

การประเมินประสิทธิภาพของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 ในการ
ควบคุมโรค ผลเน่าของอะโวคาโด



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

กันยายน 2568

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การประเมินประสิทธิภาพของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 ในการควบคุมโรค ผล
เน่าของอะโวคาโด



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

กันยายน 2568

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

EVALUATION OF THE EFFICACY OF *BACILLUS SUBTILIS* AS14 AND AS80 IN
CONTROLLING AVOCADO FRUIT ROT DISEASE.



SUPACHAI POTHAI

A Thesis Submitted to University of Phayao
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Master of Science Degree in Environmental Science
September 2025
Copyright 2025 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การประเมินประสิทธิภาพของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 ในการควบคุมโรค ผล
เน่าของอะโวคาโด

ของ ศุภชัย โพธิ์

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ดร. สุรีย์พร สราภิรมย์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชีรชัย อำนวยล้อเจริญ)

..... อาจารย์บัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยพะเยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กฤตชญา อีสกุล)

..... คณบดีคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ต่อพงศ์ กรีธาชาติ)

- เรื่อง:** การประเมินประสิทธิภาพของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 ในการควบคุมโรค
ผลเน่าของอะโวคาโด
- ผู้วิจัย:** ศุภชัย โพธิ์, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2568
- อาจารย์ที่ปรึกษา:** รองศาสตราจารย์ ดร. อธิชัย อำนวยกิจเจริญ
- คำสำคัญ:** เชื้อ *Bacillus subtilis*; เทคโนโลยีพลาสมาเย็น; ฤทธิ์ต้านเชื้อรา; การควบคุมทางชีวภาพ; โรคเน่า
ผลไม้

บทคัดย่อ

โรคผลเน่าเป็นปัญหาที่สำคัญในกระบวนการผลิตอะโวคาโด การจัดการโรคด้วยสารเคมีเป็นวิธีการที่สะดวกและรวดเร็ว แต่ส่งผลกระทบต่อทางด้านสุขภาพและสิ่งแวดล้อมตามมา งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการควบคุมโรคผลเน่าของอะโวคาโดด้วยแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรากต้นอะโวคาโด และแบคทีเรียพันธุ์กลายของทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้จากการชักนำด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น จากการนำ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 มาอาบด้วยพลาสมาอาร์กอนและฮีเลียม ความต่างศักย์ในการกำเนิดพลาสมา 85 โวลต์ อัตราการไหลของแก๊ส 2 ลิตรต่อนาที เป็นเวลาออก 1, 2, 3 และ 5 นาที พบว่าแบคทีเรียที่รอดชีวิตบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) จำนวน 581 ไอโซเลท และจากการประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* spp. ด้วยวิธี Dual culture บนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) พบแบคทีเรียพันธุ์กลายของ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS80 จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ 80MT15, 80MT144, 80MT163 และ 80MT165 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS80 โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อราเท่ากับ ร้อยละ 83.4, 86.3, 85.2 และ 82.8% ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าการยับยั้งร้อยละ 76.4 หลังจากบ่มเป็นเวลา 14 วัน และไม่พบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราของแบคทีเรียพันธุ์กลาย 80MT123 และเมื่อนำเส้นใยของเชื้อราด้านที่ติดกับโคโลนีของแบคทีเรียมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเลนส์ประกอบ พบลักษณะหึ่งงอ บวม และข้อปล้องสั้น แตกต่างกับบริเวณเส้นใยของเชื้อราด้านควบคุม (ไม่ติดกับแบคทีเรีย) จะมีเส้นใยตรง เรียบ และข้อปล้องยาว จากนั้นทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่าบนผลอะโวคาโดด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม (*B. subtilis* สายพันธุ์ AS80) และสายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท 80MT165 มีค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเกิดโรคสูงที่สุด (ร้อยละ 77.59) รองลงมาคือ 80MT163, 80MT144 และ 80MT15 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเกิดโรคเท่ากับร้อยละ 75.71, 74.12 และ 71.15 ตามลำดับ และ 80MT123 ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรค และจากการตรวจสอบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส โปรติเอส และไคติเนส พบว่าเอนไซม์ที่สำคัญในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS80 และแบคทีเรียพันธุ์กลายทั้ง 4 ไอโซเลท คือ เอนไซม์ไคติเนสและ เซลลูเลส ดังนั้น แบคทีเรียพันธุ์กลายทั้ง 4 ไอโซเลทจึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคผลเน่าของอะโวคาโดได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นมิตรต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

Title: EVALUATION OF THE EFFICACY OF *BACILLUS SUBTILIS* AS14 AND AS80 IN CONTROLLING AVOCADO FRUIT ROT DISEASE.

Author: Supachai Pothi, Thesis: M.S. (Environmental Science), University of Phayao, 2025

Advisor: Associate Professor Dr Teerachai Amnuaylojaroen

Keywords: Bacillus subtilis; Cold plasma technology; Antifungal activity; Biocontrol; Fruit rot disease

ABSTRACT

One major issue in the cultivation of avocados is avocado fruit rot. Chemical control has detrimental effects on both the environment and human health, despite being a quick and easy solution. The purpose of this study was to assess the effectiveness of antagonistic *Bacillus subtilis* strains AS14 and AS80, which were isolated from the soil of the avocado rhizosphere, as well as their mutant strains that were created using a cold plasma approach, in controlling the disease known as avocado fruit rot. The *B. subtilis* strains AS14 and AS80 were treated with argon and helium plasma at a plasma-generating potential of 85 volts and a gas flow rate of 2 liters per minute for 1, 2, 3, and 5 minutes. A total of 581 surviving bacterial isolates were obtained on Luria Bertani (LB) agar. The efficacy of these isolates in inhibiting the mycelial growth of *Fusarium* spp. was evaluated using the dual culture method on Potato Dextrose Agar (PDA). Four mutant isolates of *B. subtilis* strain AS80 namely 80MT15, 80MT144, 80MT163, and 80MT165 showed significantly higher inhibitory effects compared to the wild type strain (*B. subtilis* AS80). The average percentage of mycelial growth inhibition was 83.4%, 86.3%, 85.2%, and 82.8%, respectively, while the wild type strain showed a 76.4% inhibition after 14 days of incubation. Moreover, there was no inhibition observed in isolate 80MT123. Microscopic examination of the fungal hyphae adjacent to the bacterial colonies revealed morphological changes such as coiling, swelling, and shortened septal compartments, which were absent in the control hyphae (not in contact with bacteria). Furthermore, the ability of the five selected isolates and the wild type strain to control fruit rot disease was tested on avocado fruit. Bacterial isolate, 80MT165, exhibited the highest average inhibition of disease development (77.59%), followed by 80MT163 (75.71%), 80MT144 (74.12%), and 80MT15 (71.15%) while 80MT123 showed no inhibitory effect. Analysis of specific enzymatic activities (cellulase, amylase, protease, and chitinase) revealed that chitinase and cellulase enzymes were primarily responsible for the inhibition of mycelial growth in *B. subtilis* strain AS80 and the four effective mutant isolates. Therefore, these four mutant isolates are suitable for development as biological agent for the effective and environmentally friendly control of avocado fruit rot disease.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูง รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรชัย อำนวยล้อเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤตชญา อีสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา สืบแสน และ ดร.กันตา แสงวิจิตร อาจารย์ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และคำปรึกษาจนวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.สุริย์พร สราภิรมย์ อาจารย์จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้กรุณารับเป็นประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ พร้อมให้คำแนะนำเพิ่มเติมในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์จากสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมคณะพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยาที่อบรมสั่งสอนประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และประสบการณ์ต่าง ๆ ให้แก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ได้มอบทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ ประจำปี 2566 ฉบับที่ 2 เพื่อเป็นทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิศวกรรมพลาสมา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดามารดา ญาติพี่น้อง และขอบคุณเพื่อนๆ ที่คอยเป็นกำลังใจให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งนี้

ศุภชัย โพธิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของเวลา.....	3
ประโยชน์ที่จะได้รับการจากการวิจัย.....	3
บทที่2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
อะโวคาโด.....	4
ปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตอะโวคาโด.....	4
โรคผลเน่าของอะโวคาโด.....	6
ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Fusarium</i> spp.....	7
ลักษณะทั่วไป ดังนี้.....	7
สารเคมีเพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา	8
สารชีวภาพเพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา.....	9
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา.....	11

พลาสมาเทคโนโลยี.....	12
1. พลาสมา (plasma).....	12
2. เทคโนโลยีพลาสมาเย็น	12
3. กลไกการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมาเย็น	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	15
วิธีดำเนินการงานวิจัย	16
แบคทีเรียปฏิบัณฑ์ และเชื้อราก่อโรคที่ใช้งานวิจัย.....	16
การประเมินประสิทธิภาพในการเป็นปฏิบัณฑ์ของเชื้อรา <i>Fusarium</i> spp. ของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ AS14 และ AS80	16
การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ AS14 และ AS80 ด้วย เทคนิคพลาสมาเย็น.....	17
การเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย.....	17
การชักนำเกิดพันธุ์กลายของแบคทีเรียด้วยพลาสมา	18
การคัดเลือกแบคทีเรียพันธุ์กลายโดยการประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Fusarium</i> spp. ของแบคทีเรียพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับชุดควบคุม	18
การประเมินความสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส ไคติเนส และโปรติเอส ของ แบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> AS80 พันธุ์กลายเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เกี่ยวข้องควบคุม การเจริญของเชื้อราก่อโรค.....	20
การประเมินกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส และอะไมเลส	20
การประเมินกิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์โปรติเอส.....	20
การประเมินกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส.....	21
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	24
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	25

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> AS14 และ AS80 ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น.....	26
การประเมินความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Fusarium</i> spp. ของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> AS14 และ AS80 ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม	27
การประเมินความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Fusarium</i> spp. ของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> AS80 พันธุ์กลายที่ถูกคัดเลือกเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม	28
ผลการทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าในผลอะโวคาโดด้วยแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือก	31
การประเมินกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรค ของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> AS80 พันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมโปรติเอส	33
ผลการประเมินกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส	33
ผลการประเมินกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส	34
ผลการประเมินกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส	35
ผลการประเมินกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส.....	36
ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Polysaccharide Deacetylase C (PdaC) และ Chitosanase จากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> AS80 พันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม.	37
การโคลนยีน PdaC และ Chitosanase เข้าสู่พลาสมิด pJet 1.2 blunt และ ถ่ายโอนเวกเตอร์สายผสมเข้าสู่ <i>E.coil</i> สายพันธุ์ DH5 α	38
การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน PdaC และ Chitosanase จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิม (<i>B. subtilis</i> AS80) และพันธุ์กลาย 80MT144	39
บทที่5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล	41
สรุปผลการวิจัย.....	41
อภิปรายผลการวิจัย.....	42
บรรณานุกรม.....	45
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	52
ภาคผนวก ข การเตรียมสาร	52

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานของสารละลาย.....	53
ประวัติผู้วิจัย.....	61



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ขั้นตอนและอุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยา PCR	22
ตาราง 2 ส่วนผสมของสารเคมีในขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	23
ตาราง 3 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> AS14 และ AS80 ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์.....	28
ตาราง 4 ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> AS80 พันธุ์กลายที่ถูกคัดเลือกเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม	29
ตาราง 5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกในการควบคุมเชื้อราก่อโรค <i>Fusarium</i> ssp. บน ผลอะโวคาโด ในสภาพห้องปฏิบัติการ	32
ตาราง 6 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย.....	34
ตาราง 7 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย	35
ตาราง 8 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากแบคทีเรีย	36
ตาราง 9 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย	37

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพ 1 ลักษณะอาการของโรคผลเน่าที่เกิดบริเวณผลอะโวคาโด	6
ภาพ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Fusarium</i> spp.	7
ภาพ 3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี dual culture ดัดแปลง จาก Avendaño et al, (2018)	17
ภาพ 4 ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ AS14 และ AS80 เป็นเวลา 7 และ 14 วัน	25
ภาพ 5 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ AS14 ภายหลังถูกอาบด้วยพลาสมา ของอาร์กอน และฮีเลียม เป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 5 นาที	26
ภาพ 6 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ AS80 ภายหลังถูกอาบด้วยพลาสมา ของอาร์กอน และฮีเลียม เป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 5 นาที	27
ภาพ 7 ฤทธิ์การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> AS80 และพันธุ์กลายต่อเชื้อรา <i>Fusarium</i> spp. A. ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค B. การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ ด้วยเทคนิค Dual culture 80MT15 80MT144 80MT163 80MT165 80MT123.....	30
ภาพ 8 ลักษณะของเส้นใยเชื้อราก่อโรค <i>Fusarium</i> spp. ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี dual culture เป็นเวลา 14 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 400 และ 1000 เท่า.....	31
ภาพ 9 การประเมินความสามารถในการควบคุมโรคผลเน่าในผลอะโวคาโดด้วยแบคทีเรีย.....	33
ภาพ 10 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ Marker Lambda/Pst I.....	38
ภาพ 11 ผลการตัดเชื้อการส่งถ่ายเวกเตอร์ลูกลูกผสมที่มียีน PdaC และ Chitosanase เข้าสู่ <i>E. coli</i> DH5 α	39
ภาพ 12 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน PdaC และ Chitosanase จากแบคทีเรียสาย พันธุ์ดั้งเดิม (<i>B. subtilis</i> AS80) และพันธุ์กลาย 80MT144.....	40
ภาพ 14 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส.....	55

ภาพ 15 กราฟมาตรฐานของสารละลาย L-tyrosine.....	56
ภาพ 16 กราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetyl-glucosamine.....	58
ภาพ 17 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA.....	59



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

อะโวคาโด (*Persea americana* Mill) เป็นไม้ผลกิ่งเขตร้อนที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศเม็กซิโก และอเมริกากลาง มีการผลิตและบริโภคอย่างกว้างขวางทั่วโลก อะโวคาโดจัดอยู่ในวงศ์ Lauraceae ซึ่งมีมากกว่า 150 สายพันธุ์ ในประเทศไทยมีการเพาะปลูกอะโวคาโดมายาวนานไม่น้อยกว่า 80 ปี พบว่ามีการเพาะปลูกในหลายพื้นที่ทั่วประเทศได้แก่ เชียงใหม่ ลำพูน ตาก นครราชสีมา และ จันทบุรี เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2559) โดยภาคเหนือมีพื้นที่การปลูกอะโวคาโดมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 97 ของพื้นที่ทั่วประเทศ และจังหวัดเชียงใหม่เป็นแหล่งเพาะปลูกอะโวคาโดมากที่สุด มีพื้นที่เพาะปลูกโดยรวม 11,309 ไร่ (ธาวิดา ศิริสัมพันธ์, 2565) สายพันธุ์ที่นิยมปลูกมากที่สุด คือ สายพันธุ์ แฮส เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่เป็นต้องการของตลาด เนื้อผลดี ไขมันสูง และมีราคาสูง จนเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งบนพื้นที่สูง อะโวคาโดเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง (super fruit) (ศรัญญา อุทธิยาเส้า และคณะ, 2559) อะโวคาโดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัว (ไขมันดี) วิตามินต่างๆ เช่น วิตามิน E, K, C และโพแทสเซียม ช่วยป้องกันโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ โรคหลอดเลือด และลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็ง เป็นต้น (Villa-Rodríguez et al, 2011) จึงเป็นที่ต้องการผู้บริโภคที่รักสุขภาพ

ปัจจุบันพบว่าปัญหาหลักในกระบวนการผลิตอะโวคาโด คือ การสูญเสียผลผลิตจากการบุกรุกของแมลงและเชื้อรา ทั้งนี้เชื้อราที่เป็นสาเหตุหลักคือ เชื้อราสกุล *Fusarium* และ *Collectotrichum* ซึ่งก่อให้เกิดโรคผลเน่าและแอนแทรคโนส การเกิดโรคเหล่านี้ส่งผลทำให้ผลผลิตอะโวคาโดนั้นลดลง และส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจเป็นวงกว้าง (มดิชน, 2562) ดังนั้นเกษตรกรจึงต้องพึ่งพาสารเคมีในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคซึ่งนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีประสิทธิภาพและออกฤทธิ์ชัดเจนและรวดเร็ว อีกทั้งยังสามารถที่จะควบคุมการกระจายของเชื้อราสาเหตุของโรคได้ แต่ในทางกลับกันการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่อง และการใช้อย่างไม่มีการควบคุมจะส่ง

