

Kim YK, Lee SC, Cho YY, Oh HJ, Ko YH. Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments. ISRN Microbiol. 2012: 650563.

Korpole S, Sharma R, Verma D. Characterization and phylogenetic diversity of carboxymethyl cellulase producing *Bacillus* species from a landfill ecosystem. Indian J Microbiol. 2011; 51, 531-535.

Lahrmann U, Zuccaro A. Opprimo ergo sum-evasion and suppression in the root endophytic fungus *Piriformospora indica*. Mol Plant Microbe Interact. 2012; 25:727-737.

Lahoum A, Aouiche A, Bouras N, Verheecke C, Klenk HP, Sabaou N, Mathieu F. Antifungal activity of a Saharan strain of Actinomadura sp. ACD1 against toxigenic fungi and other pathogenic microorganisms. J Mycol Med. 2016; 26: 193-200.

Lahrmann U, Ding Y, Banhara A, Rath M, Hajirezaei MR, Döhlemann S, von Wirén N, Parniske M, Zuccaro A. Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110: 13965-13970.

Latif S, Müller J. Cassava – how to explore the “all-sufficient”. Rural 21, 2014; 48 (3), 30-31.

Li B, Xu LH, Lou MM, Li F, Zhang YD, Xie GL. Isolation and characterization of antagonistic bacteria against bacterial leaf spot of *Euphorbia pulcherrima*. Lett Appl Microbiol. 2008; 46: 450-455.

Li H, Guan Y, Dong Y, Zhao L, Rong S, Chen W, Lv M, Xu H, Gao X, Chen R, Li L, Xu Z. Isolation and evaluation of endophytic *Bacillus tequilensis* GYLH001 with potential application for biological control of *Magnaporthe oryzae*. PLoS One. 2018; 13: 1-18.

Li HM, Sullivan R, Moy M, Kobayashi DY and Belanger FC. Expression of a novel chitinase by the fungal endophyte in *Poa ampla*. Mycologia. 2004; 96: 526-36.

Liu W, Yan Y, Zeng H, Li X, Wei Y, Liu G, He C, Shi H. Functional characterization of WHY-WRKY75 transcriptional module in plant response to cassava bacterial blight. Tree Physiol. 2018; 38: 1502-1512.

Liu X, Li B, Cai J, Zheng X, Feng Y, Huang G. *Colletotrichum* species causing anthracnose of rubber trees in China. Sci Rep. 2018; 8: 1-14.

Monnerat RG, Batista AC, de Medeiros PT, Martins ÉS, Melatti VM, Praça LB, Dumas VF, Morinaga C, Demo C, Gomes ACM, Falcão R, Siqueira CB, Silva-Werneck JO, Berry C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. Biol Control. 2007; 41(3): 291-5.

Monnerat RG, Soares CM, Capdeville G, Jones G, Martins ÉS, Praça L, Cordeiro BA, Braz SV, Dos Santos RC, Berry C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* living inside of plants. Microb Biotechnol. 2009; 2: 512-20.

Mousa WK and Raizada MN. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: An interdisciplinary perspective. Front Microbiol. 2013; 4: 65.

Moy M, Li HM, Sullivan R, White JF and Belanger FC. Endophytic Fungal β-1,6-Glucanase Expression in the Infected Host Grass. Plant Physiol. 2002; 130: 1298-1308.

Muresu R, Tondello A, Polone E, Sulas L, Baldan B, Squartini A. Antioxidant treatments counteract the non-culturability of bacterial endophytes_isolated from legume nodules. Arch Microbiol. 2013; 195: 385-91.

Pattiya A. Thermochemical characterization of agricultural wastes from Thai cassava plantations. Energ Source Part A. 2011; 33, 691-701.

Purić J, Vieira G, Cavalca LB, Sette LD, Ferreira H, Vieira MLC, Sass DC. Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. Lett Appl Microbiol. 2018; 66, 530-536.

Romero FM, Rossi FR, Gárriz A, Carrasco P, Ruíz OA. A bacterial endophyte from apoplast fluids protects Canola plants from different phytopathogens via antibiosis and induction of host resistance. Phytopathology. 2019; 109: 375-383.

