



สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Pseudomonas* sp. เพื่อยับยั้งโรคแคงเกอร์
Bioactive compound produced by isolated *Pseudomonas* sp. for controlling
citrus canker pathogen *Xanthomonas* sp.

นิพัทธพร สภาพร*

Nipatcharaporn Sapapporn

น้ำผึ้ง ธนิกกุล**

Nampueng Thanikkun

บทคัดย่อ

ในการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. เพื่อยับยั้งโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกเชื้อ *Xanthomonas* sp. และเชื้อปฏิปักษ์ *Pseudomonas* sp. จากมะนาวสายพันธุ์แป้นพิจิตร (*Citrus aurantifolia* Swingle) ที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์ โดยสามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 12 ชนิด ในอาหารคัดแยกที่แตกต่างกัน เมื่อทำการระบุเชื้อด้วยวิธีทางลักษณะสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อรหัส X.1, mX.1 และ CPs.1 ระบุชื่อเป็น *Xanthomonas* sp. และเชื้อ CPs.2 ระบุชื่อเป็น *Pseudomonas* sp. เมื่อนำ CPs.2 ไปทำการระบุชื่อด้วยลำดับยีน 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Ps. oryzae* และ *Ps. Phychrotolerans* มากที่สุด จากนั้นนำ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้มาทำการศึกษากิจกรรมการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้สารละลายที่แตกต่างกัน จากสารสกัดทั้ง 2 ส่วนคือ ส่วนที่มีขี้ผึ้งและไม่มีขี้ผึ้ง พบว่ามีเพียงสารสกัดส่วนที่มีขี้ผึ้ง e CPs.2 ที่ทำการสกัดด้วย Ethyl acetate เพียงสูตรเดียวที่แสดงการยับยั้ง *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) ของเชื้อแบคทีเรียได้ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ หรือความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ทำการเจือจาง จากนั้นจึงทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารวุ้น พบว่าสารสกัดไม่มีศักยภาพมากพอที่จะทำให้เชื้อก่อโรคตายได้ ส่วนผลการควบคุมโดยชีววิธีในแปลงทดลองพบว่า *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้สามารถก่อโรคแคงเกอร์และพบการอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช หลังจากการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้โดยการฉีดพ่นทางใบพบลักษณะของบาดแผลที่มีลักษณะแตกต่างจากการไม่ใช้สารสกัด

คำสำคัญ : โรคแคงเกอร์ / สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ / การควบคุมโดยชีววิธี

*อาจารย์ประจำโปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร

**นักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร

ABSTRACT

The challenge is to find new compounds that show strong antibiotic activity and low toxicity to plants and the environment. The objectives of the present study were (1) to isolate *Xanthomonas* sp. which causes citrus canker lesions and *Pseudomonas* sp. which produce bioactive compound from lime leaves (*Citrus aurantifolia* Swingle.) (2) to extract and evaluate the secondary metabolites with antibiotic activity produced by *Pseudomonas* sp. in vitro against *Xanthomonas* sp. (3) to determine the potential of secondary metabolites in foliar application to control citrus canker under normal conditions. The results showed X.1, mX.1 and CPs.2 isolated codes of *Xanthomonas* sp. and CPs.2 isolated code of *Pseudomonas* sp. The CPs.2 was the closest to *Ps. oryzae* and *Ps. phycisporans* more than 100 percent similarity by 16S rDNA. The secondary metabolites were extracted and inhibited isolated *Xanthomonas* sp. of polar layer by ethyl acetate extraction which against *Xanthomonas* sp. with undiluted - concentration of minimum inhibitory concentration (MIC). The minimum bactericidal concentration (MBC) test not showed bacteriocidal activity. In the application, The metabolites could control the lesion citrus canker after foliar application. These results suggest that secondary metabolites must be purified which improve a higher potential to be used as a bioproduct to control citrus canker.

Keywords : Citrus canker / Bioactive compounds / Biological control

บทนำ

พืชตระกูลส้ม (Citrus species) นับได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ตัวอย่างเช่น ส้มสายน้ำผึ้ง และส้มสีทอง (*Citrus reticulata* Blanco) นิยมทำการปลูกทางภาคเหนือ ในพื้นที่ของอำเภอฝาง อำเภอเชียงดาว อำเภอไชยปราการ และอำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่ (ศูนย์วิจัยเศรษฐกิจและพยากรณ์ทางการเกษตร, 2555) ส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (*C. grandis* (L.) Osbeck) นิยมทำการปลูกทางภาคกลางในพื้นที่ของจังหวัดชัยนาท ซึ่งเป็นผลไม้ที่สำคัญและสร้างชื่อเสียงแก่จังหวัดเป็นอย่างมาก (พิชญานพร และคนอื่นๆ, ม.ป.ป.) และมะนาวแป้น (*C. aurantifolia* Swingle) โดยส่วนใหญ่นิยมทำการปลูกเพื่อบริโภคภายในครัวเรือน ส่วนการปลูกเพื่อจำหน่ายเชิงการค้าจะเป็นทางภาคตะวันตกและภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี จังหวัดราชบุรี จังหวัดนครปฐม จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดนครศรีธรรมราช และสุราษฎร์ธานี ซึ่งมะนาวแป้นจะเป็นที่นิยมของผู้บริโภคและสามารถขายได้ราคาดี (การปลูกมะนาวในประเทศไทย, 2558) อย่างไรก็ตามสาเหตุหลักที่ทำให้ผลผลิตลดลงนั่นก็คือ การเกิดโรคและแมลงศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อพืชตระกูลส้ม ซึ่งโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายมากที่สุด คือ โรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม โดยมีแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* subsp. *citri* เป็นเชื้อก่อโรค (ภักถน, 2558) จากพืชตระกูลส้มทั้งหมดที่กล่าวมานั้น ส้มสายน้ำผึ้ง ส้มสีทอง และส้มโอมีความไวต่อการติดเชื้อมากที่สุด ส่วนมะนาวแป้นมีความไวต่อการติดเชื้อมากที่สุดคือ (Chen., et al., 2012; Schubert & Sun, 2003) ซึ่งพืชชนิดนี้ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคและแสดงอาการของโรคอย่างรุนแรง

โรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มมีสาเหตุจาก *X. citri* subsp. *citri* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เชลล์เดี่ยว มีรูปร่างเป็นท่อน โคโลนีมีลักษณะสีเหลือง เป็นมันเมือกและนูน (Islam., et al., 2014) เชื้อจะเข้าสู่พืชได้