ผลกระทบต่อความปลอดภัยทั้งตัวเกษตรกร ผู้บริโภค รวมทั้งสภาพสิ่งแวดล้อม อีกทั้งเชื้อราจะพัฒนาในการต้านทานต่อสารเคมีเหล่านี้ได้ (สุพจน์ กาเซ็ม, 2558) ปัจจุบันจึงมีการค้นคว้าทางเลือกที่จะควบคุมโรคพืชโดยไม่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้สารควบคุมทางชีวภาพจากแบคทีเรีย ถือเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยและยั่งยืนมากกว่าสารกำจัดศัตรูพืชสังเคราะห์ (Daranas et al, 2019) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารต่อต้านเชื้อราสาเหตุของโรค อาศัยกลไกหลายรูปแบบในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุของโรค เช่น การผลิตเอนไซม์ หรือสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืช และบางชนิดกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และส่งเสริมความทนทานของพืชได้ (นลินี ศิวกรรณ์ และคณะ, 2553)

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นประเมินประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นอะโวคาโดและปรับปรุงประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคของแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็นและศึกษากิจกรรมเอนไซม์มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมเชื้อราก่อโรคผลเน่าที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และลดต้นทุนในกระบวนการผลิตให้แก่เกษตรกร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อประเมินประสิทธิภาพ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าของอะโวคาโด
2. เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค *Fusarium* spp. ของ *B. subtilis* ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น

ขอบเขตของการวิจัย

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 มาประเมินประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ต่อ เชื้อรา *Fusarium* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในอะโวคาโด ด้วยวิธี dual culture บนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) และเพิ่มประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น

และเปรียบเทียบความสามารถการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียพันธุ์กลายกับแบคทีเรียดั้งเดิม จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส ไคติเนส และโปรติเอส ของแบคทีเรียพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับแบคทีเรียดั้งเดิม โคลนยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไป ค่าเฉลี่ยจากการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ขอบเขตของเวลา

มกราคม พ.ศ. 2565 – เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2567

ประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัย

ได้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพในการควบคุมโรคที่มีเชื้อรา *Fusarium* spp. เป็นสาเหตุ ซึ่งเป็นการควบคุมโรคแบบเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และปลอดภัยสำหรับผู้ผลิตและผู้บริโภค

บทที่2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อะโวคาโด

อะโวคาโดเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นผลไม้ที่ให้พลังงานสูง มีแร่ธาตุและวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายในปริมาณที่สูง สามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคเบาหวาน (Villa-Rodríguez et al, 2011) จากแนวโน้มความต้องการของผู้บริโภคที่มากขึ้นจึงมีการส่งเสริมให้เพาะปลูกในหลายพื้นที่ทั่วประเทศไทยโดยเฉพาะภาคเหนือ ซึ่งพบว่าจังหวัดเชียงใหม่เป็นแหล่งปลูกอะโวคาโดโดยมีพื้นที่การปลูกใหญ่ที่สุด พื้นที่เพาะปลูกโดยรวม 11,309 ไร่ (ธาวิดา ศิริสัมพันธ์, 2565) อะโวคาโดมีหลากหลายสายพันธุ์ สายพันธุ์ที่ได้รับส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจคือสายพันธุ์แฮส เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่เนื้อผลดี มีไขมันดีสูงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศมาก ราคาจำหน่ายจึงสูงกว่าสายพันธุ์อื่น (Villa-Rodríguez et al, 2011) จากข้อมูลทางเศรษฐกิจ ปี พ.ศ. 2564 พบว่ามูลค่าตลาดอะโวคาโด ทั่วโลกสูงถึง 400,000 ล้านบาท/ปี ประเทศที่นำเข้าอันดับ 1 คือ ประเทศสหรัฐอเมริกา และคาดการณ์ว่าตลาดอะโวคาโดทั่วโลกจะขยายตัว 2 เท่า ในช่วง 5 ปี อย่างไรก็ตามที่ผ่านมาประเทศไทยนำเข้าอะโวคาโดผลสดจากต่างประเทศประมาณ 300 ล้านบาทต่อปี ซึ่งนับเป็นโอกาสดีของเกษตรกรผู้ปลูกอะโวคาโดในการผลิตและจำหน่ายอะโวคาโดทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ (ศูนย์รวมข้อมูลธุรกิจเอสเอ็มอี, 2564)

ปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตอะโวคาโด

1. สภาพอากาศ

อะโวคาโดเป็นพืชเขตร้อน และกึ่งร้อนขึ้นโดยดินที่เหมาะสมแก่การปลูกอะโวคาโดคือดินที่มีการระบายน้ำได้ดี และสภาพดินมีความอุดมสมบูรณ์ โดยอะโวคาโดควรได้รับน้ำอย่างต่ำปีละ 700-1000 มิลลิเมตร (สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง, 2561)

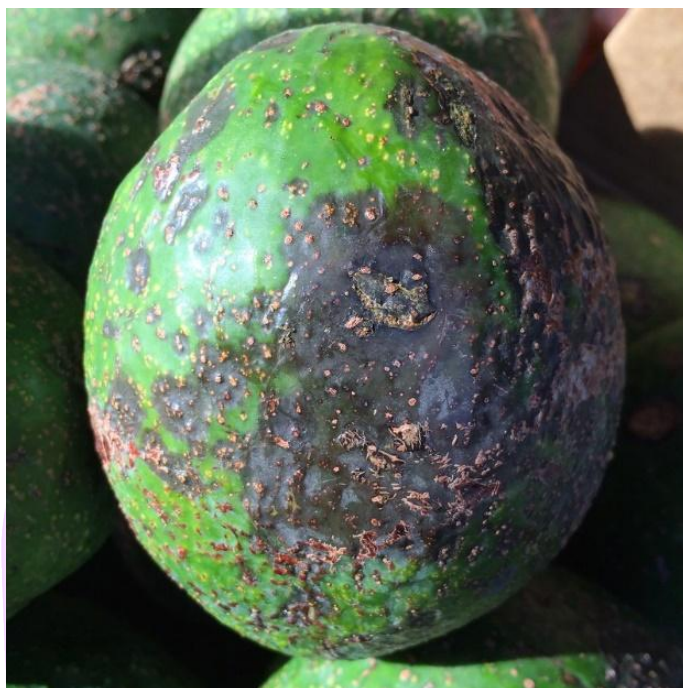
2. แมลง

แมลงจะสร้างความเสียหายต่อต้นอะโวคาโดรวมไปถึงผลผลิตอะโวคาโด โดยพบแมลงที่เป็นศัตรูอะโวคาโดหลายชนิด ได้แก่ *Hypomeces squamosus*, *Thrips oryzae*, *Pseudococcidae* spp. และ *Zeuzeracoffeae* spp. (สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง, 2561) โดยแมลงเหล่านี้จะกัดกินใบ ดอก และผลอะโวคาโด ทำให้เกิดความเสียหายเป็นรูพรุน

3. โรค

โรคที่สำคัญของอะโวคาโดได้แก่ โรคครากเน่า โรคแอนแทรคโนส โรคแคงเกอร์ โรคใบจุด และโรคผลเน่า (สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง, 2561) โดยโรคที่พบในอะโวคาโดมากที่สุดคือโรคผลเน่า ซึ่งภายหลังการเก็บเกี่ยวส่งผลทำให้การเก็บเกี่ยวหรือการผลิอะโวคาโดนั้นลดน้อยลง และเกิดผลกระทบต่อเศรษฐกิจเป็นวงกว้าง

โรคผลเน่าในอะโวคาโดเป็นโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทั้งปริมาณและคุณภาพ โดยมีเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าอยู่ในสกุล *Fusarium* โรคผลเน่าสามารถพบได้ทั่วไปและกระจายอยู่ทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตร้อนชื้นนั้นจะพบการระบาดอย่างรุนแรง การระบาดของโรคนั้นมีปัจจัยหลายอย่าง เช่น ลม ฝน หรือมีสิ่งมีชีวิตมาเกาะตามบริเวณแผล ซึ่งทำให้เกิดการกระจายของสปอร์ของเชื้อราไปยังที่ต่าง ๆ เมื่อมีความชื้นหรือสภาพอากาศที่เหมาะสมทำให้สปอร์ของเชื้อรานั้นสามารถที่จะเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วโดยเชื้อรา *Fusarium* ทำให้ผลผลิตเน่าเสีย และอายุการเก็บรักษานั้นมีระยะสั้นไม่สามารถที่จะขนส่งระยะไกลได้ อีกทั้งยังสามารถเข้าไปทำลายผลผลิตทั้งก่อนเก็บเกี่ยวและหลังเก็บเกี่ยว เชื้อรา *Fusarium* สามารถที่จะเข้าไปทำลายเซลล์โดยตรงไม่ต้องผ่านช่องเปิดธรรมชาติหรือตามบาดแผล โดยโรคผลเน่าจะยังไม่แสดงอาการของโรคในระยะผลอ่อนแต่จะแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนในผลผลิตเริ่มแก่หรือสุกแล้ว เริ่มแรกจะเกิดจุดแผลขนาดเล็กสีน้ำตาลดำ จากนั้นจุดแผลจะขยายใหญ่ลุกลามมากขึ้น ถ้าอากาศชื้นสูงจะพบเส้นใยสีขาวของเชื้อราบนแผล ซึ่งสามารถพบอาการของโรคได้ตั้งแต่ยังอยู่บนต้น ถ้าอาการรุนแรงมากจะส่งผลให้ผลเน่าและร่วงหล่นก่อนกำหนด ดังภาพ 1



ภาพ 1 ลักษณะอาการของโรคผลเน่าที่เกิดบริเวณผลอะโวคาโด

ที่มา: Nelson, 2014

โรคผลเน่าของอะโวคาโด

สาเหตุของโรคผลเน่าเกิดจากเชื้อราหลายสายพันธุ์ โดยพบการระบาดของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผลเน่าของอะโวคาโดในประเทศแอฟริกาใต้ ได้แก่ *Thyronectria pseudotrichia*, *Dothiorella aromatica*, *Pestalotiopsis versicolor*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Rhizopus stolonifer*, *F. sambucinum* และ *F. solani* โรคผลเน่าในออสเตรเลียและอิสราเอลของอะโวคาโดส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* ซึ่งติดเชื้อแฝงตลอดการปลูกอะโวคาโด จากการศึกษาของ Wanjiku, (2020) ระบุว่าเชื้อรา *L. theobromae*, *N. parvum*, *N. pseudotrachia* และ *F. solani* เป็นสาเหตุหลักของโรคผลเน่าของผลอะโวคาโดในเคนยา โดยเชื้อราที่ทำให้เกิดผลอะโวคาโดเน่ามักจะบุกรุกผลไม้ผ่านทางบาดแผล อย่างไรก็ตามเชื้อราบางชนิดสามารถแทรกซึมเข้าสู่ผิวผลไม้ได้โดยตรง โดยเริ่มแรกอาการของโรคผลเน่าในอะโวคาโดจะเริ่มเกิดจุดแผลสีน้ำตาลดำ จากนั้นแผลจะเริ่มขยายใหญ่ และลูกกลามมากขึ้นผลอะโวคาโดจะเริ่มเน่าจากนั้นเนื้อของอะโวคาโดเน่าเปื่อยทั้งหมด (Rahman, 2023)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium* spp.

Division Ascomycota

Class Sordariomycetes

Order Hypocreales

Family Nectriaceae

Genus *Fusarium*

ลักษณะทั่วไป ดังนี้

Fusarium spp. เป็นเชื้อราที่มีเส้นใยขนาดใหญ่ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Hyphomycetes เชื้อราชนิดนี้พบกระจายทั่วไปในดินและมักพบในพืชและก่อให้เกิดโรคพืชได้หลากหลายชนิด องค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราประกอบด้วย พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) 80-90% เป็นไคติน (chitin) หรือ เซลลูโลส (cellulose) ลิพิด (lipid) และ โปรตีน (protein) เส้นใยของเชื้อรา มีสีตั้งแต่สีขาวจนถึงม่วงอ่อน ดังภาพ 2 (a) เส้นใยแตกออกเป็นกิ่งก้าน มีผนังกัน (septate) สามารถสร้างเส้นใยได้ดี เชื้อราสามารถสร้างฟรุติงบอดี้ (fruiting body) เพื่อให้กำเนิดโคนิเดีย เรียกว่า คอนดิโอมาตา (conidiomata) ซึ่งจะมีสีน้ำตาล โคนิเดีย (conidia) มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นรูปวงรี รูปไข่ (Moral et al, 2024) ภาพ 2 (b)



ภาพ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium* spp.

- ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่เจริญบนอาหาร PDA
- ลักษณะโครงสร้างโคนิเดียของเชื้อรา *Fusarium* spp.

ที่มา: Srinivas, 2019

สารเคมีเพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา

ประเทศไทยพึ่งพาการใช้สารเคมีในการเกษตรเป็นอย่างมากในฐานะเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันพืชผลเพื่อเพิ่มระดับการผลิต คุณภาพของผลิตภัณฑ์ และรูปลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ (HSRI, 2005) จากข้อมูลของสำนักงานปลัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ของกรมวิชาการเกษตร พบว่ามีการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชประมาณ 70,000 ตัน ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ 265 ชนิด เข้าสู่ประเทศไทยในปี พ.ศ. 2553 สารฆ่าเชื้อราที่นำเข้ามากที่สุด ได้แก่ แมนโคเซบ ซัลเฟอร์ คาร์เบนดาซิม โพรมิเนบ และแคปแทน สารกำจัดศัตรูพืชเหล่านี้คิดเป็นประมาณ 75% ของปริมาณการนำเข้าทั้งหมด สารกำจัดเชื้อรามีมากมายหลายกลุ่มความเป็นพิษมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของสารเคมี โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมีกำจัดเชื้อราดังนี้ (สำนักงานควบคุมการเกษตร, 2554)

1.สารป้องกัน (Protectant fungicides)

สารเหล่านี้จะออกฤทธิ์ที่ผิวของพืช ป้องกันไม่ให้สปอร์ของเชื้อรางอกและเข้าทำลายพืชได้ ตัวอย่างเช่น สารในกลุ่ม QoI (Quinone outside Inhibitors) ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการงอกของสปอร์

2.สารดูดซึม (Systemic fungicides)

สารเหล่านี้จะถูกดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชและเคลื่อนย้ายไปยังส่วนต่างๆ ของพืช ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อราภายในพืชได้

3. สารเคลื่อนย้ายได้ (Mobile fungicides)

สารเหล่านี้สามารถเคลื่อนย้ายจากบริเวณที่ฉีดพ่นไปยังบริเวณใกล้เคียงได้ อาจเป็นสารดูดซึมหรือไม่ดูดซึมก็ได้

4.สารที่เคลื่อนย้ายจากบนใบไปใต้ใบ (Translaminar fungicides):

สารเหล่านี้สามารถเคลื่อนที่จากผิวใบด้านบนไปยังผิวใบด้านล่างได้ ช่วยในการควบคุมเชื้อราที่อยู่ใต้ใบได้

โดยสารป้องกันเชื้อรา แมนโคเซบ, โพรมิเนบ และแคปแทน อยู่ในกลุ่มสารป้องกัน ซัลเฟอร์ คาร์เบนดาซิม อยู่ในกลุ่มสารดูดซึม อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีป้องกันเชื้อราในการเกษตร แม้จะช่วยควบคุมโรคพืชได้ แต่ก็มีอันตรายทั้งต่อสุขภาพ และสิ่งแวดล้อม หากใช้ไม่ถูกวิธีหรือใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสมดังนี้ (กรมวิชาการเกษตร, 2560)

ผลกระทบต่อสุขภาพ

1. เฉียบพลัน

เกิดจากสารเคมีกำจัดเชื้อราในกลุ่มสารป้องกัน เมื่อได้รับสารเคมีป้องกันเชื้อราในปริมาณมากอาจทำให้เกิดอาการระคายเคืองต่อผิวหนัง ดวงตา และระบบทางเดินหายใจ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เวียนศีรษะ ปวดศีรษะ กล้ามเนื้อกระตุก ชัก หมดสติ และอาจถึงแก่ชีวิตได้

2. เรื้อรัง

เกิดจากสารเคมีกำจัดเชื้อราในกลุ่มสารดูดซึม เมื่อได้รับสารเคมีเหล่านี้เป็นเวลานานอาจสะสมในร่างกายและส่งผลกระทบต่อระบบต่าง ๆ เช่น ระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์ ระบบต่อมไร้ท่อ ระบบภูมิคุ้มกัน และอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง โรคทางพันธุกรรม และความผิดปกติแต่กำเนิดในทารก

ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

1. ดิน

สารเคมีอาจตกค้างในดิน ทำให้ดินเสื่อมคุณภาพ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชและระบบนิเวศ

2. น้ำ

สารเคมีอาจปนเปื้อนลงแหล่งน้ำ ทำให้แหล่งน้ำเสื่อมโทรมและเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ

3. สิ่งมีชีวิตอื่นๆ

สารเคมีอาจเป็นอันตรายต่อแมลงที่เป็นประโยชน์ เช่น ผีเสื้อ และส่งผลกระทบต่อห่วงโซ่อาหาร

สารชีวภาพเพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา

ปัจจุบันมีสารชีวภาพที่ใช้ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิด เช่น เชื้อราและแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp., *B. bassiana* , *G. virens* และ *P. oligandrum* ถูกนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และสารควบคุมทางชีวภาพ (Sharma, 2019 ; Subedi et al, 2020) การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นแนวทางเชิงนิเวศที่ยั่งยืนเพื่อลดการพึ่งพาปุ๋ยแร่ธาตุฆ่าแมลง และปรับปรุงสุขภาพของดิน (Zaidi et al, 2017) โดยสารเหล่านี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่หลากหลาย เช่น การแข่งขันเพื่อแย่ง

อาหารและที่อยู่ การผลิตสารยับยั้งหรือการสร้างเอนไซม์ที่ทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา (Vinale et al, 2008) และยังมีรายงานว่าการใช้จุลินทรีย์หรือแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic microorganisms) ต่อเชื้อราก่อโรคสามารถใช้แบคทีเรียโดยตรงหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโต เช่น เอนไซม์ต่าง ๆ สารพิษ หรือยาปฏิชีวนะที่ส่งผลต่อการควบคุมโรค (สุพจน์ กาเซ็ม, 2558) โคตินีนโดยทั่วไปถือว่าเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการกำจัดเชื้อรา เนื่องจากโคตินีนเป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุดเอนไซม์ของเชื้อราหลายชนิด โคตินีนถูกจัดกลุ่มเป็นสามตระกูล ได้แก่ GH18, GH19 และ GH20 (Lombard et al, 2014) และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกในการควบคุมแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค 4 ลักษณะ ดังนี้ (ปัทมวรรณ มณีสุวรรณ และพิศาล ศิริธร, 2556)

1.การแข่งขัน (competition)

โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถแข่งขันกับโรคพืชในด้านต่าง ๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ ทำให้โรคพืชไม่สามารถที่จะเจริญได้ หรือไม่สามารถอาศัยอยู่บริเวณนั้นได้ การแข่งขันที่พบมากที่สุดคือ การนำเอาธาตุอาหารหรือสารต่าง ๆ ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมมาใช้ในการเจริญเติบโต ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญเข้าไปทำลายพืชได้

2.การหลั่งสารยับยั้งการเจริญเติบโต (antibiosis)

โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ส่วนใหญ่ที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้นจะเน้นคุณสมบัติการทำลายชีวิตของเชื้อราก่อโรคเป็นส่วนใหญ่ โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์จะสามารถผลิตสารต่าง ๆ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งเป็นการผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้

3. การเป็นปรสิต (parasitism)

แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (parasite) โดยเข้าไปเจริญอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ พบได้ไม่มากการใช้ควบคุมโรคพืชยังไม่ประสบความสำเร็จ

4. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced resistance)

พืชสามารถสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อราก่อโรคได้เมื่อได้รับการชักนำจากอีลิซิเตอร์ (elicitor) สามารถทำได้โดยใช้แบคทีเรียเป็นตัวกระตุ้น ซึ่งแบคทีเรียสามารถชักนำเกิดกระบวนการป้องกันตัวเองจากการบุกรุกเชื้อราสาเหตุของโรคได้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา

มีรายงานความสำเร็จการควบคุมโรคผลเน่าในผลไม้ที่มีเชื้อราเป็นสาเหตุด้วยวิธีชีวภาพดังนี้ Saravanakumar, (2008) รายงานว่ายีสต์ *Metschnikowia pulcherrima* มีสารควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราหลายชนิดในแอปเปิ้ลที่เก็บในที่อุณหภูมิต่ำภายใต้สภาวะควบคุม นอกจากนี้พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้งการติดเชื้อ *Fusarium oxysporum* และ *Botryodiplodia theobromae* ในมันเทศได้สูงถึง 83% โดยพบการสลายของผนังเซลล์เชื้อราอย่างสมบูรณ์หลังจากผ่านไป 36 ชั่วโมง ซึ่งการสลายตัวของผนังเซลล์คาดว่าเกิดจากเอนไซม์ไคตินเนสที่แบคทีเรียผลิตขึ้น (Swain, 2008) และมีรายงานว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus* spp. สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้หลายชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะ สารไซเดอโรฟอร์ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ และเอนไซม์ต่าง ๆ โดยเอนไซม์ไคตินเนสมีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา เนื่องจากไคตินสจะย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อรายับยั้งเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค (Kim et al, 2008; Droby et al, 2009) และมีการสันนิษฐานว่า *Paenibacillus* spp. สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราจากการผลิตยาปฏิชีวนะและเอนไซม์ที่ทำลายผนังเซลล์ เช่น ไคตินเนส และ B-1,3-glucanase รวมถึงสารต่าง ๆ ที่ผลิตโดย *Bacillus* spp. นอกจากนี้ นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่พบใน *Paenibacillus* spp. เช่น อะไมเลส โปรตีเอส และ เซลลูเลส อาจมีส่วนร่วมในการควบคุมการเจริญของโรคที่เกิดจากเชื้อรา (Grawal, 2012) และในปี ค.ศ. 2014 Ashwini พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถควบคุมโรคพืชได้หลากหลาย และพบว่าเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญ คือ ไคตินเนส และ β -1,3-glucanase และ *B. subtilis* ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในการควบคุมโรคทางการเกษตรเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดี และแบคทีเรียชนิดนี้สามารถปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ (Chandrasekaran, 2016)

นอกจากแบคทีเรียยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีกลไกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เช่น Volatile organic Compounds (VOCs) ซึ่งเป็นสารที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยว เช่น *Aureobasidium pullulans* ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวในแอปเปิ้ล (Di Francesco, 2016) การศึกษาแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ALICA มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไมโคไลติกสามชนิด (ไคตินเนส เบต้า-1,3-กลูคาเนส) เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* พบว่าเส้นใยเชื้อราที่ทดสอบได้รับความเสียหาย มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา เช่น ความเสียหาย การแตกหัก

การบวม การบิตเบี้ยว สันฐานวิทยาที่ผิดปกติ (Abdelmoteleb, 2018) *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าเส้นใยเชื้อรามีความเสียหาย บวม และบิตเบี้ยวเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Ashwini, 2014)

ปัจจุบันมีความกังวลในการใช้สารเคมีกำจัดโรคมมากขึ้น การใช้สารชีวภัณฑ์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้ปลอดภัยต่อเกษตรกรผู้ผลิตและผู้บริโภค สารชีวภัณฑ์ส่วนมากจะคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่พบในธรรมชาติ จากการศึกษาพบว่า การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาศักยภาพของแบคทีเรียให้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชสูงขึ้น ซึ่งเทคโนโลยีพลาสมาเย็นเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่เหมาะสมความสำเร็จในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย

พลาสมาเทคโนโลยี

1. พลาสมา (plasma)

พลาสมาคือสถานะที่ 4 ที่อยู่ในรูปแบบของไอออน ประกอบไปด้วยอนุภาคที่มีประจุบวก และลบ จึงปลดปล่อยคลื่นสนามแม่เหล็กไฟฟ้าได้ กระบวนการเกิดพลาสมาจากสถานะก๊าซเมื่อก๊าซได้รับพลังงานอย่างต่อเนื่อง เมื่อก๊าซมีพลังงานมากพอจะทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากอะตอมโดยกระบวนการนี้เรียกว่า “กระบวนการแตกตัวเป็นไอออน” (Ionization) กระบวนการแตกตัวเป็นไอออน เมื่อการแตกตัวเป็นไอออนเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว อิเล็กตรอนอิสระที่เกิดขึ้นจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ พร้อมกับการเกิดไอออนบวกตามมา ส่งผลให้ก๊าซซึ่งเดิมเป็นกลางทางไฟฟ้า ค่อย ๆ เปลี่ยนแปลงไปเป็น พลาสมา ซึ่งเป็นสถานะที่เต็มไปด้วยอนุภาคมีประจุไฟฟ้าจำนวนมาก

2. เทคโนโลยีพลาสมาเย็น

พลาสมาเย็นเป็นเทคโนโลยีที่สะอาด ไม่มีสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม และสามารถสร้างได้รวดเร็ว พลาสมาเย็นเกิดจากการให้พลังงานกระตุ้นสถานะก๊าซภายใต้ความดันบรรยากาศและอุณหภูมิห้อง ทำให้เกิดการแตกตัวของไอออนเพียงบางส่วน ซึ่งทำให้อุณหภูมิของไอออนที่แตกตัวออกมาสามารถเย็นตัวลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง แก๊สอาร์กอนและฮีเลียมถูกนำมาใช้ในการผลิตพลาสมาเย็น เนื่องจากคุณสมบัติที่ไม่ทำปฏิกิริยาเคมีง่ายและมีค่าพลังงานไอออไนเซชันต่ำ ทำให้ง่ายต่อการสร้างพลาสมาด้วยพลังงานต่ำ และยังสามารถควบคุมปริมาณและชนิดของสารที่

เกิดปฏิกิริยาได้ ทำให้เหมาะกับการใช้งานที่หลากหลาย เช่น การทำความสะอาดพื้นผิว การปรับปรุงคุณภาพอาหาร หรือการบำบัดทางการแพทย์ (Ling et al, 2014) มีรายงานการใช้พลาสมาเย็นเพื่อปรับปรุงเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสใน *Trichoderma viridae* (Xu et al, 2011) Sangwijit et al, (2016) ได้รายงานความสำเร็จในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น โดยสามารถสร้างแบคทีเรียพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าชุดควบคุม และรายงานการใช้เทคโนโลยีพลาสมาเพื่อปรับปรุงการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสใน *B. subtilis* (Ma et al, 2016) นอกจากนี้ Laksuk et al, (2019) ได้ศึกษากลไกการเกิดการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคพลาสมา โดยการนำดีเอ็นเอเปลือยมาอาบพลาสมาด้วยเทคโนโลยีพลาสมาความดันบรรยากาศ ผลการศึกษาพบว่า การอาบดีเอ็นเอเปลือยด้วยพลาสมาอาร์กอนและฮีเลียมชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ โดยพบว่าเงื่อนไขที่อาบพลาสมาอาร์กอน เป็นเวลา 15 นาที ชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์ (insertion) และการแทนที่คู่เบส (substitution) มากที่สุดและมีงานวิจัยได้ระบุว่าพลาสมาความดันบรรยากาศ เป็นเทคนิคทางเลือกสำหรับการพัฒนาเอนไซม์ต่าง ๆ (Pankaj and Keener, 2017) จากนั้นมีการทดลองการทำการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคพลาสมาความดันบรรยากาศพบว่าการกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ดีขึ้นถึง 4 เท่า (Polsa et al, 2020)

3. กลไกการกลายพันธุ์ด้วยพลาสมาเย็น

การสร้างสภาวะพลาสมาที่มีอุณหภูมิต่ำหรือที่เรียกว่า cold plasma เป็นกระบวนการที่สามารถสร้างอนุมูลอิสระ เช่น Reactive Oxygen Species (ROS) ซึ่งเป็นสารออกซิแดนท์ที่มีความสามารถสูงในการทำปฏิกิริยาเคมีกับโมเลกุลชีวภาพภายในเซลล์ โดย ROS เหล่านี้สามารถทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลสำคัญ ได้แก่ DNA, โปรตีน, ไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ และองค์ประกอบภายในอื่น ๆ ได้นอกจากนี้ อนุมูลอิสระยังมีความสามารถในการแทรกซึมเข้าสู่ไซโตพลาสซึม ซึ่งเป็นบริเวณที่ประกอบไปด้วยออร์แกเนลล์หลายชนิด เช่น ไมโทคอนเดรีย ไรโบโซม และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม เมื่อ ROS เข้าไปทำลายองค์ประกอบเหล่านี้ จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการสร้างพลังงาน การสังเคราะห์โปรตีน และการรักษาสมดุลภายในเซลล์ ซึ่งอาจนำไปสู่ความเสียหายอย่างรุนแรง และในที่สุดส่งผลให้เซลล์เข้าสู่ภาวะการณตายของเซลล์ (Kaur et al, 2024)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องแก้ว ได้แก่

บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 100, 250 มิลลิลิตร
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
หลอดหยดสาร (dropper)
แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
หลอดหยดสาร (dropper)
คิวเวทท์ (cuvette)

วัสดุพลาสติก ได้แก่

ไมโครปิเปตต์ทิป (micropipette tip) ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร
หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
ขวดน้ำกลั่น (wash bottle)
ตะแกรงใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge rack)
ช้อนตักสารพลาสติก (dispensing spoons)
หลอดพีซีอาร์ (PCR tube)

อุปกรณ์โลหะและอุปกรณ์สแตนเลส ได้แก่

ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (test tube rack)
ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
เข็มตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol burner)

ช้อนตักสารสแตนเลส (stainless spatula)

ปากคีบ (forceps)

มีดผ่าตัด (scalpel)

วัสดุสิ้นเปลือง ได้แก่

กระดาษชั่งสาร (weighing paper)

กระดาษทิชชู (tissue paper)

อลูมิเนียมฟอยล์ (aluminum foil)

ถุงมือยาง (rubber gloves)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่

ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 0.5-10 ไมโครลิตร, ขนาด 10-100

ไมโครลิตร และขนาด 100-1000 ไมโครลิตร

ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

ตู้ดูดควันไอสารเคมี (fume hood)

ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow)

ตู้น้ำเชื้อ (incubator)

ตู้น้ำเชื้อพร้อมเครื่องเขย่าสาร (incubator shaker)

เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิความเร็วรอบสูง (high speed refrigerated centrifuge)

เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

เครื่องชั่งดิจิตอล (digital balance)

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

เตาไมโครเวฟ (microwave)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่

70 % เอทานอล (70 % Ethanol)

น้ำกลั่น (distilled water)

1 % iodine solution

1 % starch solution

1 % colloidal chitin

phosphate buffer 50 mM (pH 6.5)

phosphate buffer 0.1 M (pH 7)
 phosphate buffer 0.2 M (pH 6.5)
 sterilized skim milk (10 %)
 DNS reagent
 0.1 M Na₂CO₃
 0.5 M Na₂CO₃
 Folin ciocalteu reagent
 1 M NaCl

วิธีดำเนินการงานวิจัย

แบคทีเรียปฏิปักษ์ และเชื้อราก่อโรคที่ใช้งานวิจัย

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 และเชื้อราก่อโรคผลเน่าในอะโวคาโด *Fusarium* spp. ได้รับความความอนุเคราะห์จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิศวกรรมพลาสมาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

การประเมินประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Fusarium* spp. ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80

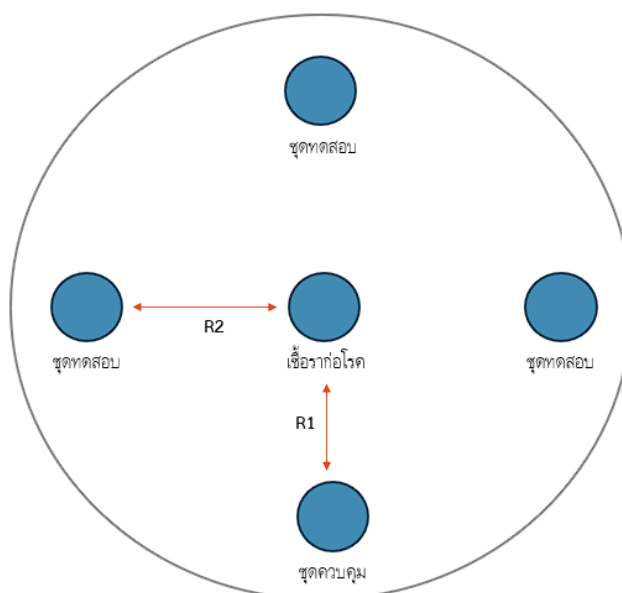
การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium* spp. จะทดสอบโดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน และแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 ที่ใช้ทดสอบจะเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับค่าการดูดกลืนแสงให้ได้เท่ากับ 1.0 จากนั้นทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุของโรคผลเน่าในอะโวคาโด โดยนำกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อวางไว้บนอาหาร PDA โดยมีระยะห่างจากจุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.5 เซนติเมตร หยดแบคทีเรีย 10 ไมโครลิตร จากนั้นวางชิ้นวุ้นเชื้อรา *Fusarium* spp. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ดังภาพที่ 3 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และวัดรัศมีของเชื้อราด้านทดสอบและด้านควบคุม