Ryan RP, Vorhölter FJ, Potnis N, Jones JB, Sluys V, Bogdanove A.J, Dow JM. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. Nat Rev Microbiol. 2011; 9, 344– 355.

Savelli CJ, Bradshaw A, Ben Embarek P, Mateus C. The FAO/WHO international food safety authorities network in review, 2004-2018: Learning from the past and looking to the future. Foodborne Pathog Dis. 2019; 16(7):480-488.

Shweta S, Bindu JH, Raghu J, Suma HK, Manjunatha BL, Kumara PM, Ravikanth G, Nataraja KN, Ganeshaiah KN, Uma Shaanker R. Isolation of endophytic bacteria producing the anti-cancer alkaloid camptothecine from *Miquelia dentata* Bedd. (Icacinaceae). Phytomedicine. 2013; 20: 913-7.

Sowanpreecha R, Rerngsamran P. Biocontrol of orchid-pathogenic mold, *Phytophthora palmivora*, by antifungal proteins from *Pseudomonas aeruginosa* RS1. Mycobiology. 2018; 46: 129–37.

Spiering MJ, Greer DH, Schmid J. Effects of the fungal endophyte, *Neotyphodium lolii*, on net photosynthesis and growth rates of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) are independent of in Planta endophyte concentration. Ann Bot. 2006; 98: 379-87.

Tan D, Fu L, Han B, Sun X, Zheng P, Zhang J. Identification of an endophytic antifungal bacterial strain isolated from the rubber tree and its application in the biological control of banana *Fusarium* wilt. PLoS One. 2015; 10

Yan K, Han G, Ren C, Zhao S, Wu X, Bian T. *Fusarium solani* infection depressed photosystem performance by inducing foliage wilting in apple seedlings. Front. Plant Sci. 2018; 6: 1-10.

Ye Y, Xiao Y, Ma L, Li H, Xie Z, Wang M, Ma H, Tang H, Liu J. Flavipin in *Chaetomium globosum* CDW7, an endophytic fungus from *Ginkgo biloba*, contributes to antioxidant activity. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97: 7131-9.

Yu H, Zhang L, Li L, Zheng C, Guo L, Li W, Sun P, Qin L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. Microbiol Res. 2010; 165: 437-49.

Zhao YL, Huang X, Liu LW, Wang PY, Long QS, Tao QQ, Li Z, Yang S. Identification of racemic and chiral carbazole derivatives containing an isopropanolamine linker as prospective surrogates against plant pathogenic bacteria: *in vitro* and *in vivo* assays and quantitative proteomics. J Agric Food Chem. 2019; 67: 7512-25.

Zuccaro A, Lahrmann U, Langen G. Broad compatibility in fungal root symbioses. Curr Opin Plant Biol. 2014; 20C:135-45.

ประวัตินักวิจัยและคณะผู้ร่วมวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) วันชัย อัศวลาภสกุล

2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Wanchai Assavalapsakul

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 0-2218-5096 โทรศัพท์มือถือ 08-8245-4159

โทรสาร 0-2252-7576 E-mail: wanchai.a@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2538-2541	ตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (พันธุศาสตร์) เกียรตินิยม	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2542-2547	เอก	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2548-2551	โท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การบริหารเทคโนโลยี)	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	ไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

เทคนิคต่าง ๆ ในทางจุลชีววิทยา อาทิเช่น การแยกเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย และรา การเพาะเลี้ยงในอาหารที่จำเพาะ การศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ เป็นต้น

เทคนิคทางชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล อาทิเช่น การโคลน แสดงออก การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติของโปรตีนต่าง ๆ โดยเฉพาะโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของไวรัส ทั้งของเซลล์เจ้าบ้าน และเชื้อไวรัส, การเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิต่อมน้ำเหลืองจากกุ้ง, การประยุกต์กลไกการ RNA interference มาใช้ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่อเซลล์เจ้าบ้าน และเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง

ผู้ร่วมวิจัยท่านที่ 1

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) กนกพร ไตรวิทยากร

2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Kanokporn Triwitayakorn

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล นครปฐม 73170

โทรศัพท์ 0-2441-9003-6 ต่อ 1368 โทรศัพท์มือถือ 08-9155-8964

โทรสาร 0-2441-9906 E-mail: kanokporn.tri@mahidol.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2530-2534	ตรี	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2534-2536	โท	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2540-2545	เอก	Plant Biology (Molecular Biotechnology and Genetics)	Southern Illinois University at Carbondale	USA