ทางช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ปากใบ และบาดแผล เป็นต้น ซึ่งอาจเกิดจากการทำลายของแมลง โดยเฉพาะหนอนชอนใบส้ม (*Phyllocnistis citrella* Stainton) การแพร่ระบาดของโรคเกิดขึ้นได้โดยลมและฝน โดยลักษณะของบาดแผลจะเป็นสะเก็ดน้ำตาลฟูสีน้ำตาล รูปร่างไม่แน่นอน เกิดที่บริเวณใบ กิ่งและผล ถ้าหากมีอาการที่รุนแรงต้นจะทรุดโทรม ใบร่วง กิ่งแห้งตาย แครกแตก และตายในที่สุด (ศศิธร, 2549) การป้องกันและกำจัดโรคแคงเกอร์ของเกษตรกร ได้แก่ การเลือกกิ่งพันธุ์ที่แข็งแรงและปลอดโรคมาทำการปลูก การตัดแต่งส่วนที่เป็นโรคไปเผาทำลาย การปลูกไม่ย่นต้นเป็นแนวกำบังลม การป้องกันโรคในระยะที่พืชแตกใบอ่อนด้วยการฉีดพ่นด้วยสารเคมีกลุ่ม Carbaryl Malathion หรือ Copper sulfate และในกรณีที่โรครมีความรุนแรงมากอาจใช้สารปฏิชีวนะประเภท Streptomycin ในการกำจัดโรคแคงเกอร์ (ปรัชญา, 2548)

อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีในการกำจัดหรือควบคุมโรคพืชนั้น ย่อมส่งผลเสียตามมาภายหลังเสมอ เช่น การเกิดสารพิษตกค้างในผักและผลไม้ การเกิดความเป็นพิษต่อเกษตรกร และการเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เป็นต้น ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาค้นคว้าการควบคุมโดยชีววิธี (Biological control) ต่างๆ ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับการกำจัดและควบคุมโรคแคงเกอร์ เช่น การพัฒนามะนาวลูกผสมที่สามารถต้านทานโรคแคงเกอร์ได้ (ณรงค์และคนอื่นๆ, 2553) และการใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคแคงเกอร์ (Kalita., et al., 1996) เป็นต้น เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) จาก *Pseudomonas aeruginosa* ที่ทำการคัดแยกโดยใช้อาหาร Nutrient agar (NA) ที่เติม Copper chloride ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ จะได้สารกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะและมีความเข้มข้นสูง คือ สารประกอบโลหะอินทรีย์ทองแดง (Organocopper compound) สามารถขจัดบาดแผลและควบคุมโรคแคงเกอร์ได้ในพืชตระกูลส้มที่มีรสหวาน ภายใต้สภาวะโรงเรือน พบว่าความเข้มข้นที่ใช้นั้นต่ำกว่าสารคอปเปอร์ที่ใช้กันทั่วไปมากกว่า 500 เท่า (de Oliveira., et al., 2016)

จากรายงานวิจัยข้างต้นทำให้ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานการเกิดโรคแคงเกอร์ในต้นมะนาวว่า โรคแคงเกอร์เกิดจากต้นมะนาวเสียสภาวะสมดุลของจุลินทรีย์ ทำให้ *Xanthomonas* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชก่อโรคหรือแสดงอาการของโรคขึ้นมาได้ ผู้วิจัยจึงทำการคัดแยกเชื้อ *Pseudomonas* sp. จากต้นมะนาวที่เป็นโรคแคงเกอร์ และทำการติดตามการเจริญของเชื้อที่คัดแยกได้ เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compound) และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ภายในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบความสามารถของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิในการกำจัดโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มโดยการฉีดพ่นทางใบในแปลงทดลอง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อก่อโรคและเชื้อปฏิปักษ์

เก็บตัวอย่างใบมะนาวสายพันธุ์แป้นพิจิตรที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์อย่างละ 10 ใบ ใส่ภาชนะปลอดเชื้อ จากนั้นนำมาทำการล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด ฟอกฆ่าเชื้อด้วย Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง ค้างละ 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำมาบดด้วยโกรนบดสารปลอดเชื้อ แล้วนำไปชั่งให้ได้ปริมาตร 1 กรัม นำไปเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 99 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-2} และทำการเจือจางต่อไปอีกที่ 10^{-3} และ 10^{-4} จากนั้นนำค่าการเจือจางแต่ละค่ามาทำการเกลี่ยกระจายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการคัดแยกเชื้อ *Xanthomonas* sp. จะใช้อาหาร Yeast extract Dextrose Calcium carbonate medium (YDC) (Islam., et al., 2014) และอาหาร Modified Yeast extract Dextrose Calcium carbonate medium (mYDC) จะมีองค์ประกอบคล้ายคลึงกับ YDC แต่ใส่ yeast extract เพียง 1.0 กรัมต่อลิตร ส่วน *Pseudomonas* sp. จะใช้อาหาร NA ที่ผสม CuCl_2

ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) (ค่า pH 6.4-6.8) (de Oliveira., et al., 2016) และอาหาร NA ที่ผสม NaCl ความเข้มข้น 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นทำการบันทึกผลโดยสังเกตลักษณะของโคโลนี และทำการแยกเชื้อตามลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน ลงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การพิสูจน์และระบุเชื้อ เชื้อที่ทำการคัดแยกได้ โดยวิธีต่างๆ ดังนี้

2.1 การย้อมสีแกรม

แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และ *Xanthomonas* sp. จะให้การติดสีเป็นสีแดงหรือเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และรูปร่างเป็นท่อน (Islam., et al., 2014)

2.2 การเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมดในอาหาร Nutrient broth (NB) จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ผสม NaCl ความเข้มข้น 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) NA ที่ผสม NaCl ความเข้มข้น 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการเจริญของเชื้อ โดย *Xanthomonas* sp. จะไม่สามารถเจริญได้ (Islam., et al., 2014)

2.3 การเรืองแสง (Fluorescence)

นำตัวอย่างเชื้อที่สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด มาทำการเลี้ยงในอาหาร King's medium B Base ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน โดยเชื้อ *Xanthomonas* sp. จะไม่สามารถเรืองแสง (Islam., et al., 2014) ส่วน *Ps. aeruginosa* ที่มีโคโลนีเป็นสีเขียวเงินหรือเขียวเหลืองจะสามารถเรืองแสงได้

2.4 การทดสอบด้วยวิธีการทางชีวเคมี

2.4.1 Triple Sugar Iron (TSI) test

ทำการทดสอบบน TSI slant ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผล โดย *Xanthomonas* sp. แผลผลเป็น A/A Gas, H₂S (Islam., et al., 2014) ส่วน *Ps. aeruginosa* แผลผลเป็น K/K