หลังจากการบ่ม 7 และ 14 วัน นำค่าที่ได้มาคำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (percent inhibition of radial growth: PIRG) Avendaño et al, (2017) จากสูตร

$$\text{ร้อยละการยับยั้งเจริญของเชื้อราก่อโรค (\%)} = [(R1-R2) / R1] \times 100$$

เมื่อ R1 คือรัศมีโคโลนีของเชื้อราด้านชุดควบคุม

R2 คือรัศมีโคโลนีของเชื้อราด้านชุดทดสอบ



ภาพ 3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี dual culture
ดัดแปลงจาก Avendaño et al, (2018)

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น

การเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย

นำโคโลนีเดี่ยว *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 ที่เจริญบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใหม่เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำสารแขวนลอยที่ได้ไปวัดความขุ่นด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นนำสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงในหลอดทดลองขนาด 100 ไมโครลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำไปผ่านเงื่อนไขอาบพลาสมาในขั้นต่อไป

การชักนำเกิดพันธุ์กลายของแบคทีเรียด้วยพลาสมา

แบคทีเรียถูกอาบด้วยพลาสมาอาร์กอน และฮีเลียม โดยแบ่งระยะเวลาออกเป็น 4 เงื่อนไข ได้แก่ 1, 2, 3 และ 5 นาที ความต่างศักย์ในการกำเนิดพลาสมา 85 โวลต์ อัตราการไหลของแก๊ส 2 ลิตรต่อนาที จากนั้นนำแบคทีเรียในหลอดทดลอง ที่ผ่านการอาบพลาสมาแต่ละเงื่อนไข และแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการระดมยิงพลาสมา ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-2} และ 10^{-3} และดูดสารละลายเชื้อที่เจือจางแล้ว 100 ไมโครลิตร นำมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคัดเลือกพันธุ์กลายเพื่อนำไปทดสอบต่อไป จากนั้นหาอัตราการรอดชีวิตจากสูตร (Polsa et al, 2020)

$$\text{อัตราการรอดชีวิต (\%)} = [(R_0 - R_T) / R_0] \times 100$$

R_T = แบคทีเรียที่ถูกอาบพลาสมา

R_0 = แบคทีเรียที่ไม่ได้ถูกอาบพลาสมา

การคัดเลือกแบคทีเรียพันธุ์กลายโดยการประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* spp. ของแบคทีเรียพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียพันธุ์กลายเบื้องต้น นำแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) และพันธุ์กลายของทั้ง 2 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุของโรคผลเน่าในอะโวคาโด โดยนำกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อวางไว้บนอาหาร PDA โดยมีระยะห่างจากจุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.5 เซนติเมตร หยดแบคทีเรีย *B. subtilis* (สายพันธุ์ดั้งเดิม) และพันธุ์กลาย จากนั้นวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *Fusarium* spp. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นคำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (percent inhibition of radial growth: PIRG) (Kabir et al, 2012)

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) และพันธุ์กลายที่คัดเลือก มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความชื้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ค่าเท่ากับ 1.00 จากนั้นทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุของโรคมลเน่าในอะโวคาโด โดยนำกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อวางไว้บนอาหาร PDA โดยมีระยะห่างจากจุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2.5 เซนติเมตร จากนั้นหยดแบคทีเรีย *B. subtilis* (สายพันธุ์ดั้งเดิม) และพันธุ์กลาย จากนั้นวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *Fusarium* spp. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลโดยการวัดรัศมีของเชื้อราด้านทดสอบและด้านควบคุมในวันที่ 7 และ 14 วันหลังการเพาะเลี้ยง และนำค่าที่ได้มาคำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (percent inhibition of radial growth: PIRG) (Kabir et al, 2012) จากนั้นเขียนเส้นใยของเชื้อรา นำมาตรวจสอบลักษณะเส้นใยของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดสอบการควบคุมโรคมลเน่าในผลอะโวคาโดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ถูกเลือก

ทำความสะอาดผลอะโวคาโดสายพันธุ์แฮสที่มีระดับความสุกใกล้เคียงกัน และฆ่าเชื้อบริเวณผิวอะโวคาโดด้วยวิธี surface sterile จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของ *Fusarium* spp. (spore suspension) ความเข้มข้นประมาณ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และสารแขวนลอยแบคทีเรีย (bacterial suspension) ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 จากนั้นใช้เข็มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะทำให้เกิดบาดแผลบนผลอะโวคาโด 2 ตำแหน่ง (ซ้ายและขวา) ตำแหน่งละ 5 จุด โดยที่แต่ละจุดมีความลึก 3 มิลลิเมตร จากนั้นหยดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนตำแหน่งซ้าย จากนั้นบ่มไว้ในกล่องพลาสติกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในทั้งตำแหน่งซ้ายและขวา ส่วน Control หยดน้ำกลั่นแทนแบคทีเรีย จากนั้นบ่มในกล่องพลาสติกเป็นเวลา 6 วัน ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ ในแต่ละไฮโซเลต เมื่อครบกำหนดวันทดสอบผ่าผลอะโวคาโดบริเวณที่ปลูกเชื้อเพื่อวัดความยาวของบาดแผลทั้งด้านที่หยดแบคทีเรียปฏิปักษ์และชุดควบคุม จากนั้นประเมินความเสียหายจากสูตร

$$\text{ประสิทธิภาพการควบคุม \%} = [(D1-D2) / D1] \times 100$$

D1 = ความยาวที่แสดงอาการของโรค

D2 = ความยาวบริเวณของโรค (ควบคุม)

การประเมินความสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส ไคติเนส และโปรติเอส ของแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลายเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เกี่ยวข้องควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรค

การประเมินกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส และอะไมเลส

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับค่าความขุ่นด้วยการปรับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 1.0 จากนั้นนำสารแขวนลอยของแบคทีเรียมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำเอนไซม์หยابที่ได้ของแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาเติมลงในหลอดทดลองที่มีสารตั้งต้น 1% starch solution (w/v) สำหรับทดสอบกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส และสารตั้งต้น 1% CMC สำหรับทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงมีความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที 1 นาที ดูดส่วนใสด้านบน ปริมาตร 300 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่เตรียมใหม่ แล้วเติมสารละลาย DNS 300 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลที่ถูกรีดิวซ์วัดที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรและวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford's method เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์

การประเมินกิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์โปรติเอส

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 และพันธุ์กลาย มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับค่าความขุ่นด้วยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 1.0 จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำเอนไซม์หยابของแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือก ปริมาตร 45 ไมโครลิตรมาเติมลงในหลอดทดลองที่มีสารตั้งต้น 0.65% casein solution (w/v) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที เติมสาร TCA 10% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงมีความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที 1 นาที ดูดส่วนใสด้านบน ปริมาตร 250 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่เตรียมใหม่ แล้วเติมสารละลาย 0.5 M Na_2CO_3 และ Folin ciocalteu reagent บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford's method เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์

การประเมินกิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* ASA80 และพันธุ์กลาย มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับค่าความขุ่นด้วยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 1.0 จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำสารตั้งต้น 1% colloidal chitin (w/v) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรและ phosphate buffer 0.2 M (pH6.5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาเติมลงในหลอดทดลองและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์หยาบของแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองข้างต้นและบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที 1 นาที ดูดส่วนใสด้านบน ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เติมน้ำยังหลอดทดลองที่เตรียมไว้ใหม่แล้วเติมสารละลาย DNS 300 ไมโครลิตร จากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลที่ถูกรีดิวซ์ วัดที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford's method เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน Chitinase Polysaccharide Deacetylase C (PdaC) และ Chitosanase จากแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนทั้ง 3 ยีน

ออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้จำเพาะกับบริเวณอนุรักษ์ของยีนทั้ง 3 ยีน ซึ่งเกี่ยวข้องการควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรค โดยออกแบบไพรเมอร์จากยีน Chitinase, PdaC และ Chitosanase จากแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่สืบค้นจาก Genbank เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มเส้นของยีน

เพิ่มปริมาณยีน PdaC และ chitosanase โดยใช้เทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 สายพันธุ์ดั้งเดิม และแบคทีเรียกลายพันธุ์เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับการโคลนยีน โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

ไพรเมอร์สำหรับยีน Chitinase	forward primer	5'- AGCGGCTGGAGGCGGCTATACGGC-3'
	reversed primer	5'-CTAAACTAAGCTCGCAACACTGC-3'
ไพรเมอร์สำหรับยีน PdaC	forward primer	5'-TAGCAGTTGTATGTGTGGTGG-3'
	reversed primer	5'-CGGCAAGTATTCAGGACCAA-3'
ไพรเมอร์สำหรับยีน Chitosanase	forward primer	5'-TGAGAGGGGCTAAGGCTGAT-3'
	reversed primer	5'-GCAGCGGTTTCTTTTCCTCAC-3'

โดยใช้ชุด taq KOD Neo plus มีขั้นตอนตามตาราง 1 ดังนี้

ตาราง 1 ขั้นตอนและอุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Pre-dennaturation	94	2
Denaturation	94	0.15
Annealing	68	30
Extention	68	1

จำนวน 34 รอบ นำไปตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นเจล 1.5% จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Kit PrimeWay Gel Extraction/PCR Purification

เตรียม competent cell

เลี้ยง *Escherichia coli* DH5 α ในอาหารเหลว LB บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB ในขวดรูปชมพู่ 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงหรือวัดค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.4 จากนั้นแขวนขวดรูปชมพู่ในถังน้ำแข็ง 30 นาที นำไปแบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1,400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและเติม Calcium chloride (CaCl₂) เย็นจัด 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบ/นาที ที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใส่ทิ้งและเติม 15% glycerol ที่ละลายใน CaCl_2 50 ไมโครลิตร

โคลนยีน PdaC และ chitosanase

นำผลิตภัณฑ์ PCR มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pJet 1.2 blunt โดยใช้ชุดทดสอบ CloneJET PCR Cloning Kit ถ่ายโอน DNA เข้าสู่ competent cell จากนั้นแช่น้ำอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และนำกลับมาแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว LB 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง LB ที่ประกอบด้วย Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด จากนั้นคัดเลือกโคโลนีมาเลี้ยงในอาหาร LB-Ampicillin บ่ม 24 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด Kit TIANGEN ใช้ Enzyme cutting *XhoI* และ *NcoI* ตามตาราง 2

ตาราง 2 ส่วนผสมของสารเคมีในขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สาร	ความเข้มข้น
10x Buffer	1 เท่า
<i>XhoI</i>	0.5 ยูนิต
<i>NcoI</i>	0.5 ยูนิต
Vector	1 ไมโครกรัม
dH_2O	เติมน้ำให้ได้ปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดและดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของเจล 1.5 %

เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของยีน PdaC และ chitosanase

ระหว่าง *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลาย และสายพันธุ์ดั้งเดิม

นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ส่งมาตรวจสอบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) จากนั้นนำลำดับ

นิวคลีโอไทด์แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>) และหาความแตกต่าง Multiple Sequence Alignment ด้วยโปรแกรม clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) เพื่อหาความแตกต่าง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละการทดสอบ ผ่านโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ โดยใช้ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

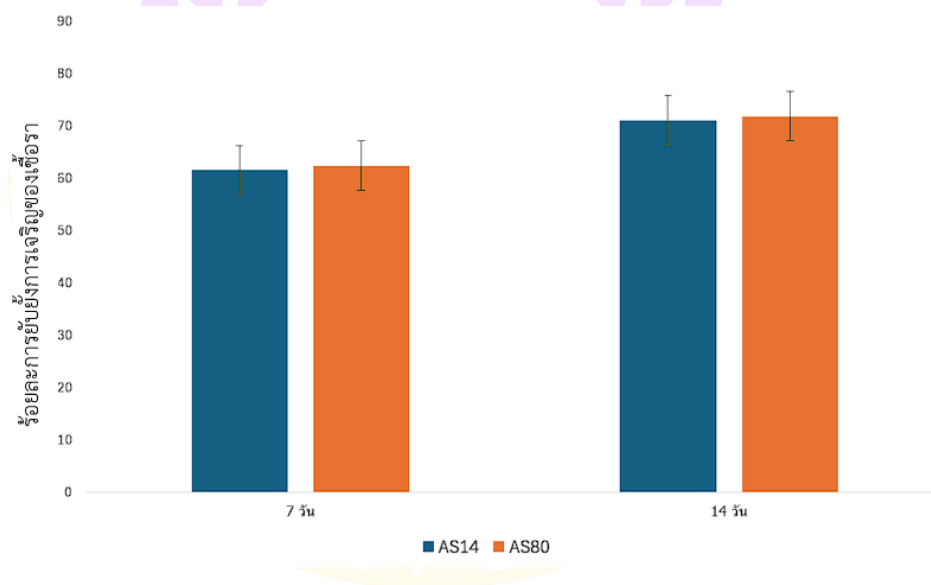


บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

ผลการประเมินประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Fusarium* spp. ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80

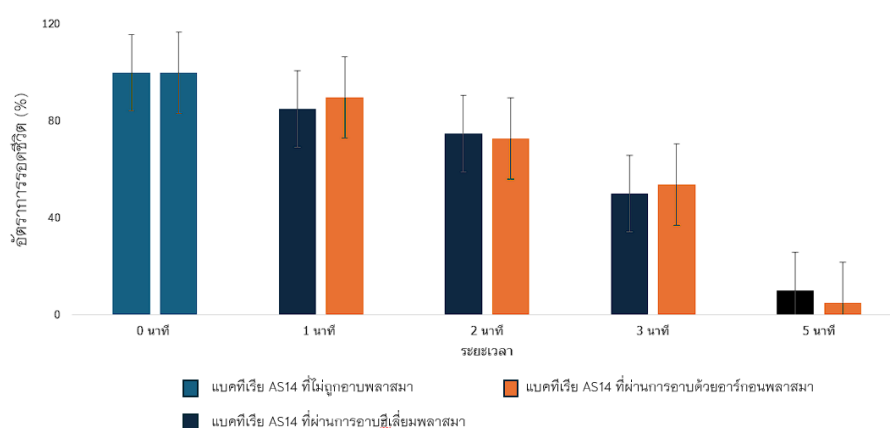
แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ความเป็นเลิศชีววิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับการประเมินความสามารถในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Fusarium* spp. ด้วยเทคนิค dual culture พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรค *Fusarium* spp. ได้ 71.11 และ 71.85 % ตามลำดับ ดังภาพ 4



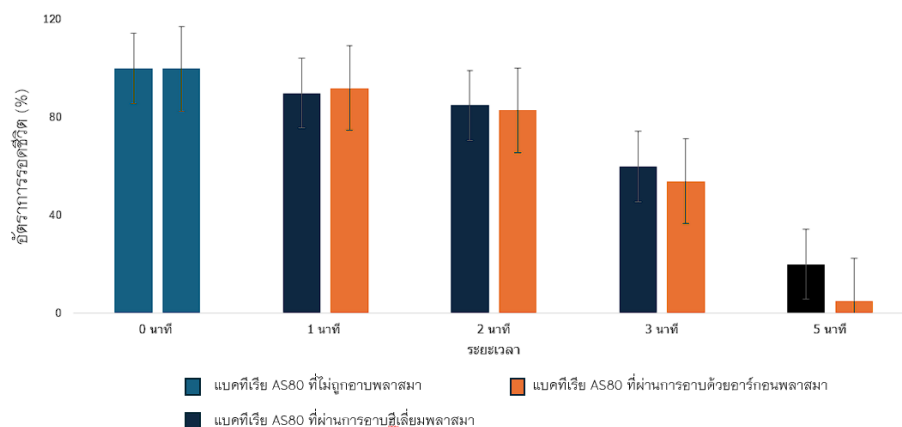
ภาพ 4 ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคของ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 เป็นเวลา 7 และ 14 วัน

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ของแบคทีเรีย *B. subtilis* AS14 และ AS80 ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น

จากการนำ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็นภายใต้เงื่อนไขการอาบด้วยพลาสมาของก๊าซอาร์กอนและฮีเลียมเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 5 นาที และตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ถูกอาบพลาสมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ถูกอาบด้วยพลาสมา) พบว่าอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ จะมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการอาบพลาสมา และพบอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ถูกอาบด้วยฮีเลียมพลาสมาสูงกว่าอาร์กอนพลาสมาเมื่อให้ระยะเวลา 5 นาที ดังภาพ 5 และ 6 โดยพบแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 ที่รอดชีวิตทั้งหมดทุกเงื่อนไข 289 ไอโซเลท และ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS80 รอดชีวิตทั้งหมด 292 ไอโซเลท



ภาพ 5 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 ภายหลังถูกอาบด้วยพลาสมาของอาร์กอน และฮีเลียม เป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 5 นาที