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Molecular biology and genetics, Molecular marker and genome mapping, Gene expression

ผู้ร่วมวิจัยท่านที่ 2

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ศุภจิต สระเพชร

2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Supajit Sraphet

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล นครปฐม 73170

โทรศัพท์ 0-2441-9003-6 ต่อ 1368 โทรศัพท์มือถือ 08-5171-8570

โทรสาร 0-2441-9906 E-mail: supajit.sra@mahidol.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2541-2545	ตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	ไทย
2545-2547	โท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2549-2554	เอก	ปริญญาดุษฎีบัณฑิต (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Genomics, Molecular genetics

ผู้ร่วมวิจัยท่านที่ 3

1. ชื่อ- นามสกุล(ภาษาไทย) ณัฐพล อภิรติกุล

2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Nuttapon Apiratikul

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

114 ซอยสุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110

โทรศัพท์ - โทรศัพท์มือถือ 087-673-8238

โทรสาร - E-mail: nuttapona@g.swu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2544-2547	ตรี	เคมี	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	ไทย
2548-2550	โท	เคมีประยุกต์	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	ไทย
2551-2555	เอก	เคมีประยุกต์	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	ไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Organic chemistry, Natural products

ผู้ร่วมวิจัยท่านที่ 4

1. ชื่อ- นามสกุล(ภาษาไทย) วัฒนชัย จำปาทอง

2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Watthanachai Jumpathong

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โทรศัพท์ 053943341-5 โทรศัพท์มือถือ 094-869-2784

โทรสาร - E-mail: watthanachai.j@cmu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2551	ตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี)	มหาวิทยลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2557	โท-เอก	Biological Engineering (Applied Biosciences)	Massachusettes Institute of Technology (MIT)	อเมริกา

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Organic synthesis, Natural products, Bioanalytical techniques, HPLC separation, mass spectrometry

5.อุปสรรคในการดำเนินงานและแนวทางแก้ไข

1. นิสิตร่วมวิจัยมีปัญหาทางบ้านและหยุดการวิจัยไปตั้งแต่เดือนธันวาคม 2560 จนถึงปลายมีนาคม 2561 แม้ว่าได้ดำเนินการตามนิสิตกลับเข้ามารายงานตัว และสอบถามถึงปัญหาทางบ้านของนิสิตที่เกิดขึ้น นิสิตแจ้งว่าจะลงทะเบียนการศึกษาภาคต้น ปีการศึกษา 2561 และเข้ามาทำงานวิจัยต่อให้เรียบร้อย อย่างไรก็ดี พบว่านิสิตได้ลงทะเบียนการศึกษาภาคต้น ปีการศึกษา 2561 ไว้ แต่นิสิตไม่ได้เข้ามาทำการวิจัยแต่อย่างใด เมื่อสอบถามไป พบว่า นิสิตแจ้งว่ามีปัญหาทางบ้านอื่น ๆ อีก นอกจากนี้นิสิตได้ลงทะเบียนการศึกษาภาคปลาย ปีการศึกษา 2561 เช่นกัน และได้ทำการติดตามนิสิตแล้ว แต่ไม่สามารถติดต่อได้ทุกทาง ทำให้งานบางส่วนดำเนินการได้ช้ากว่ากำหนด และยังคงอยู่ในระหว่างการดำเนินการ

2. ไม่มีนิสิตที่จะเข้าร่วมวิจัยเพิ่มเติม เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้ ซึ่งมีจำนวนมาก ซึ่งทางคณะผู้วิจัยพยายามหานิสิต/นักศึกษา มาช่วยงานเพิ่มเติม แต่ทว่านิสิตที่เข้าเรียนต่อในระดับชั้นมหาบัณฑิตและดุษฎีบัณฑิต มีจำนวนลดลง ซึ่งปีการศึกษา 2562 มีนิสิตที่เข้าศึกษาที่หลักสูตรจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ไม่เกิน 4 คน

(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล)
หัวหน้าโครงการวิจัย
7 สิงหาคม 2562