2.4.2 Oxidative-Fermentative test

ทำการทดสอบบน Hugh Leifson Medium ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดย *Xanthomonas* sp. แผลผลเป็น Fermentative (Islam., et al., 2014) ส่วน *Ps. aeruginosa* แผลผลเป็น Oxidative

2.5 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

นำตัวอย่างเชื้อที่สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด มาทำการเลี้ยงในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ไม้พันสำลีจุ่มเชื้อที่ทำการขยายในอาหาร NB แล้วป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Muller-Hinton agar (MHA) ทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 15-20 นาที นำแผ่นยาปฏิชีวนะไปวางบนผิวหน้าของอาหารและกดเบาๆ โดยใช้คีมคีบที่ปราศจากเชื้อ โดยในจานเพาะเลี้ยง 1 จาน จะมีแผ่นยา 2 แผ่น คือ กระดาษกรองทรงกลม 1 แผ่นที่เป็นชุดควบคุมโดยใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปปริมาตร 5 ไมโครลิตร และอีกหนึ่งแผ่นเป็นแผ่นยาปฏิชีวนะ Bacitracin ความเข้มข้น 0.4 ยูนิต หรือ Chloramphenicol ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม วางแผ่นยาห่างจากขอบจานเพาะเชื้อประมาณ 2 เซนติเมตร และแผ่นยาห่างกันประมาณ 5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการบันทึกผลสังเกตดูบริเวณยับยั้ง

(Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็นหน่วยมิลลิเมตร จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐานของ *Xanthomonas* sp. (Islam., et al., 2014) และ *Ps. aeruginosa*

2.6 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะเพื่อยืนยันความเป็น *Ps. aeruginosa*

นำตัวอย่าง *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้ทั้งหมด มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ไม้พ่นสำลีจุ่มเชื้อที่ทำการขยายในอาหาร NB แล้วป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA ทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 15-20 นาที นำแผ่นยาปฏิชีวนะไปวางบนผิวหน้าของอาหารและกดเบาๆ โดยใช้คีมคีบที่ปราศจากเชื้อ โดยในงานเพาะเลี้ยง 1 งาน จะมีแผ่นยา 2 แผ่น และ กระดาษกรองทรงกลม 1 แผ่นเป็นชุดควบคุมโดยใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยใช้แผ่นยาปฏิชีวนะ Imipenem ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม Ceftazidime ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม, Ciprofloxacin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม และ Gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม วางแผ่นยาห่างจากขอบจานเพาะเชื้อประมาณ 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการบันทึกผลสังเกตดูบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็นหน่วยมิลลิเมตร จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับบริเวณยับยั้งที่แสดงในใบสอบเทียบมาตรฐานยาของ Oxoid

2.7 การทดสอบการก่อโรครากับต้นมะนาวของ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้

นำตัวอย่างเชื้อที่คาดว่า เป็น *Xanthomonas* sp. ปริมาตร 1 หลอดถ่ายเชื้อ มาทำการเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 10^8 Colony forming unit (CFU)/มิลลิลิตร โดยนำมาทำการทดสอบกับตัวอย่างต้นมะนาวสายพันธุ์เป็นพิจิตรเป็นกิ่งตอน ระยะออกผล ที่มีการปลูกในถุงดำขนาด 12×24 นิ้ว ในสภาวะปกติ เป็นต้นที่ปลอดโรค และมีการรดน้ำตามความเหมาะสมหรือตามความต้องการของพืช เริ่มการทดสอบด้วยการใช้หลอดฉีดยาที่ถอดเข็มฉีดยาออกแล้ว กดลงบนใบมะนาวที่มีมีร่องรอยด้วยหลังของใบให้เกิดรอยชำ เพื่อสร้างบาดแผลให้เชื้อก่อโรคสามารถเข้าไปภายในเนื้อเยื่อพืชได้ดีขึ้น โดยทำการเลือกใบมะนาวที่นับจากยอดลงมาลำดับที่ 4 หรือ 5 ใบละ 2 รอย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการฉีดพ่น *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อต้น ทำการเก็บผลโดยสังเกตลักษณะบาดแผลที่เกิดขึ้น (Chen., et al., 2012)

2.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA

นำ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้ ทำการสกัดดีเอ็นเอจากนั้นเพิ่มปริมาณของ 16S rDNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ทำให้ Amplified PCR product บริสุทธิ์โดยใช้ GFX PCR DNA และ Gel Band Purification Kit จากนั้นทำการหาลำดับเบสของ 16S rDNA โดยนำ Amplified PCR products ที่ทำบริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับเบสโดยเครื่อง ABI PRISM DNA sequencer และทำการสร้าง Phylogenetic tree (วิชัย และคนอื่นๆ, 2552)

3. การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds extraction)

นำ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้มาทำการเตรียมหัวเชื้อในอาหาร NB ที่ผสม CuCl_2 ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในอาหาร NB ที่ผสม CuCl_2 ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ทำการติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและทำการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากของเหลวที่ผ่านการกรอง (filtrate) ทุกวัน จากนั้นนำไปผสมกับอาหาร NA โดยความเข้มข้นของของเหลวที่ผ่านการกรอง คือ

50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดสอบการเจริญของ *Xanthomonas* sp. เมื่อครบ 10 วัน จะนำทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) โดยนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) เป็นเวลา 20 นาที ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นำของเหลวที่อยู่เหนือตะกอน (Supernatant) มาทำการสกัดด้วยกรวยแยก และตัวทำละลาย 2 สูตร ดังนี้ สูตรแรกผสมส่วนใสกับตัวทำละลายคือ Dichloromethane (d)/Ethyl acetate (e) (1:1) โดยอัตราส่วน 1 : 2 ทำการสกัดทั้งหมด 5 ครั้ง นำสารสกัดในส่วนของชั้นที่ไม่มีขั้ว (Non - polar layer) ไปทำให้มีความเข้มข้นสูงโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารสูญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน (de Oliveira *et al.*, 2016) สูตรที่สองผสมส่วนใสกับตัวทำละลายคือ Ethyl acetate โดยอัตราส่วน 1 : 1 ทำการสกัดทั้งหมด 10 ครั้ง นำสารสกัดในส่วนของชั้นที่ไม่มีขั้วไปทำให้มีความเข้มข้นสูงโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารสูญญากาศที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันที่ลดต่ำลง (Spago., *et al.*, 2014) และทำการเก็บสารสกัดเข้มข้นบรรจุไว้ในขวดแก้วสีชา แล้วนำไปวิเคราะห์การยับยั้งเชื้อก่อโรค