ภาพ 6 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AS80 ภายหลังถูกอาบด้วยพลาสมาของอาร์กอน และฮีเลียม เป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 5 นาที

การประเมินความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* spp. ของแบคทีเรีย *B. subtilis* AS14 และ AS80 ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

นำแบคทีเรียที่ *B. subtilis* AS14 และ AS80 ที่รอดชีวิตจากการอาบพลาสมาทุกเงื่อนไขจำนวน 581 ไอโซเลท มาทดสอบการประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* spp. เบื้องต้น ด้วยเทคนิค dual culture พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* AS14 พันธุ์กลาย (*B. subtilis* AS14MT) ทั้ง 289 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยมีประสิทธิภาพการยับยั้งในช่วง 61-80% สำหรับ *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลาย (*B. subtilis* AS80 MT) พบไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม จำนวน 4 ไอโซเลทโดยมีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงกว่า 80% และพบ 3 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราน้อยกว่า 20% ซึ่งมี 1 ไอโซเลทที่สูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังตารางที่ 3

ตาราง 3 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคของแบคทีเรีย *B. subtilis* AS14 และ AS80 ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

ไอโซเลต	ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค (จำนวนไอโซเลต)				
	0 - 20	21 - 40	41 - 60	61-80	80 - 100
<i>B. subtilis</i> AS14	-	-	-	1	-
<i>B. subtilis</i> AS14 MT	-	-	-	289	-
<i>B. subtilis</i> AS80	-	-	-	1	-
<i>B. subtilis</i> AS80 MT	3	2	-	283	4

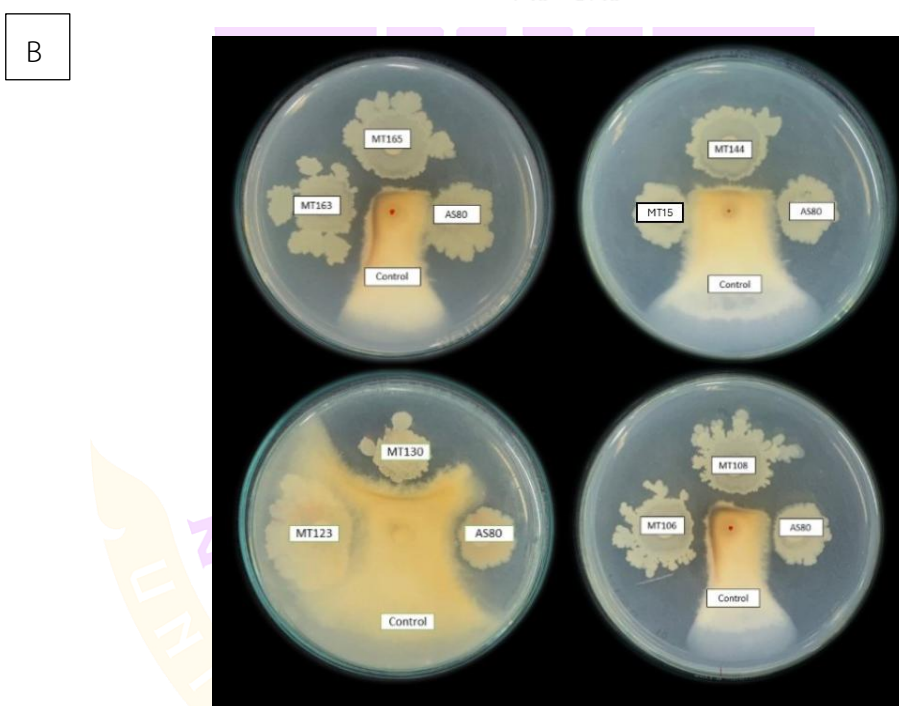
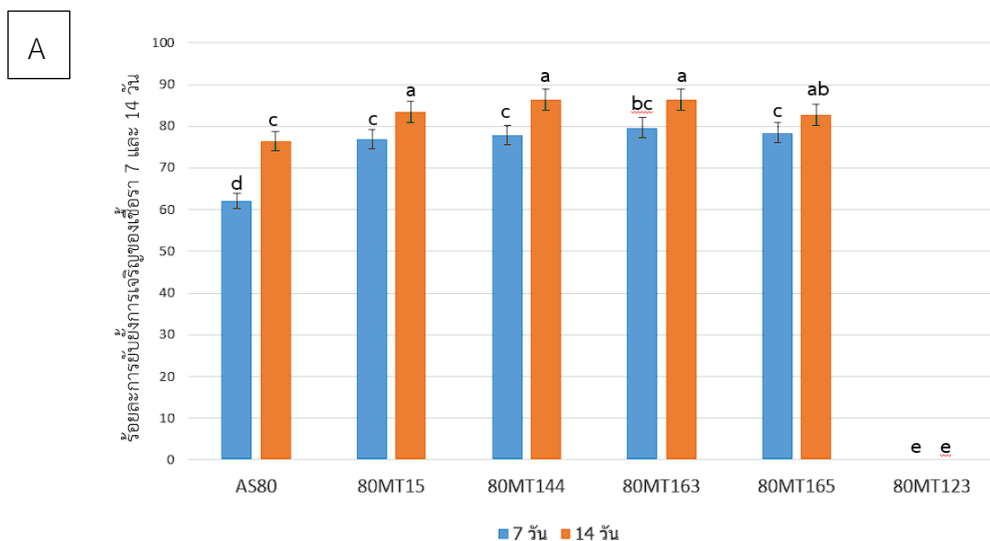
การประเมินความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* spp. ของแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลายที่ถูกคัดเลือกเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

นำแบคทีเรียพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ 80MT15, 80MT144, 80MT163 และ 80MT165 และพันธุ์กลายที่สูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 80MT123 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้เท่ากัน โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้เท่ากับ 1.0 และนำสารละลายแขวนลอยของแบคทีเรียมาประเมินความสามารถในการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *Fusarium* spp. ด้วยวิธี dual culture ไอโซเลตละ 3 ซ้ำ โดยตรวจสอบร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา หลังการบ่ม 7 และ 14 วัน จากการทดสอบพบว่า *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลาย ทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ 80MT15, 80MT144, 80MT163 และ 80MT165 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งเจริญของเชื้อราก่อโรคเท่ากับ 83.4%, 86.3%, 85.2% และ 82.8% ตามลำดับ ในขณะที่ *B. subtilis* AS80 สายพันธุ์ดั้งเดิม มีค่าร้อยละการยับยั้งเจริญของเชื้อราเท่ากับ 76.4% หลังการบ่มเพื่อเป็นเวลา 14 วัน นอกจากนี้พบว่า แบคทีเรียพันธุ์กลาย 80MT123 มีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราเท่ากับ 0 ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 7

ตาราง 4 ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคของแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลายที่ถูกคัดเลือกเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

แบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ยร้อยละการ	ค่าเฉลี่ยร้อยละการ
	ยับยั้งการเจริญของ	ยับยั้งการเจริญของ
	เชื้อรา (7วัน)	เชื้อรา (14วัน)
AS80	62.11 ± 1.26^d	76.38 ± 1.98^c
80MT15	77.02 ± 1.75^c	83.4 ± 1.01^a
80MT144	77.80 ± 2.75^c	86.3 ± 2.16^a
80MT163	79.63 ± 1.62^{bc}	86.3 ± 1.19^a
80MT165	78.45 ± 3.72^c	82.7 ± 2.39^{ab}
80MT123	0^e	0^e

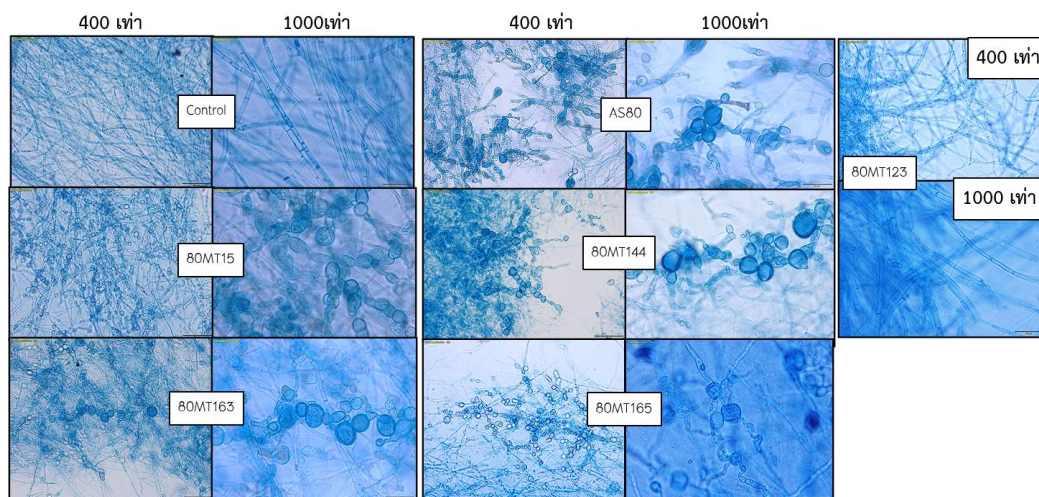
หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพ 7 ฤทธิ์การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 และพันธุ์กลายต่อเชื้อรา *Fusarium* spp. A. ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค B. การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ด้วยเทคนิค Dual culture 80MT15 80MT144 80MT163 80MT165 80MT123

จากนั้นนำเส้นใยของเชื้อรามาตรวจสอบลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเลนส์ประพทที่กำลังขยาย 400 เท่า และ 1000 เท่า พบว่าเส้นใยของเชื้อก่อโรคในบริเวณที่เจริญติดกับแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 และพันธุ์กลายทั้งหมดมีลักษณะผิดปกติ โดยพบลักษณะเส้นใยหัก

งอ บวม และปล้องของเส้นใยมีขนาดที่เล็กลง ในขณะที่บริเวณเส้นใยเชื้อราที่มีเชื้อแบคทีเรียพันธุ์กลาย 80MT123 หรือบริเวณที่ไม่ติดกับแบคทีเรียเส้นใยเชื้อราจะเป็นลักษณะตรงไม่เกิดความเสียหายต่อรูปร่างและลักษณะของเส้นใย (ภาพ 8)



ภาพ 8 ลักษณะของเส้นใยเชื้อรากลุ่ม *Fusarium* spp. ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี dual culture เป็นเวลา 14 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเลนส์ประกอบ ที่กำลังขยาย 400 และ 1000 เท่า

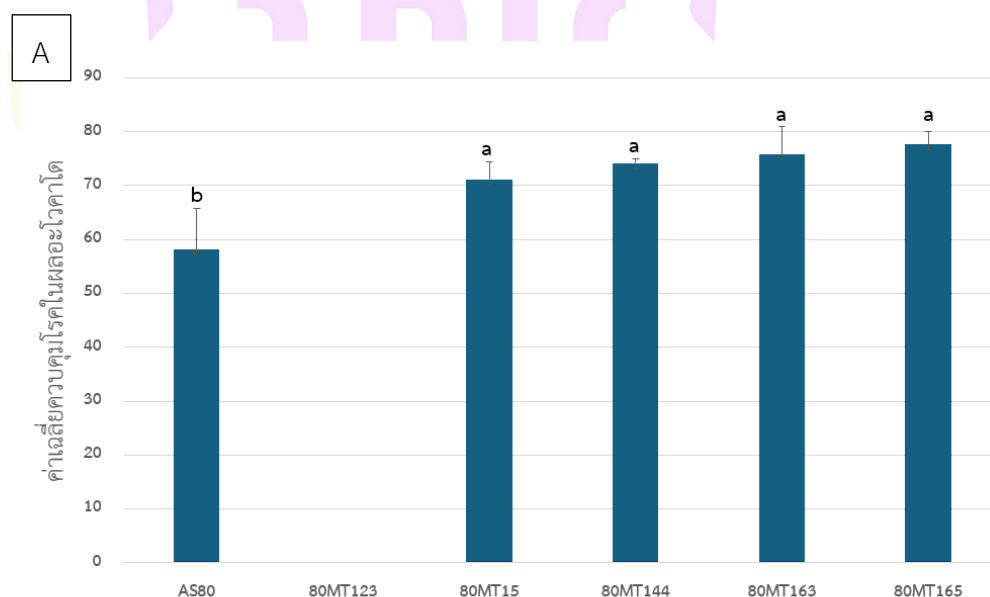
ผลการทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าในผลมะโวคาโตด้วยแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือก

จากการนำสารแขวนลอยของแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 และพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคผลเน่าของเชื้อรา *Fusarium* spp. บนผลมะโวคาโตหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลาย จำนวน 4 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการแสดงอาการของโรคผลเน่าได้ โดยแบคทีเรียที่ให้ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสูงที่สุดคือ 80MT165 ซึ่งสามารถยับยั้งการแสดงอาการของโรคได้สูงถึง 77.59% รองลงมาคือ 80MT163, 80MT144, และ 80MT15 โดยยับยั้งการแสดงอาการของโรคได้ 75.71%, 74.12% และ 71.15% ตามลำดับ โดยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลายมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรากลุ่ม *Fusarium* spp. ได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีค่าการยับยั้งที่ 58.1% และ 80MT123 ประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์เป็นศูนย์ ดังตาราง 5 และภาพ 9

ตาราง 5 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกในการควบคุมเชื้อราก่อโรค *Fusarium* spp. บนผลอะโวคาโด ในสภาพห้องปฏิบัติการ

แบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพในการควบคุมโรค
AS80	58.10 ± 7.65^b
80MT15	71.15 ± 3.33^a
80MT144	74.12 ± 0.75^a
80MT163	75.71 ± 5.2^a
80MT165	77.59 ± 2.5^a
80MT123	0^c

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)





ภาพ 9 การประเมินความสามารถในการควบคุมโรคผลเน่าในผลอะโวคาโดด้วยแบคทีเรีย

B. subtilis AS80 และแบคทีเรียพันธุ์กลายที่ถูกคัดเลือก

A. ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการแสดงอาการของโรคผลเน่าในผลอะโวคาโด

B. ลักษณะของผลอะโวคาโดหลังการทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าด้วยแบคทีเรีย

B. subtilis AS80 และแบคทีเรียพันธุ์กลาย

การประเมินกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรคของแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมโปรติเอส

ผลการประเมินกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการนำเอนไซม์หยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* AS80 และพันธุ์กลาย มาประเมินกิจกรรม ย่อยสารตั้งต้น 1% CMC ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมา ด้วยวิธี DNS method พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท 80MT144 มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด รองลงมา คือ 80MT163 และ 80MT15 โดยมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 96.49, 89.53 และ 83.8 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (*B. subtilis* AS80) มีกิจกรรมเท่ากับ 86.73 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนี้แบคทีเรียกลายพันธุ์ที่มีกิจกรรม

จำเพาะของเอนไซม์ที่ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ 80MT165 มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 74.45 หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน และ 80MT123 ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ตาราง 6)

ตาราง 6 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	กิจกรรมจำเพาะ เอนไซม์เซลลูเลส (หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน)
AS80	86.83 ± 7 ^b
80MT15	83.8 ± 4.88 ^b
80MT144	96.94 ± 4.33 ^a
80MT163	89.53 ± 0.95 ^{ab}
80MT165	74.45 ± 2.04 ^c
80MT123	0 ± 0 ^d

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ผลการประเมินกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส

จากการนำเอนไซม์หยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* AS80 และพันธุ์กลายมาประเมินกิจกรรม ย่อยสารตั้งต้น 1% starch solution ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมา พบว่าแบคทีเรียพันธุ์กลายมีกิจกรรมจำเพาะเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยแบคทีเรียพันธุ์กลายไอโซเลท 80MT144 มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ 80MT123, 80MT15, 80MT165 และ 80MT163 โดยมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 181.88, 150.26, 133.00, 131, และ 124.5 หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (*B. subtilis* AS80) มีค่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์เท่ากับ 86.83 หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน (ตาราง 7)

ตาราง 7 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	กิจกรรมจำเพาะ เอนไซม์อะไมเลส (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
AS80	98.12 ± 5.08 ^d
80MT15	133.99 ± 8.38 ^{b c}
80MT144	181.88 ± 4.33 ^a
80MT163	124.5 ± 6.82 ^c
80MT165	131 ± 1.75 ^c
80MT123	150.26 ± 18 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ผลการประเมินกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส

จากการนำเอนไซม์หยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* AS80 และพันธุ์กลายมาประเมินกิจกรรม ย่อยสารตั้งต้น 1% colloidal chitin ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมา พบว่าแบคทีเรียพันธุ์กลายมีกิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ไคติเนสสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยแบคทีเรียพันธุ์กลายไอโซเลท 80MT144 มีค่าสูงที่สุด รองลงมา คือ 80MT165, 80MT163, 80MT15 โดยมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 46.10, 31.13, 28.89 และ 23.55 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (*B. subtilis* AS80) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 14.81 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนี้เชื้อพันธุ์กลาย 80MT123 ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส (ตาราง 8)