4. การวิเคราะห์ทางชีวภาพ

4.1 การทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

นำสารสกัดในส่วนของชั้นที่มีขั้ว (Polar layer) จากทั้ง 2 สูตรการสกัดในขั้นตอน 8.3 มาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเป็นเวลา 20 นาที ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที และนำของเหลวส่วนที่อยู่เหนือตะกอน (Supernatant) ที่ได้มากรองผ่านเยื่อกรอง (Membrane filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร มาเจือจางกับอาหาร NA ที่ความเข้มข้น 50 %(v/v) จากนั้นนำ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ทำการลากเชื้อมาเจือจางอาหารดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการบันทึกผลการเจริญของ *Xanthomonas* sp. (You., *et al.*, 2016)

4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค

นำ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ ปริมาตร 1 หยดถ่ายเชื้อ มาทำการเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ไม้พันสำลีจุ่มเชื้อที่ทำการขยายในอาหาร NB แล้วป้ายให้ทั่วผิวน้ำอาหาร NA ทั้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 15-20 นาที นำแผ่นกระดาษกรองทรงกลมปลอดเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร โดยวาง 1 แผ่นต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง นำสารสกัดในส่วนของชั้นที่มีขั้ว (Polar layer) และชั้นที่ไม่มีขั้ว (Non-polar layer) ทำการถ่ายลงแผ่นยาปลอดเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อแผ่นยา ชุดควบคุมใช้แผ่นยาที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการบันทึกผลบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็นหน่วยมิลลิเมตร (de Oliveira., *et al.*, 2016)

4.3 การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค (MIC)

นำ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ ปริมาตร 1 หยดถ่ายเชื้อ มาทำการเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่ระดับ 0.5 McFarland นำหลอดทดลองปลอดเชื้อจำนวน 10 หลอด ใส่อาหาร trypticase soy broth (TSB) หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นใส่สารสกัดใส่หลอดที่ 1 และ 2 หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และทำการเจือจางแบบ 2 เท่า โดยดูดสารสกัดจากหลอดที่ 2 ลงหลอดที่ 3 และจากหลอดที่ 3 ไปหลอดที่ 4 ทำเช่นนี้จนถึงหลอดที่ 9 ให้ดูดสารสกัดทิ้งไป และใส่เชื้อที่ทำการเพาะในอาหาร NB หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมผลบวก (Positive control) จะใส่เพียงอาหาร TSB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เท่านั้น ส่วนชุดควบคุมผลลบ (Negative control) จะเป็นหลอดที่ 10 ที่อาหาร TSB ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ *Xanthomonas* sp.

ในอาหาร NB ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บันทึกผลโดยอ่านค่า MIC ของสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (de Oliveira., et al., 2016)

4.4 การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC)

นำหลอดที่มีค่า MIC ของสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ มาทำการเพาะเลี้ยงเชืบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.5 การทดสอบกิจกรรมในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (Antagonistic activity)

นำ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ ปริมาตร 1 หลงถ่ายเชื้อ มาทำการเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรโดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้มาทำการเตรียมหัวเชื้อในอาหาร NB ผสม CuCl_2 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นใช้ไม้พ่นสาเก็จมูมนำตัวเชื้อ *Xanthomonas* sp. แล้วป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารทั้ง 2 สูตร คือ อาหาร MHA และอาหาร NA ทั้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 15-20 นาที ในแต่ละสูตรจะทำการทดลอง 2 แบบ คือ แบบที่ 1 ใช้คอร์กบอลเบอร์ขนาด 8 มิลลิเมตร กดลงอาหารให้เป็นหลุม 2 หลุม ห่างกัน 5 เซนติเมตร โดยหลุมที่ 1 เป็นชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร และหลุมที่ 2 เป็นเชื้อ *Pseudomonas* sp. ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แบบที่ 2 ใช้ แผ่นกระดาษกรองทรงกลมปลอดเชื้อขนาด 6 มิลลิเมตร วางลงบนอาหาร 2 จุด ห่างกัน 5 เซนติเมตร โดยจุดที่ 1 เป็นตัวแปรควบคุม (Control) ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และจุดที่ 2 เป็น *Pseudomonas* sp. ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลสังเกตดูบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็นหน่วยมิลลิเมตร (Huang., et al., 2012)

4.6 การนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์โดยการฉีดพ่นทางใบ

ตัวอย่างต้นมะนาวสายพันธุ์แป้นพิจิตรเป็นกิ่งตอน ระยะออกผล ที่มีการปลูกในถุงดำขนาด 12x24 นิ้ว ในสภาวะปกติ เป็นต้นที่ปลอดโรค และมีการรดน้ำตามความเหมาะสมหรือตามความต้องการของพืช ในการทดลองนี้มีการทดลองสองแบบคือ ปักจี้เพื่อป้องกัน (Preventive) และปักจี้เพื่อควบคุม (Curative) จำนวน 3 ซ้ำ เริ่มการทดสอบด้วยการใช้หลอดฉีดยาที่ทำการถอดเข็มฉีดยาออกแล้ว กดลงบนใบมะนาวที่มีมอรองรืออยู่ด้วยหลังของใบให้เกิดรอยชำ เพื่อสร้างบาดแผลให้เชื้อก่อโรคสามารถเข้าไปภายในเนื้อเยื่อพืชได้ดีขึ้น โดยทำการเลือกใบมะนาวที่นับจากยอดลงมาลำดับที่ 4 หรือ 5 ใบละ 2 รอย ซึ่งวิธีการและเตรียมตัวอย่างเชื้อโดยนำ *Xanthomonas* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปักจี้เพื่อป้องกันจะทำการฉีดพ่นสารสกัด ปริมาตรต้นละ 5 มิลลิลิตร ทั้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการฉีดพ่น *Xanthomonas* sp. ปริมาตรต้นละ 5 มิลลิลิตร ปักจี้เพื่อควบคุมจะทำการฉีดพ่น *Xanthomonas* sp. ปริมาตรต้นละ 5 มิลลิลิตร ทั้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการฉีดพ่นสารสกัด ปริมาตรต้นละ 5 มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมผลบจะทำการฉีดพ่นเพียงน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เท่านั้น ส่วนชุดควบคุมผลบจะทำการฉีดพ่น *Xanthomonas* sp. ปริมาตรต้นละ 5 มิลลิลิตรเท่านั้น ทำการเก็บผลโดยสังเกตลักษณะบาดแผลที่เกิดขึ้น (Chen., et al., 2012)

ผลการวิจัย

การคัดแยกและการระบุชื่อ *Xanthomonas* sp. และ *Pseudomonas* sp.

จากการทดลองผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างใบมะนาวสายพันธุ์แป้นพิจิตรที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มมาทำการเกลี่ยกระจายเชื้อบนจานอาหารที่แตกต่างกัน โดยการคัดแยกเชื้อ *Xanthomonas* sp. จะใช้อาหาร YDC และอาหาร mYDC ส่วน *Pseudomonas* sp. จะใช้อาหาร NA ที่ผสม CuCl_2 ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) และอาหาร NA ที่ผสม NaCl ความเข้มข้น 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) หลังจากการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน สามารถแยกเชื้อตามลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันได้ดังนี้ แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหาร YDC มีทั้งหมด 6 ลักษณะ กำหนดเป็นรหัส ดังนี้ X.1, X.2, X.3, X.4, X.5 และ X.6 ซึ่งแต่ละชนิดมีลักษณะสัญญาณที่แตกต่างกัน คือ รหัส X.1 มีโคโลนีสีเหลืองขุ่น มีการสร้างแก๊ส และเป็นเมือก รหัส X.2 มีโคโลนีสีขาวขุ่น คล้ายรา รหัส X.3 มีโคโลนีสีเหลืองส้ม ขนาดเล็กและมันวาว รหัส X.4 มีโคโลนีสีครีม ขนาดเล็ก มันวาว รหัส X.5 มีโคโลนีสีขาวขุ่น เกิดเป็นกลุ่ม มีบริเวณใสล้อมรอบโคโลนี และรหัส X.6 มีโคโลนีสีขาวขุ่น มีบริเวณใสล้อมรอบโคโลนี แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหาร mYDC มีเพียงลักษณะเดียวที่ปรากฏ ซึ่งได้กำหนดรหัสเป็น mX.1 หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน มีโคโลนีใสไม่มีสี หลังจากนั้นจะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหาร NA ที่ผสม CuCl_2 ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีทั้งหมด 2 ลักษณะ กำหนดเป็นรหัส ดังนี้ CPs.1 และ CPs.2 ซึ่งมีลักษณะสัญญาณที่แตกต่างกัน คือ CPs.1 มีโคโลนีสีเหลืองขุ่น ตรงกลางสีน้ำตาล มันวาว และ CPs.2 มีโคโลนีสีเหลืองอ่อน แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหาร NA ที่ผสม NaCl ความเข้มข้น 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีทั้งหมด 3 ลักษณะ กำหนดเป็นรหัส ดังนี้ NPs.1, NPs.1 และ NPs.2 ซึ่งแต่ละชนิดมีลักษณะสัญญาณที่แตกต่างกัน คือ NPs.1 มีโคโลนีสีเหลืองขนาดเล็ก NPs.2 มีโคโลนีสีเหลืองขนาดใหญ่ และ NPs.3 มีโคโลนีสีขาวขุ่น

ตารางที่ 1 แสดงผลทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้

เชื้อที่คัดแยกได้	รูปร่างและการติดสีแกรม	การเจริญบนอาหาร 4% NaCl	การเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต	การทดสอบ TSI	การทดสอบ OF
X.1	Rod -	+	-	K/AG-	F
X.2	Rod +	+	-	nc	O
X.4	Rod +	-	-	nc	O
X.5	Cocci -	+	-	K/A-	F
X.6	Rod +	+	-	K/A-	F
mX.1	Rod -	+	-	K/AG-	F
CPs.1	Rod -	+	-	K/AG-	F
CPs.2	Rod -	+	-	K/K-	O
NPs.1	Rod +	+	-	K/K-	O
NPs.2	Cocci -	+	-	K/A-	F
NPs.3	Cocci -	+	-	K/AG-	F

หมายเหตุ : [Rod -] = แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน, [Rod +] = แบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน, [Cocci -] = แบคทีเรียแกรมลบ รูปกลม, TSI = Triple Sugar Iron, [K/A-] = ปลายหลอดทดลองสีแดง ก้นหลอดทดลองสีเหลือง, [A/A-] = สีเหลืองทั้งหลอด, [K/AG-] = ปลายหลอดทดลองสีแดง ก้นหลอดทดลองสีเหลือง มีแก๊ส ไม่มี H₂S, [K/K-] = สีแดงทั้งหลอดทดลอง, nc = ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Not change), OF = Oxidation Fermentation test, O = Oxidation, F = Fermentation

เมื่อนำเชื้อที่ทำการคัดแยกได้ทั้งหมดมาทำการระบุชื่อ ด้วยวิธีการย้อมสีแกรม ทดสอบการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ผสม NaCl ความเข้มข้น 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทดสอบการเรืองแสง ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต และการทดสอบด้วยวิธีการทางชีวเคมีทั้งหมด 2 วิธีการคือ การทดสอบ TSI และการทดสอบ OF แสดงผลดังตารางที่ 1 และการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยจะนำเชื้อที่ทำการคัดแยกได้มาทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะทั้งหมด 2 ชนิด คือ Bacitracin ความเข้มข้น 0.4 ยูนิตต่อแผ่น และ Chloramphenicol ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น แสดงผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อที่คัดแยกได้

เชื้อที่คัดแยกได้	ยาปฏิชีวนะ	
	Bacitracin (0.4 ยูนิต)	Chloramphenicol (30ไมโครกรัม)
<i>Xanthomonas</i> sp.	R	S
<i>Pseudomonas</i> sp.	R	R
X.1	R	S
X.2	R	S
X.3	S	S
X.4	S	S
X.5	R	S
X.6	R	S
mX.1	R	S
CPs.1	R	S
CPs.2	R	S
NPs.1	R	S
NPs.2	R	S
NPs.3	R	S

หมายเหตุ: R = Resistant (ดื้อยา), S = Susceptible (ไวต่อยา)

จากผลการพิสูจน์เพื่อระบุชื่อเชื้อที่คัดแยกได้ โดยวิธีการต่างๆ ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติใกล้เคียง *Xanthomonas* sp. มากที่สุดทั้งหมด 3 ชนิด คือ X.1, mX.1 และ CPs.1 ซึ่งทั้งหมดแสดงผลการระบุชื่อคล้ายคลึงกัน ดังนั้น เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน สามารถเจริญได้บนอาหาร NA ที่ผสม NaCl ความเข้มข้น 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ไม่สามารถเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตได้ จากการทดสอบด้วยวิธีการทางชีวเคมี ทั้งหมด 2 วิธีการคือ การทดสอบ TSI แสดงผลเป็น K/AG- (ปลายหลอดทดลองสีแดง ก้นหลอดทดลองสีเหลือง มีแก๊ส ไม่มี H₂S และ การทดสอบ OF แสดงผลเป็น F (Fermentation) (ตารางที่ 1) ผลจากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด พบว่าเมื่อทดสอบกับยาปฏิชีวนะ Bacitracin ความเข้มข้น