ตาราง 8 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	กิจกรรมจำเพาะ เอนไซม์ไคติเนส (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
AS80	14.81 ± 3.55 ^d
80MT15	23.55 ± 3.71 ^c
80MT144	46.1 ± 1.84 ^a
80MT163	28.89 ± 2.2 ^b
80MT165	31.13 ± 1.56 ^b
80MT123	0 ± 0 ^e

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ผลการประเมินกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส

จากการนำเอนไซม์หยาบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* AS80 และพันธุ์กลายมาประเมินกิจกรรม ย่อยสารตั้งต้น 0.65% casein solution ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมา พบว่าแบคทีเรียพันธุ์กลายมีกิจกรรมจำเพาะเอนไซม์โปรติเอสมีเพียงแค่ 2 ไอโซเลท ได้แก่ 80MT15 และ 80MT144 มีค่ากิจกรรม เท่ากับ 0.165 และ 0.135 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (*B. subtilis* AS80) ไม่พบค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (ตาราง 9)

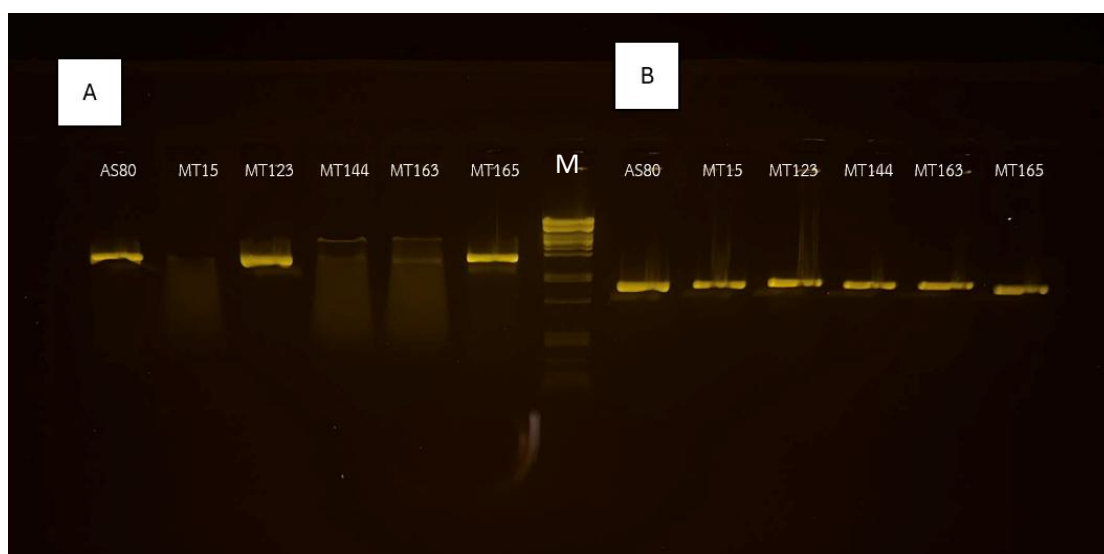
ตาราง 9 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	กิจกรรมจำเพาะ เอนไซม์โปรติเอส (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)
AS80	0 ± 0^b
80MT15	0.165 ± 0.01^a
80MT144	0.135 ± 0.01^a
80MT163	0 ± 0^b
80MT165	0 ± 0^b
80MT123	0 ± 0^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Polysaccharide Deacetylase C (PdaC) และ Chitosanase จากแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

จากผลการทดสอบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่าเอนไซม์ไคติเนสน่าจะเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา จึงมุ่งศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา จึงนำ Genomic DNA ของแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 และพันธุ์กลาย มาเพิ่มปริมาณยีน PdaC และ chitosanase ด้วยเทคนิค PCR พบว่าขนาดยีนของ PdaC มีขนาด 1461 (ภาพ 10A) และ ยีน chitosanase มีขนาด 1015 คู่เบส (ภาพ 10B) เนื่องจากแบคทีเรียพันธุ์กลายไอโซเลท 80MT144 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนสสูงที่สุดจึงถูกคัดเลือกมาศึกษาความเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยโคลนชิ้นส่วนของยีนเชื่อมกับ เวกเตอร์ pJet 1.2 blunt และส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α



ภาพ 10 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ
Marker Lambda/Pst I

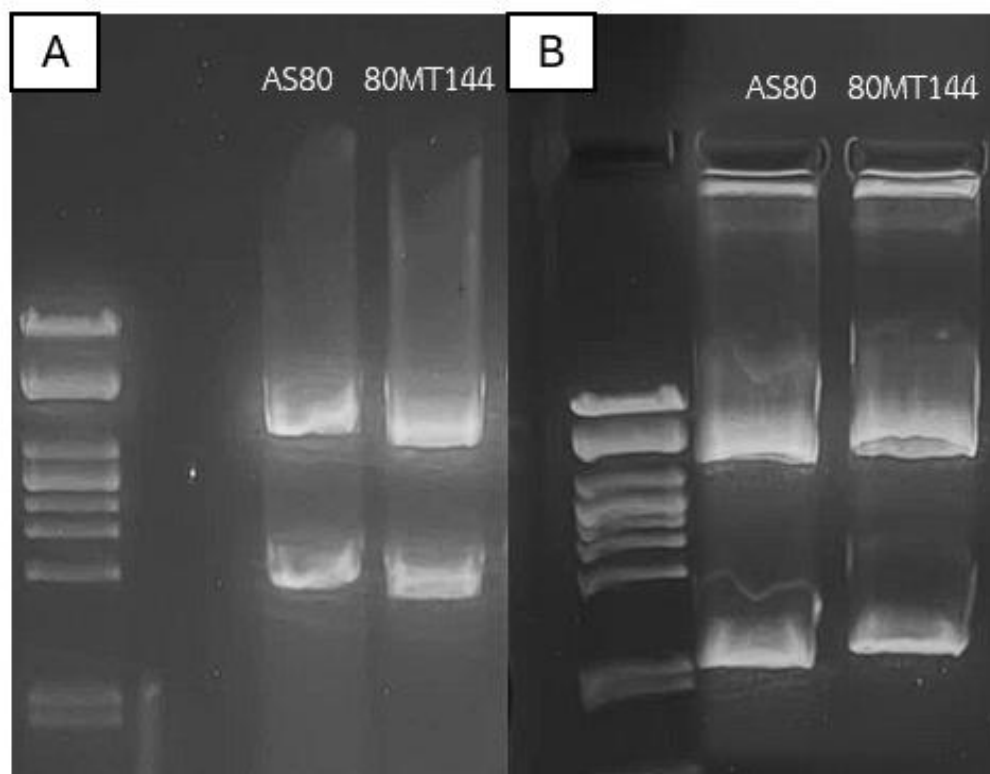
A. ยีน Polysaccharide Deacetylase C (PdaC)

B. ยีน chitosanase ใช้ DNA

การโคลนยีน PdaC และ Chitosanase เข้าสู่พลาสมิด pJet 1.2 blunt และ ถ่ายโอนเวกเตอร์
สายผสมเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

ทำการเชื่อมต่อยีนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน PdaC และ chitosanase ของสายพันธุ์
ดั้งเดิม(*B. subtilis* AS80) และ 80MT144 ด้วยเทคนิค PCR เข้ากับเวกเตอร์ pJet 1.2 blunt
จากนั้นส่งถ่ายเข้าสู่ *E. coli* DH5 α บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน พบ โคโลนีของ
แบคทีเรีย จำนวน 4 โคโลนี เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่ประกอบไปด้วย Ampicillin 100 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 4 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม ampicillin บ่มที่
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน และสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปตรวจสอบการเชื่อมต่อของยีน
กับเวกเตอร์

โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I และ *Nco*I พบว่ามีการเชื่อมต่อของยีนที่ถูกต้อง ผล
จากการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะเวกเตอร์ที่มียีน PdaC ได้ขนาดของเวกเตอร์ที่ 2974 คู่เบส และขนาด
ยีน 1461 คู่เบส (ภาพ 11A) และผลจากการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะเวกเตอร์ที่มียีน Chitosanase ได้
ขนาดของเวกเตอร์ที่ 2974 คู่เบส และขนาด 1015 คู่เบส (ภาพ 11B)



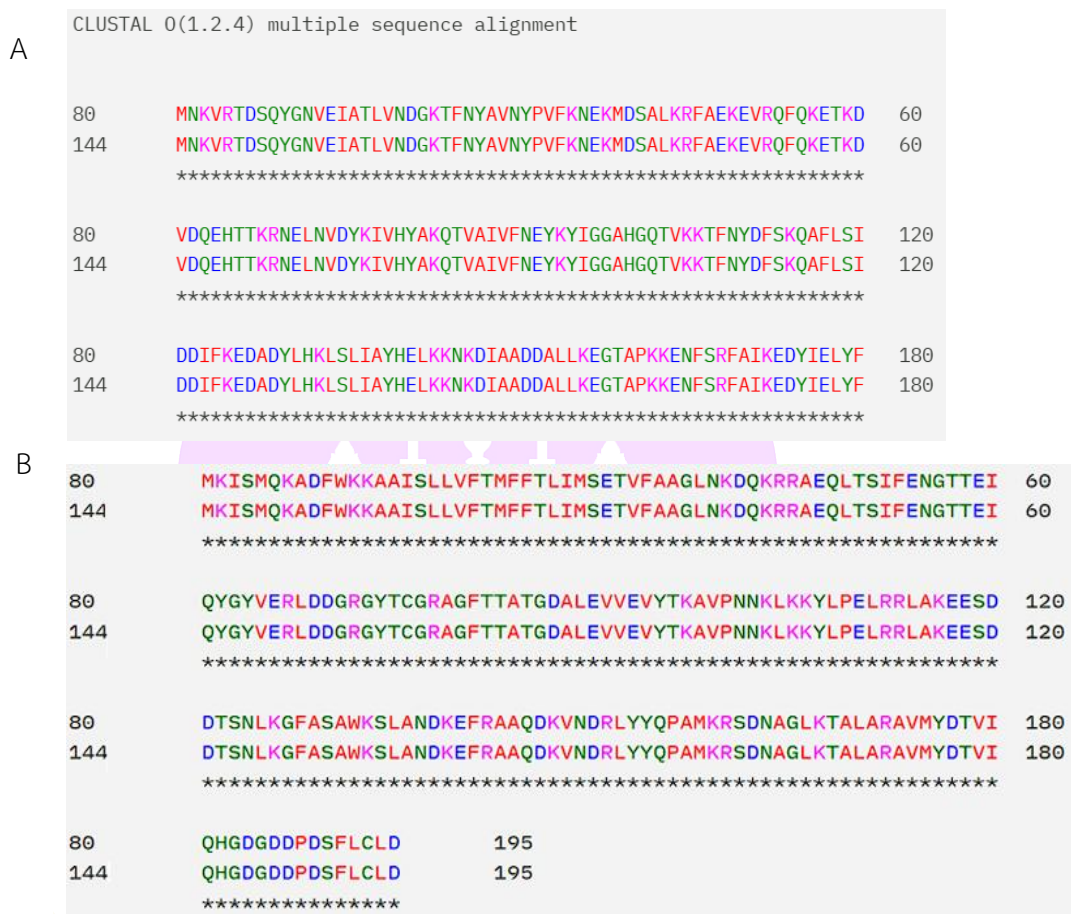
ภาพ 11 ผลการตัดเชื้อการส่งถ่ายเวกเตอร์ลูกผสมที่มียีน PdaC และ Chitosanase เข้าสู่ *E. coli* DH5 α

A. ผลจากการตัดเวกเตอร์สายผสมที่มียีน PdaC

B. ผลจากการตัดเวกเตอร์สายผสมที่มียีน Chitosanase

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน PdaC และ Chitosanase จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิม (*B. subtilis* AS80) และพันธุ์กลาย 80MT144

เมื่อนำเวกเตอร์ที่มียีน PdaC ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ PdaC ที่ได้จากแบคทีเรียพันธุ์กลาย 80MT144 ไม่มีความแตกต่างกับลำดับกรดอะมิโนของ PdaC ที่ได้จากสายพันธุ์ดั้งเดิม (ภาพ 12A) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ Chitosanase จากแบคทีเรียพันธุ์กลาย 80MT144 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในลำดับกรดอะมิโน (ภาพ 12B)



ภาพ 12 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน PdaC และ Chitosanase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม (*B. subtilis* AS80) และพันธุ์กลาย 80MT144

A. ผลการเปรียบเทียบ Alignment ลำดับกรดอะมิโนของยีน PdaC

B. ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Chitosanase

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยครั้งนี้พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคผลเน่าในอะโวคาโด (*Fusarium* spp.) ได้ โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture เท่ากับ 71.11% และ 71.85% เมื่อบ่มเป็นเวลา 14 วัน และเทคนิคพลาสมาเย็นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 ได้ โดยพบแบคทีเรียพันธุ์กลาย จำนวน 4 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ได้แก่ 80MT15, 80MT144, 80MT163 และ 80MT165 แสดงฤทธิ์เป็นปฏิปักษ์ด้านเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญ โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อราได้ 83.4%, 86.3%, 85.2% และ 82.8% ตามลำดับ และพบ 1 ไอโซเลทที่สูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา คือ ไอโซเลท 80MT123 และจากการนำเส้นใยของเชื้อรามาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 400 เท่า และ 1,000 เท่า พบว่าเส้นใยของเชื้อราในบริเวณที่ติดกับแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 และแบคทีเรียกลายพันธุ์ 80MT15, 80MT144, 80MT163 และ 80MT165 ทำให้เกิดความผิดปกติของเส้นใย โดยเส้นใยหักงอ บวม และปล้องของเส้นใยมีขนาดเล็กลง ในขณะที่บริเวณเส้นใยเชื้อราที่ติดกับแบคทีเรียพันธุ์กลาย 80MT123 หรือด้านควบคุมที่ไม่ติดกับแบคทีเรียจะไม่เกิดความเสียหายต่อรูปร่างและลักษณะของเส้นใย นอกจากนี้ผลของการประเมินความสามารถในการควบคุมโรคผลเน่าของอะโวคาโด อะโวคาโดหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลายสามารถยับยั้งการพัฒนาของเชื้อราก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดย 80MT165 มีค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสูงที่สุด รองลงมาคือ , 80MT163, 80MT144 และ 80MT15 โดยยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อราได้บนผลอะโวคาโดอะโวคาโดได้เท่ากับ 77.59%, 75.71%, 74.12% และ 71.15% ตามลำดับ และจากการตรวจสอบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เซลลูเลส อะไมเลส ไคติเนส และโปรตีเอส พบว่าเอนไซม์ที่สำคัญของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้แก่ เอนไซม์

ไคติเนส และเอนไซม์เซลลูเลส แต่จากการตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนของยีน PdaC และ Chitosanase พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากแบคทีเรียพันธุ์กลาย 80MT144 ไม่มีความแตกต่างจากที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นในการศึกษาในอนาคตจึงควรศึกษายีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์กลุ่มนี้ และศึกษาถึงกลไกอื่นในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราก่อโรค

อภิปรายผลการวิจัย

จากการประเมินความสามารถในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยเทคนิค dual culture พบว่า *B. subtilis* AS14 และ AS80 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นอะโวคาโด สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรค *Fusarium* spp. ได้สูงถึง 71.11% และ 71.85% เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยในการใช้ *Trichoderma* spp. ส่งผลอย่างมากต่อผนังเซลล์ของเชื้อรา *S. rolfsii* และ *R. solani* โดยตามรายงานของ El-Katatny et al, (2000) ระบุว่า *T. harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. rolfsii* ได้อย่างมีนัยสำคัญ สูงถึง 61.8% ดังนั้น *B. subtilis* AS14 และ AS80 ที่ได้จากการวิจัยนี้จึงมีศักยภาพในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถนำไปใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ควบคุมโรคพืชจากเชื้อราที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kachhawa, 2017 ระบุว่า *B. subtilis* ได้รับการยอมรับอย่างสูงว่าเป็นสารควบคุมทางชีวภาพได้