0.4 ยูนิตต่อแผ่น แสดงผลเป็น R (ดื้อยา) และยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น แสดงผลเป็น S (ไวต่อยา) (ตารางที่ 2) จากคุณสมบัติของเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งสามชนิดข้างต้นผู้วิจัยได้สันนิษฐานว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน คือ *Xanthomonas* sp. จึงทำการทดสอบด้วยการเพาะเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งสามชนิด ได้แก่ X.1, mX.1 และ CPs.1 ลงบนอาหาร YDC และ mYDC ซึ่งผลการทดสอบคือเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งสามชนิดมีโคโลนีลักษณะเดียวกัน โดยลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารทั้งสองสูตรสอดคล้องกับลักษณะโคโลนีของเชื้อ X.1 บนอาหาร YDC และลักษณะโคโลนีของเชื้อ mX.1 บนอาหาร mYDC ที่ได้ทำการคัดแยกตั้งแต่ขั้นตอนแรก จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อ CPs.1 ที่คัดแยกได้จากอาหาร NA ที่ผสม CuCl_2 ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ใช้สำหรับคัดแยก *Pseudomonas* sp. ผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่า *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้สามารถเจริญบนอาหารที่มีส่วนผสมของ Cu ได้ จึงทำการทดสอบโดยนำ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้มาทำการเพาะเชื้อลงบนอาหาร 2 สูตร คืออาหาร NA ที่ผสม CuCl_2 ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) และอาหาร NA ที่ผสม Cu(OH)_2 ที่เป็นองค์ประกอบในยากำจัดโรคแคงเกอร์มีชื่อทางการค้าว่า Funguran ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่า *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกสามารถเจริญได้บนอาหารทั้ง 2 สูตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ de Oliveira et al., (2011) ที่ทำการทดสอบการเจริญของ *X. citri* pv. *citri* บนอาหาร NA ที่มีปริมาณความเข้มข้นของ CuCl_2 ที่แตกต่างกัน ซึ่งในระดับความเข้มข้นของ CuCl_2 ที่ 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) นั้นปรากฏว่า *X. citri* pv. *citri* สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากยังมีความเข้มข้นไม่มากพอที่จะยับยั้งการเจริญของ *X. citri* pv. *citri* และสาเหตุที่ Cu ยับยั้งการเจริญของ *X. citri* pv. *citri* ได้นั้นในงานวิจัยของ Favaro et al. (2017) อธิบายว่าเมื่อเชื้อก่อโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มได้แพร่กระจายและไปเกาะอยู่บนพื้นผิวของพืช เชื้อจะทำการก่อตัวด้วยการสร้าง Biofilm ขึ้น และเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและอยู่รอด เชื้อจะเข้าไปภายในเนื้อเยื่อพืชและก่อโรค จะเห็นได้ว่าการก่อตัวของฟิล์มชีวภาพมีผลต่อความรุนแรงของโรคแคงเกอร์ และ Cu สามารถช่วยลดการสร้างฟิล์มชีวภาพได้ จึงทำให้สามารถยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์ได้ เมื่อนำ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้มาทำการทดสอบการก่อโรคกับต้นมะนาว โดยนำมาทำการทดสอบกับต้นมะนาวสายพันธุ์แป้นพิจิตรเป็นกิ่งตอน ระยะให้ผลได้ ที่มีการปลูกในถุงดำขนาด 12 x 24 นิ้ว ในสภาวะปกติ เป็นต้นที่ปลอดโรค โดยใช้ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้มีความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร ทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีการใช้ฉีดพ่น *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ บาดแผลที่เกิดจากการใช้หลอดฉีดยาที่ทำการถอดเข็มฉีดยาออกแล้ว กดลงบนใบมะนาวที่มีมีร่องรอยด้วยหลังของใบให้เกิดรอยชำ หลังจากทำการถ่ายเชื้อเป็นเวลา 20 วัน พบว่าพืชแสดงอาการของโรคแคงเกอร์และเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลที่ทำการถ่ายเชื้อจะหลุดออกไป และบริเวณขอบรอบแผลมีสีเหลืองเล็กน้อย ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบด้วยวิธีการนำใบมะนาวบริเวณที่ได้ทำการถ่ายเชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้มาทำการฟอกฆ่าเชื้อและทำการเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร mYDC เพื่อสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อที่ยังสามารถอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชได้ ซึ่งถ้าหากเป็น *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้จะมีลักษณะโคโลนีที่ใส ไม่มีสี ดังผลการคัดแยกเชื้อบนอาหาร mYDC ที่สามารถคัดแยกเชื้อได้เพียงลักษณะเดียวดังที่ได้กล่าวข้างต้น หลังจากการทดลองพบว่ามีลักษณะโคโลนีของ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้เกิดขึ้น จึงสามารถยืนยันได้ว่า *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้สามารถอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชได้ และแสดงการก่อโรคได้

จากผลการพิสูจน์เพื่อระบุเชื้อที่คัดแยกได้ โดยวิธีการต่างๆ ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติใกล้เคียง *Pseudomonas* sp. มากที่สุด คือ CPs.2 ซึ่งแสดงผลการระบุชื่อ ดังนี้ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ผสม NaCl ความเข้มข้น 4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ไม่สามารถเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตได้ จากการทดสอบด้วยวิธีการทางชีวเคมี ทั้งหมด 2 วิธีการคือ

การทดสอบ TSI แสดงผลเป็น K/K (สีแดงทั้งหลอดทดลอง) และการทดสอบ OF แสดงผลเป็น O (Oxidation) (ตารางที่ 1) ผลจากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด พบว่าเมื่อทดสอบกับยาปฏิชีวนะ Bacitracin ความเข้มข้น 0.4 ยูนิต์ต่อแผ่น แสดงผลเป็น R (ดื้อยา) และยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น แสดงผลเป็น S (ไวต่อยา) (ตารางที่ 2) เนื่องจากผู้วิจัยมีความสนใจใน *Ps. aeruginosa* ที่ได้มีการค้นพบและศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของยาปฏิชีวนะกลุ่มสารประกอบโลหะอินทรีย์ทองแดง (Organocopper antibiotic compound) จากงานวิจัยของ de Oliveira., et al. (2016) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *X. citri* subsp. *citri* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม เพื่อเป็นการยืนยันความเป็น *Ps. aeruginosa* ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบด้วยวิธีการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้กับยาปฏิชีวนะอีกทั้งหมด 4 ชนิด คือ Imipenem ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อแผ่น, Ceftazidime ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น, Ciprofloxacin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อแผ่น และ Gentamicin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อแผ่น พบว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้ไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptible) ทั้ง 4 ชนิด (ตารางที่ 3) ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกนั้นไม่ใช่ *Ps. aeruginosa* โดยเชื้อ *Ps. aeruginosa* จะดื้อต่อยาต่อยาปฏิชีวนะ (Resistant) ทุกชนิด

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้เพื่อยืนยันความเป็น *Ps. Aeruginosa*

ยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้นต่อแผ่นยา	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPs.2			
		บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ขีดจำกัด (มิลลิเมตร)	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	แสดงผล
Imipenem	10 ไมโครกรัม	22	20-28	38.33	S
Ceftazidime	30 ไมโครกรัม	27	22-29	31.33	S
Ciprofloxacin	5 ไมโครกรัม	30	25-33	42.67	S
Gentamicin	10 ไมโครกรัม	18	17-23	27.67	S

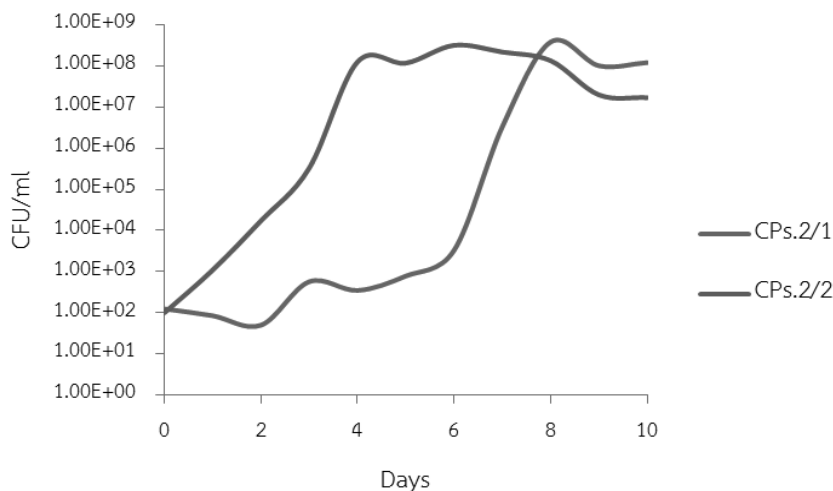
หมายเหตุ: S = Susceptible (ไวต่อยา)

ผู้วิจัยจึงนำ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้ส่งตรวจเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Ps. oryzihabitans* และ *Ps. phychrotolerans* มีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าผู้วิจัยสามารถคัดแยก *Pseudomonas* sp. ได้ ซึ่งจากการศึกษาเพื่อหารายงานที่ทำการศึกษาศักยภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อทั้ง 2 ชนิด พบว่า *Ps. oryzihabitans* มีสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ตามงานวิจัยของ Bhagat et al. (2016) ที่ศึกษาการทำเอนไซม์ Asparaginase ให้บริสุทธิ์แบบขั้นตอนเดียวจาก *Ps. oryzihabitans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช โดยแสดงศักยภาพในการลด Acrylamide ในมันฝรั่งแปรรูป โดยเอนไซม์ Asparaginase จาก *Ps. oryzihabitans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่ทำการคัดแยกจากขบา (*Hibiscus rosa-sinensis*) จากรายงานการวิจัยนี้ *Ps. oryzihabitans* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สอดคล้องกับงานวิจัยของผู้วิจัยที่ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *Pseudomonas* sp. มาจาก

เนื้อเยื่อพืชเช่นกัน ส่วน *Ps. phytocholerans* นั้นยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแต่อย่างใด

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการทดลองผู้วิจัยได้นำ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้มาทำการเลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสม CuCl_2 ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ โดยกำหนดรหัสการทดลองซ้ำที่ 1 คือ CPs.2/1 และการทดลองซ้ำที่ 2 คือ CPs.2/2 ทำการติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตตลอดระยะเวลา 10 วัน แสดงผลดังภาพที่ 1 แสดงการเจริญของ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้ในซ้ำที่ 1 มีการเจริญของเชื้อที่ช้ากว่าซ้ำที่ 2 ซึ่งมีระยะพัก (Lag phase) ค่อนข้างนาน จนเริ่มมีระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Log phase) ในวันที่ 6 และมีระยะคงตัวจำนวนเซลล์คงที่ (Stationary phase) ในวันที่ 8 จนครบ 10 วัน ซึ่งมีระยะคงที่สั้นมาก ส่วนการเจริญของ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้ในซ้ำที่ 2 จะมีการเจริญเติบโตได้ดี ไม่มีระยะพัก และพบการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ แบบระยะแบ่งตัวทวีคูณตั้งแต่วันที่ 1 - 4 มีระยะคงตัวจำนวนเซลล์ ในวันที่ 5 - 8 และยังเริ่มมีระยะเซลล์ตาย (Death phase) ในวันที่ 9 จนครบ 10 วัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเจริญของ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้ในซ้ำที่ 1 และ 2 นั้นมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะมีการเจริญในระยะคงตัวจำนวนเซลล์ที่ต่างกันอาจส่งผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งตามหลักการของการสร้างสารเมแทบอไลต์ (Metabolite) ของจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น จะต้องมีการเจริญในระยะคงตัวเป็นเวลานาน



ภาพที่ 1 แสดงการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้ในอาหาร NB ที่ผสม CuCl_2 ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตลอดระยะเวลา 10 วัน

นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการกรองเพื่อให้ได้ของเหลวที่ผ่านการกรอง ซึ่งเป็นของเหลวที่ได้จากการกรองเซลล์แบคทีเรียของ *Pseudomonas* sp. ในอาหาร NB ที่ผสม CuCl_2 ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ออกไปเหลือเพียงอาหารและผลิตภัณฑ์จากเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำไปผสมกับอาหาร NA โดยมีความเข้มข้นของของเหลวที่ผ่านการกรอง คือ 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดสอบการเจริญของ

เชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ พบว่า *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้สามารถเจริญได้บนอาหาร NA ที่ผสม ของเหลวที่ผ่านการกรองได้