จากการชักนำเกิดการกลายพันธุ์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ AS14 และ AS80 ด้วยเทคนิคพลาสมาเย็น พบว่าอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ถูกอาบด้วยอาร์กอนพลาสมามีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่าฮีเลียมพลาสมา ซึ่งแตกต่างจาก Sangwijit et al, 2015 ที่พบว่าฮีเลียมพลาสมามีอำนาจทะลุทะลวงสูงกว่าอาร์กอนพลาสมา จึงพบอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า ทั้งนี้งานวิจัยของ Lee et al, 2014 และ Chandana et al, 2018 รายงานว่าการยับยั้งการทำงานของเซลล์แบคทีเรียอาจเกิดจากลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของก๊าซอาร์กอนและฮีเลียม โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลังงานไอออนไนเซชันและน้ำหนักโมเลกุลของไอออนที่แตกต่างกัน งานวิจัยนี้ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับ Cai et al, (2006) ที่พบว่าไอออนที่มีมวลเบา เช่น ฮีเลียม จะสามารถแทรกซึมได้ลึกกว่าไอออนที่มีมวลมาก เช่น อาร์กอน ภายใต้เงื่อนไขที่พลังงานต่ำหรือระยะเวลาสัมผัสสั้นกว่าแต่เมื่อระยะเวลาสัมผัสเพิ่มขึ้นการแทรกซึมของไอออนอาร์กอนเข้าสู่เซลล์จะลึกกว่า จึงทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้มากกว่าไอออนของฮีเลียม ซึ่งจากการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรคบนอาหารแข็งด้วยเทคนิค dual culture พบว่าแบคทีเรียพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ 80MT15, 80MT144,

80MT163 และ 80MT165 และ 1 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพด้อยกว่าพันธุ์ดั้งเดิม คือ 80MT123 เป็นแบคทีเรียที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการอาบอาร์กอนพลาสมาเป็นเวลา 5 นาที

จากการตรวจสอบลักษณะของเส้นใยเชื้อราก่อโรคบริเวณที่ติดกับแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 สายพันธุ์ดั้งเดิมและพันธุ์กลายทั้ง 4 ไอโซเลท (80MT15, 80MT144, 80MT163 และ 80MT165) พบว่าเส้นใยมีอาการ หักงอ บวม ซ่อสั้นลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Abdelmoteleb, 2018 พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ ALICA เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* พบว่าเส้นใยเชื้อราที่ทดสอบได้รับความเสียหายมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา เช่น ความเสียหาย การแตกหัก การบวม การบิดเบี้ยว สัณฐานวิทยาที่ผิดปกติ ซึ่งเกิดจากผนังเซลล์ของเชื้อราถูกทำลาย และเมื่อนำสารแขวนลอยของ *B. subtilis* พันธุ์กลายไอโซเลท 80MT15, 80MT144, 80MT163 และ 80MT165 มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคบนผลอะโวคาโดหลังเก็บเกี่ยว พบว่า *B. subtilis* พันธุ์กลายไอโซเลท 80MT15, 80MT144, 80MT163 และ 80MT165 มีความสามารถควบคุมโรคผลเน่าในผลอะโวคาโด ได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อประเมินกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่มีรายงานว่าพบในแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ได้แก่ เอนไซม์ไคติเนส เซลลูเลส อะไมเลส และโปรติเอส ที่พบในแบคทีเรีย *B. subtilis* AS80 และพันธุ์กลายไอโซเลท 80MT15, 80MT144, 80MT163, 80MT165 เปรียบเทียบกับ ไอโซเลท 80MT123 ที่สูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่าไอโซเลท 80MT123 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลสสูง แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส เซลลูเลส และโปรติเอส ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิมและพันธุ์กลายไอโซเลท 80MT15, 80MT144, 80MT163, 80MT165 พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนส เซลลูเลสสูง ดังนั้นเอนไซม์หลักที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา คือ เอนไซม์ไคติเนสและเซลลูเลส โดยจากการประเมินร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา สอดคล้องกับงานวิจัย Kim et al, 2009 และ Droby et al, 2009 ได้ระบุว่าไคติเนสจะย่อยสลายไคติลินซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อรายับยั้งเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค และมีการสันนิษฐานว่า *Paenibacillus* spp. สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราจากการผลิตยาปฏิชีวนะและเอนไซม์ที่ทำลายผนังเซลล์ เช่น ไคติเนส และ B-1,3-glucanase รวมถึงสารต่าง ๆ ที่ผลิตโดย *Bacillus* spp.

จากการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา โดยการเพิ่มปริมาณยีน PdaC และ Chitosanase ด้วยเทคนิค PCR1 และการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน PdaC และ Chitosanase จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิม (*B. subtilis* AS80) และพันธุ์กลาย 80MT144 พบว่าลำดับกรดอะมิโนทั้งสองยีนไม่มีความแตกต่างกัน อาจเป็นไปได้ว่ายีนในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็น Family gene การเลือกยีนจำนวนน้อยมาศึกษาจึงยังไม่พบการเปลี่ยนแปลง และยังมีเอนไซม์ยีนที่ไม่ได้ตรวจสอบในงานวิจัยนี้อีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น ไคตินเนส, เพคตินเนส และโปรตีเอส (Khan et al, 2018) และมีรายงานว่าเอนไซม์ไฮโดรไลติก เช่น ไคตินเนส, เพคตินเนส และโปรตีเอส ที่ผลิตโดย *Bacillus simplex* ช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Fusarium spp.* โดยอาศัยเอนไซม์ β -1,3 กลูคาเนส, เซลลูเลส และโปรตีเอส ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการต้านเชื้อรา (Mota et al, 2017) นอกจากนี้กลไกการผลิต สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายต้านเชื้อราก็มีส่วนสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น Volatile organic Compounds (VOCs) มีรายงานว่ายีสต์หลายชนิดผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายต้านเชื้อรา เช่น Volatile organic Compounds (VOCs) ซึ่งเป็นสารที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยว (Di Francesco, 2016) ทั้งนี้ประสิทธิภาพของตัวพันธุ์กลายในการควบคุมโรคผลเน่าทั้งสภาพในห้องปฏิบัติการหรือนอกปฏิบัติการมีประสิทธิภาพที่สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมทั้งผลการทดสอบต้านเชื้อราแบบ dual culture ทดสอบกับผลอะโวคาโดรวมถึงประสิทธิภาพกิจกรรมเอนไซม์ที่ทดสอบ ผู้วิจัยคาดหวังว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* AS80 พันธุ์กลาย 80MT144 นี้จะเป็นทางเลือกหนึ่งนำไปประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรได้

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- กรมวิชาการเกษตร. (2559). ความสำคัญ คุณค่า และประโยชน์ของอะโวคาโด [บทความ]Google. [www.doa.go.th/oard2/images/stories/km. pdf.](http://www.doa.go.th/oard2/images/stories/km.pdf)
- กรมวิชาการเกษตร. (2560). สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร [บทความ]Google. [http://oldweb.oae.go.th/ economicdata/pesticides.html](http://oldweb.oae.go.th/economicdata/pesticides.html)
- ธาวิดา ศิริสัมพันธ์. (2565, 21 มกราคม). อะโวคาโด พืชเศรษฐกิจบนพื้นที่สูง เชียงใหม่ สร้างรายได้งาม ปลูกได้ตลอดทั้งปี [บทความข่าว]Google. <https://www.khaosod.co.th/>
- นลินี ศิวารณ, รุ่งนภา คงสุวรรณ และวสันต์ ผ่องสมบุรณ์. (2553). การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอ, น. 2614-2629, กลุ่มวิจัยโรคพืช, สำนักวิจัยและการอำนวยการพืช, กรุงเทพฯ
- ปัทมวรรณ มณีสุวรรณ และพิศาล ศิริธร. (2556). ผลของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* BFP011 ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. *วารสารแก่นเกษตร*, 41(1), 327-332.
- มดิชน. (2562, 13 กันยายน). กลุ่มเผยแพร่และประชาสัมพันธ์สำนักงานเลขาธิการกรม ชู “ อะโวคาโด ” เป็นพืช เศรษฐกิจทางเลือกใหม่.[บทความข่าว]Google. [http://thaifarmer.lib.ku.ac.th/news/5f45c21ef326d27862f69e09.](http://thaifarmer.lib.ku.ac.th/news/5f45c21ef326d27862f69e09)
- ศูนย์รวมข้อมูลธุรกิจเอสเอ็มอี.(2564, 17 กันยายน), จากผู้ป่วยมะเร็ง สู่เจ้าของบริบูรณ์ฟาร์ม ปันแบรนด์ AVOCADO โดขาย พื้นที่สุขภาพกายและการเงิน [บทความข่าว]Google. <https://www.smethailandclub.com>
- สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง. (2561). อะโวคาโด [บทความ]Google. <https://www.hrdi.or.th>
- สำนักงานควบคุมการเกษตร (2554). ฐานข้อมูลสาธารณะ [บทความ]Google. <http://m.doa.go.th/ard/>
- สุพจน์ กาเพิ่ม. (2558). ชีวิตวิธีการควบคุมโรคพืชกับการผลิตพืชอาหารปลอดภัย. *ข่าวสารเกษตรศาสตร์*, 60(1), 13-21.

- สุพิชญา คำคม และวรัชญา หงษ์ทอง. (2563). ผลของการทดแทนไขมันบางส่วนด้วยเนื้ออะโวคาโดในผลิตภัณฑ์น้ำสลัดเพื่อสุขภาพ. *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์*, 16(3), 81-92
- Sharma, A. and Singh, S. (2019). Fungi as biological control agents. *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment*, 395-411. DOI:10.1007/978-3-030-18933-4_18
- Zaidi, A., Khan, M. S., Rizvi, A., Saif, S., Ahmad, B. and Shahid, M. (2017). Role of phosphate-solubilizing bacteria in legume improvement. *Microbes for Legume Improvement*, 175-197.
- Abdelmoteleb, A., Gonzalez-Mendoza, D., Valdez-Salas, B., Grimaldo-Juarez, O. and Ceceña-Duran, C. (2018). Inhibition of *Fusarium solani* in Transgenic Insect-Resistant Cotton Plants Treated with Silver Nanoparticles from *Prosopis glandulosa* and *Pluchea sericea*. *Egypt. J. Biol. Pest Control*, 28(4).
- Agrawal, T. and Kotasthane, A. S. (2012). Chitinolytic assay of indigenous Trichoderma isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *Springer Plus*, 1, 73.
- Ashwini, N. and Srividya, S. (2013). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chili caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *Biotech*, 4(2), 127-136.
- Cai, Q., Ledden, B., Krueger, E., Golovchenko, J. A. and Li, J. (2006). Nanopore sculpting with noble gas ions. *J Appl Phys*, 100(2), 24914-249146. doi: 10.1063/1.2216880.
- Chandrasekaran, M., Chun, S. C. (2016). Expression of PR-protein genes and induction of defense-related enzymes by *Bacillus subtilis* CBR05 in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants challenged with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Biosci. Biotech. and Biochem.* 80, 2277-2283.

- Chandana L, Sangeetha CJ, Shashidhar T, Subrahmanyam C. Non-thermal atmospheric pressure plasma jet for the bacterial inactivation in an aqueous medium. *Sci Total Environ*. 2018;640–641:493–500. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.342
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol*, 28, 214–220. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.007.
- Darvas, J, M. (1987). Fungi associated with pre-and postharvest diseases of avocado fruit at Westfalia Estate, South Africa. *Phytophylactica*, 19(1), 83–86.
- Daranas, N., Roselló, G., Cabrefiga, J., Donati, I., Francés, J., Badosa, E., et al. (2019). Biological control of bacterial plant diseases with *Lactobacillus plantarum* strains selected for their broad-spectrum activity. *Ann. Appl. Biol.* 174, 92–105. doi: 10.1111/aab.12476
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D. and Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest. Biology and Technology*, (52), 137-145.
- Ekezie, F, G., Sun, D, W. and Cheng, J, H. (2017). A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: Current applications and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, (69), 46-58.
- Yahia, M. E. (2012). Chapter 8: Avocado. *Crop postharvest: Science and Technology* DOI:10.1002/9781444354652.ch8
- El-Katatny, M. H., Somitsch, W., Robra, K. H., El-Katatny, M. S. and Gübitz, G. M. (2000). Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technol Biotechnol*, 38(3), 173–180.

- Francesco, D. A., Ugolini, L., Lazzeri, L. and Mari, M. (2015). Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control*, (81), 8–14.
- Guevara-Avendaño, E., Bejarano-Bolívar, A. A., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Méndez-Bravo, A., von Wobeser E.A., et al., *Microbiol. Res.*, 2019; 219: 74-83. DOI 10.1016/j.micres.2018.11.009
- Han, J. H., Shim, H., Shin, J. H. and Kim, K. S. (2015). Antagonistic Activities of *Bacillus* spp. Strains Isolated from Tidal Flat Sediment Towards Anthracnose Pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *Plant Pathology Journal*, 31(2), 165-175.
- Health System Research Institute (HSRI) Knowledge Needed for Effective Decision of Pesticide Policy in Thailand. Nonthaburi: Ministry of Public Health; 2005.v
- Hussain A.; Ahmad M.; Mumtaz M.Z.; Nazli F.; Farooqi M.A.; Khalid I. (2019). Impact of integrated use of enriched compost, biochar, humic acid and *Alcaligenes* spp. AZ9 on maize productivity and soil biological attributes in natural field conditions. *Ital. J. Agron*, 14(2), 101–109.
- Han, J. H., Shim, H., Shin, J. H. and Kim, K. S. (2015). Antagonistic activities of *Bacillus* spp. Strains isolated from tidal fat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichuma cutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *Plant Pathology Journal*, 31(2), 165-175.
- Huang, R., Li, G. Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H. J., Jiang, D. H. and Huang, H. C. (2011). Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*, 101(7), 859–869.
- Khan N, Martínez-Hidalgo P, Ice TA, Maymon M, Humm EA, Nejat N, Sanders ER, Kaplan D, Hirsch AM. 2018. *Antifungal activity of Bacillus species against Fusarium*

and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Front Microbiol* 9: 2363. DOI:10.3389/fmicb.2018.02363.

Kachhawa, D. (2017). Microorganisms as a biopesticides. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 468–473.

Kaur, S., Kumar, Y., Singh, V., Kaur, J., and Panesar, P. S. (2024). Cold Plasma Technology: Reshaping Food Preservation and Safety. *Food Control*, 163. 110537.

Kim, J. T., Park, S. Y., Choi, W. B., Lee, Y. H. and Kim, H. T. (2008). Characterization of *Colletotrichum* isolates causing anthracnose of pepper in Korea. *Plant Pathology Journal*, 24(1), 17-23.

Laksuk, H., Anuntalabhochai, S., Sangwijit, K., Boonrueng, N., Suebsan, S. and Thongrote, C. (2019). Induced Mutations of Naked DNA by Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ). *Srinakharinwirot Science Journal*, 35(2).

Lastochkina, O., Seifikalhor, M., Aliniaiefard, S., Baymiev, A. (2019). *Bacillus* spp.: Efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plants* 8, 1–24.

Lee, Y., Kim, K., Kang, K. T., Lee, J. S., Yang, S. S., and Chung, W. H. (2014). Atmospheric-pressure plasma jet induces DNA double-strand breaks that require a Rad51-mediated homologous recombination for repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*, 560, 1–9. doi: 10.1016/j.abb.2014.07.029.

Mota, M. S., Gomes, C. B., Souza-Júnior, I. T. and Moura, A. B. (2017). Bacterial selection for biological control of plant disease: Criterion determination and validation. *Braz J Microbiol*, 48(1), 62-70. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.09.003

Subedi, P., Gattoni, K., Liu, W., Lawrence, K. S., Park, S. W. (2020). Current utility of plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents towards

- plant-parasitic nematodes. *Plants*, 9(9), 1167. doi.org/10.3390/plants9091167
- Polsa, N., Suyotha, W., Suebsan, S., Anuntalabhochai, S. and Sangwijit, K. (2020). Increasing xylanase activity of *Bacillus subtilis* by atmospheric pressure plasma jet for biomass hydrolysis. *3 Biotech*, 10(1), 259.
- Rahman, M. Z.; Ahmad, K.; Siddiqui, Y.; Saad, N.; Hun, T. G.; Hata, E. M. Rashed, O. and Hossain, M. I. (2022). First report of *Fusarium equiseti*, causing fruit rot disease of watermelon in Malaysia. *Plant Disease*, 106(1), 326. doi.org/10.1094/PDIS-05-21-1027-PDN
- Rashid, U., Yasmin, H., Hassan, M. N., Naz, R., Nosheen, A., Sajjad, M., Llyas, N., Keyani, R., Jabeen, Z., Mumtaz, S., Alyemeni, N. M. and Ahmad, P. (2022). Drought-tolerant *Bacillus megaterium* isolated from semi-arid conditions induces systemic tolerance of wheat under drought conditions. *Plant Cell Rep.* 41 (3), 549–569. doi: 10.1007/s00299-020-02640-x
- Russell, P. E. (2006). The development of commercial disease control. *Plant Pathology Journal*, 55(5), 585–594. doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01440.x
- Russell, P. E., Saravanakumar, D., Ciavarella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. and Gullino, M, L. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1), 121-128. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.11.006
- Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R. and Hernandez-Montiel, G. L. (2019). Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. *Agronomy*, 9(3), 121.

- Henz, G. P., Boiteux, L. S. and Lopes C. A. (1992). Outbreak of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* in central Brazil. *Plant Disease*, 76, 212.
- Stefanatos, R. and Sanz, A. (2018) The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Lett*, 592(5), 743–758. doi: 10.1002/1873-3468.12902.
- Spadaro, D. and Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39–49. doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003
- Swain, M. R., Ray, R. C. and Nautiyal, C. S. (2008). Biocontrol efficacy of *Bacillus subtilis* strains isolated from cow dung against postharvest yam (*Dioscorea rotundata* L.) pathogens. *Curr Microbiol*, 57(5), 407. DOI: 10.1007/s00284-008-9213-x
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. and Lorito, M. (2008). Trichoderma- plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.07.002.
- Villa-Rodríguez, J. A., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I. and González-Aguilar, G. A. (2011). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of Hass avocado. *Food Research International*, 44(5), 1231-1237. doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.012
- Wanjiku, E. K., Waceke, J. W., Wanjala, B. W. and Mbaka, J. N. (2020). Identification and Pathogenicity of Fungal Pathogens Associated with Stem End Rots of Avocado Fruits in Kenya. *International Journal of Microbiology*, 2020(1). doi.org/10.1155/2020/4063697
- Xu, F., Wang, J., Chen, S., Qin, W., Yu, Z. Zhao, H., Xing X. and Li H. (2011). Strain Improvement for enhanced production of cellulase in *Trichoderma viride*. *Biochem Microbiol*, 47(1).

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	17	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

2. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

Peptone	5	กรัม
Beef Extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข การเตรียมสาร

การเตรียม phosphate buffer 50 mM (pH6.5) 100 มิลลิลิตร

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.774	กรัม
$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.291	กรัม

เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ในภาชนะที่เหมาะสม จากนั้นปรับสารละลายให้ได้ pH ที่ต้องการโดยใช้ HCl หรือ NaOH ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การเตรียม phosphate buffer 0.1 M (pH7) 100 มิลลิลิตร

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.549	กรัม
$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.583	กรัม

เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ในภาชนะที่เหมาะสม จากนั้นปรับสารละลายให้ได้ pH ที่ต้องการโดยใช้ HCl หรือ NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การเตรียม phosphate buffer 0.2 M (pH6.5) 100 มิลลิลิตร

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.916 กรัม

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.774 กรัม

เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ในภาชนะที่เหมาะสม จากนั้นปรับสารละลายให้ได้ pH ที่ต้องการโดยใช้ HCl หรือ NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสาร Dinitro salicylic acid (DNS)

ละลาย DNS 5 กรัมในสารละลาย Sodium hydroxide ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Sodium potassium tartrate (จำนวน 150 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ถึง 500 มิลลิลิตร

เตรียมสาร 0.1M Na_2CO_3 100 มิลลิลิตร

สาร Na_2CO_3 0.8401 กรัม ใส่ภาชนะที่เหมาะสม จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เตรียมสาร 0.5M Na_2CO_3 100 มิลลิลิตร

สาร Na_2CO_3 4.2005 กรัม ใส่ภาชนะที่เหมาะสม จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานของสารละลาย

1. การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลาย Glucose ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Dinitro salicylic acid ในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และบันทึกผลการทดลองที่ได้ คำนวณเป็นกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

1.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน

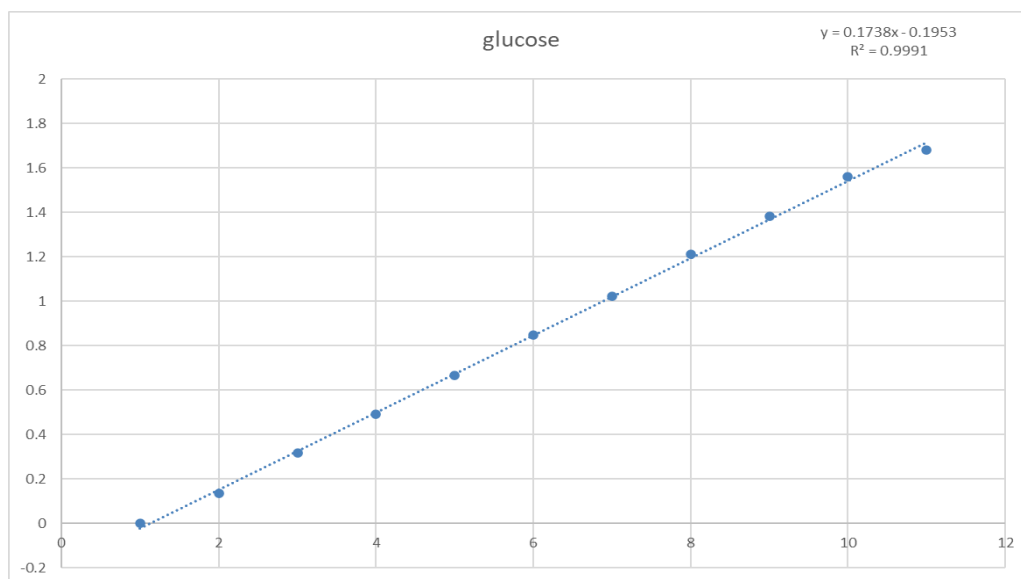
ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นด้วยวิธี DNS method โดยใช้ L-tyrosine เป็นสารมาตรฐาน ทำโดยเตรียมสารละลาย L-tyrosine ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Dinitro salicylic acid ในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และบันทึกผลการทดลองที่ได้ คำนวณเป็นกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

1.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานเอ็น-อะซิทีว กลูโคซามีน

การวิเคราะห์ความเข้มข้นด้วยวิธี DNS method โดย N-acetyl-glucosamine เป็นสารมาตรฐาน ทำโดยเตรียมสารละลาย N-acetyl-glucosamine ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 0.05, 0.1, 0.15, และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Dinitro salicylic acid ในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และบันทึกผลการทดลองที่ได้ คำนวณเป็นกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

1.4 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA)

โดยใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย BSA ในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และผสมสารละลาย Bradford dry reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองที่ได้ และคำนวณเป็นกราฟมาตรฐาน



ภาพ 13 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

2. กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส อะไมเลส และโปรตีน

2.1 การคำนวณปริมาณเอนไซม์กลูโคสเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามหลักของ The International Union of Biochemistry

1 enzyme unit = 1 micromole of Glucose ที่มีการปลดปล่อยใน 1 นาที

1 enzyme unit = 0.18 mg ของ Glucose ที่มีการปลดปล่อยใน 1 นาที

1.00 mg ของ Glucose ที่มีการปลดปล่อยใน 1 นาที = $1/0.18$ Unit

ถ้าปลดปล่อย Glucose X mg ใน 30 นาที มีค่า 0.185 มวลโมเลกุล Glucose

จากการทดลองใช้ enzyme 0.15 ml ดังนั้น Glucose ค่าหน่วยเอนไซม์ = $[0.185 \text{ (มิลลิกรัมน้ำตาล)}]/0.15$

ตัวอย่างการคำนวณ

ถ้าวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.1039

นำมาคำนวณหาค่ามิลลิกรัมกลูโคสจากสมการ (ภาพ 4)

$$y = 0.1738x - 0.1953$$

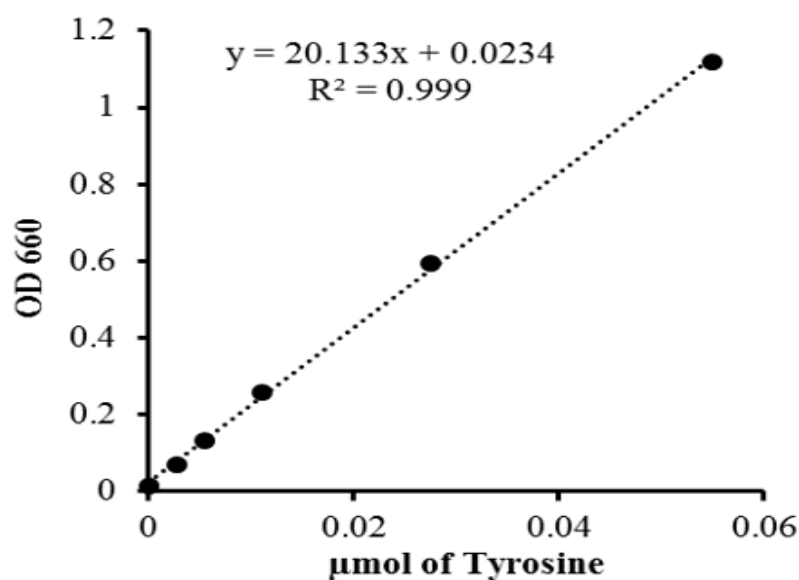
$$x = (y + 0.1953) / 0.1738$$

$$= (0.1039 + 0.1953) / 0.1738$$

$$= 1.722 \text{ มิลลิกรัม}$$

ดังนั้นจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ =

$$= 2.123 \text{ หน่วย/มิลลิลิตร}$$



ภาพ 14 กราฟมาตรฐานของสารละลาย L-tyrosine

3. กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน และโปรตีน

3.1 การคำนวณปริมาณเอนไซม์โปรตีนเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามหลักของ The International Union of Biochemistry

1 enzyme unit = 1 micromole of Tyrosine ที่มีการปลดปล่อยใน 1 นาที

1 enzyme unit = 0.181 mg ของ Tyrosine ที่มีการปลดปล่อยใน 1 นาที

1.00 mg ของ Tyrosine ที่มีการปลดปล่อยใน 1 นาที = $1/0.181$ Unit

ถ้าปลดปล่อย Tyrosine X mg ใน 5 นาที มีค่า 0.181 มวลโมเลกุล Tyrosine

จากการทดลองใช้ enzyme 0.025 ml ดังนั้น Tyrosine ค่าหน่วยเอนไซม์ = $[0.181$
(มิลลิกรัม Tyrosine)]/0.025

ตัวอย่างการคำนวณ

ถ้าวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.024

นำมาคำนวณหาค่ามิลลิกรัม L-tyrosine จากสมการ

$$y = 20.133x + 0.0234$$

$$x = (y + 0.0234) / 20.133$$

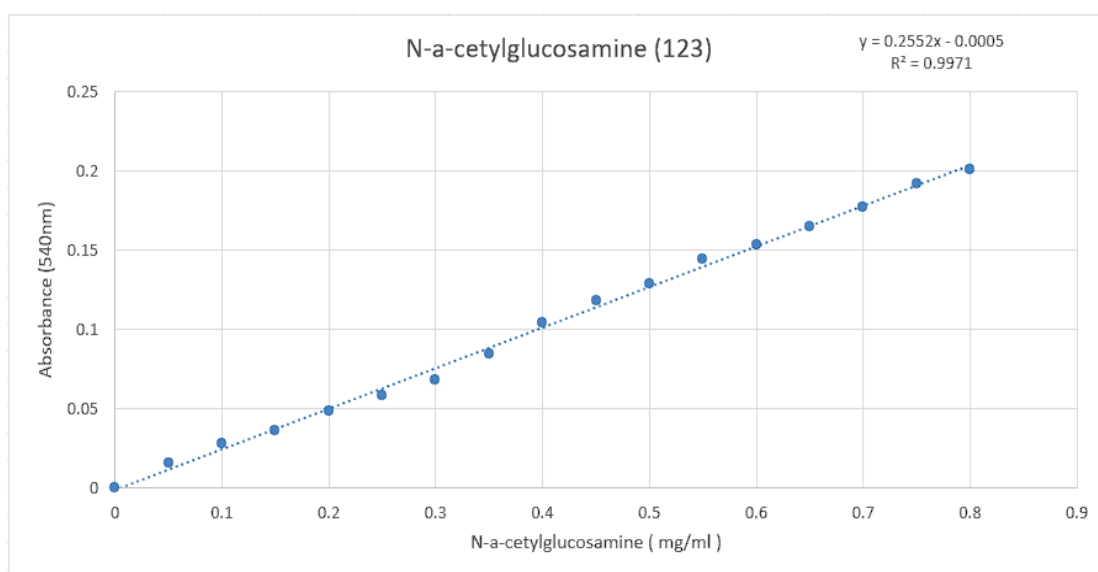
$$= (0.024 + 0.0544) / 20.133$$

$$= 0.003 \text{ มิลลิกรัม}$$

ดังนั้นจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ =

$$= 0.8588 \text{ หน่วย/มิลลิลิตร}$$





ภาพ 15 กราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetyl-glucosamine

4.กราฟมาตรฐานของสารละลายไคติเนส และโปรตีน

4.1 การคำนวณปริมาณเอนไซม์ไคติเนสเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามหลักของ The International Union of Biochemistry

1 enzyme unit = 1 micromole of N-acetyl glucosamine ที่มีการปลดปล่อย
ใน 1 นาที

1 enzyme unit = 0.221 mg ของ N-acetyl glucosamine ที่มีการปลดปล่อยใน
1 นาที

1.00 mg ของ N-acetyl glucosamine ที่มีการปลดปล่อยใน 1 นาที = $1/0.221$

ถ้าปลดปล่อย N-acetyl glucosamine X mg ใน 30 นาที มีค่า 0.151

จากการทดลองใช้ enzyme 0.075 ml ดังนั้น N-acetyl glucosamine ค่าหน่วย
เอนไซม์ $[0.151 \text{ (มิลลิกรัมน้ำตาล)}]/0.075$

ตัวอย่างการคำนวณ

ถ้าวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.039

นำมาคำนวณหาค่ามิลลิกรัมกลูโคสจากสมการ (ภาพ 13)

$$y = 0.2552x - 0.0005$$

$$x = (y + 0.0005) / 0.2552$$

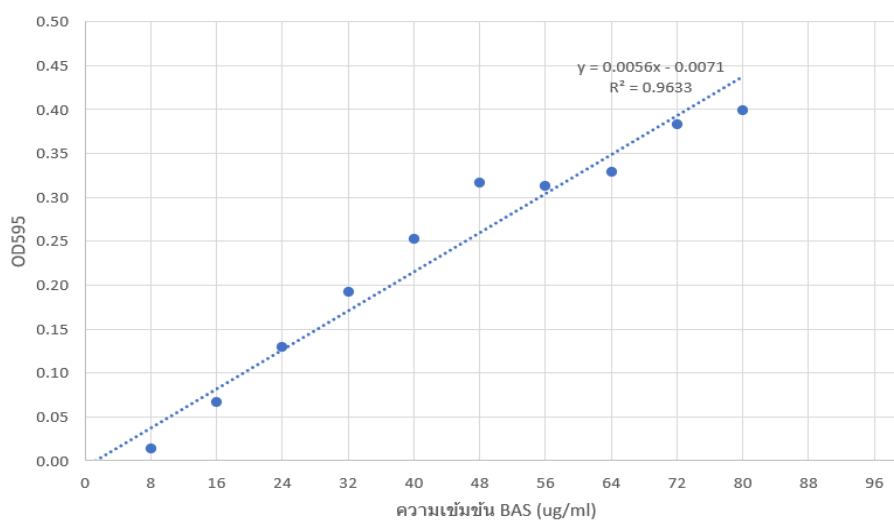
$$= (0.039 + 0.0005) / 0.2552$$

$$= 0.154 \text{ มิลลิกรัม}$$

ดังนั้นจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ =

$$= 0.31 \text{ ยูนิต/มิลลิลิตร}$$

BSA



ภาพ 16 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA

4.2 การคำนวณปริมาณโปรตีน

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA จากนั้นคำนวณหาค่า มิลลิกรัมโปรตีนได้จากสมการ

$$y = 0.0056x + 0.0071$$

$$x = (y + 0.0071) / 0.0056 \quad \text{มิลลิกรัม}$$

ถ้าวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.0162

นำมาคำนวณหาค่ามิลลิกรัมโปรตีนจากสมการ

$$\begin{aligned} x &= (0.0162 + 0.0056) / 0.0071 \\ &= 4.15 \quad \text{มิลลิกรัม} \end{aligned}$$

ใช้เอนไซม์ปริมาตร 0.160 มิลลิลิตร ในการทดลอง

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น จะมีค่าปริมาณโปรตีน} &= (4.15 / 0.16) / 1000 \\ &= 0.026 \text{ มิลลิกรัม} \end{aligned}$$

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ศุภชัย โปธิ
วัน เดือน ปี เกิด	วันที่ 16 กันยายน พ.ศ 2542
สถานที่เกิด	เชียงราย
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี สาขา ชีววิทยา มหาวิทยาลัยพะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	17/1 หมู่3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย 57310
ผลงานตีพิมพ์	Pothi.S et al. (9 May 2025) Enhancement of antifungal efficacy of <i>Bacillus subtilis</i> AS80 by cold plasma technology CREATIVE SCIENCE 17(3)
รางวัลที่ได้รับ	-