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้ในอาหาร NB ที่ผสม CuCl_2 ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ครบ 10 วัน จึงทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน นำของเหลวที่อยู่เหนือตะกอนมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 สูตร ดังนี้ สูตรแรกผสมของเหลวที่อยู่เหนือตะกอนกับตัวทำละลายคือ Dichloromethane(d)/Ethyl acetate(e) (1:1) โดยอัตราส่วน 1 : 2 ทำการสกัดทั้งหมด 5 ครั้ง กำหนดรหัสของสารสกัด คือ d : e CPs.2/1 และ d : e CPs.2/2 สูตรที่สองผสมของเหลวที่อยู่เหนือตะกอนกับตัวทำละลายคือ Ethyl acetate โดยอัตราส่วน 1 : 1 ทำการสกัดทั้งหมด 10 ครั้ง กำหนดรหัสของสารสกัด คือ e CPs.2/1 และ e CPs.2/2 หลังจากทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้วจะทำให้ได้สารสกัดสองส่วนคือ สารสกัดส่วนของชั้นที่ไม่มีขี้ และสารสกัดส่วนของชั้นที่มีขี้

การวิเคราะห์สารสกัด

นำสารสกัดส่วนของชั้นที่ไม่มีขี้ทำให้มีความเข้มข้นสูงโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารสุญญากาศ โดย d : e CPs.2/1 และ d : e CPs.2/2 ใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันลดต่ำลง ส่วน e CPs.2/1 และ e CPs.2/2 ใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันที่ลดต่ำลง จากนั้นทำการอบด้วยอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อให้สารละลายสามารถระเหยออกไปให้ได้มากที่สุดจึงทำให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นดังนี้ d : e CPs.2/1 เข้มข้น 5.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, d : e CPs.2/2 เข้มข้น 3.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, e CPs.2/1 เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ e CPs.2/2 เข้มข้น 2.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำสารสกัดในส่วนของชั้นที่มีขี้ทั้งหมดคือ d : e CPs.2/1, d : e CPs.2/2, e CPs.2/1 และ e CPs.2/2 กรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร และเจือจางกับอาหาร NA ที่ความเข้มข้น 50 % (ปริมาตร/ปริมาตร) จากนั้นนำ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ทำการลากเชื้อลงในอาหารพบว่า สารสกัด e CPs.2/2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ (ภาพที่ 2 ง.) ทำให้ทราบถึงการเจริญของเชื้อจากภาพที่ 1 นั้นมีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะโดย CPs.2/2 มีช่วงการเจริญในระยะคงตัวที่ยาวนาน ทำให้สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาได้มาก ดังนั้นเชื้อที่ CPs.2 ที่คัดแยกได้จึงเป็นเชื้อที่มีศักยภาพในการนำไปผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยศึกษารูปแบบการเพาะเลี้ยง เช่น การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous culture) เพื่อให้คงระยะคงตัวให้ยาวนานขึ้น เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณมากก่อนนำไปทำการสกัดหรือทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นผู้วิจัยจึงนำสารสกัดสารสกัด e CPs.2/2 ไปทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันลดต่ำลง ทำให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นขึ้นโดยประมาณ 2 เท่า จากนั้นนำไปทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค

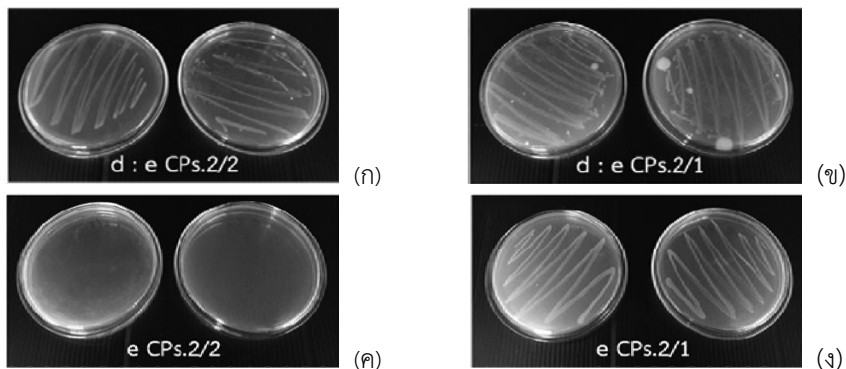
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค

การทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดด้วยวิธีการ การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยทำการถ่ายสารสกัดลงแผ่นยาปลดเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อแผ่นยา วางลงบนอาหาร NA ที่ทำการป้ายเชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร ด้วยไม้พินสาลี พบว่าสารสกัดส่วนของชั้นที่ไม่มีขี้ทุกสูตรไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ ส่วนสารสกัดส่วนของชั้นที่มีขี้สูตร e CPs.2/2 ที่เป็นเพียงสูตรเดียวของสารสกัดส่วนที่มีขี้ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ มีค่าบริเวณยับยั้งที่ 10.33 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4, ภาพที่ 3)

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ (Disk Diffusion Method)

กลุ่มสารสกัด	สารสกัด	ความเข้มข้น	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)
ไม่มีหัว	d : e CPs.2/1	5.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	-
	d : e CPs.2/2	3.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	-
	e CPs.2/1	1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	-
	e CPs.2/2	2.9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	-
มีหัว	e CPs.2/2	100%	10.33

หมายเหตุ: ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ, (-) = ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง, (d) Dichloromethane, (e) Ethyl acetate (e)



ภาพที่ 2 การเจริญของ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้บนอาหาร NA ที่ผสมสารสกัดส่วนของชั้นที่มีหัว ที่ความเข้มข้น 50 % (v/v) (น) d : e CPs.2/1 (ข) d : e CPs.2/2 (ค) e CPs.2/1 (ง) e CPs.2/2

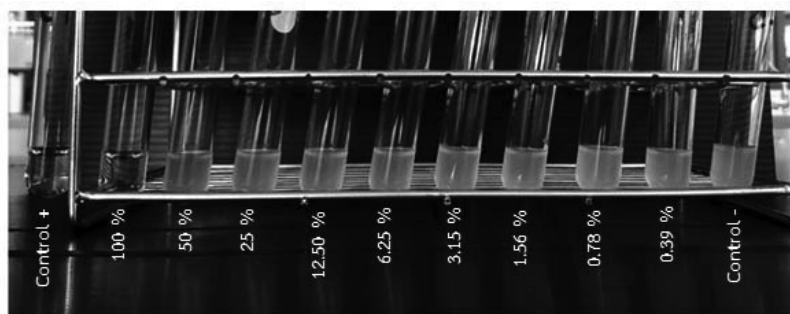


ภาพที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดส่วนของชั้นที่มีหัวสูตร e CPs.2/2 ต่อการยับยั้ง *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้

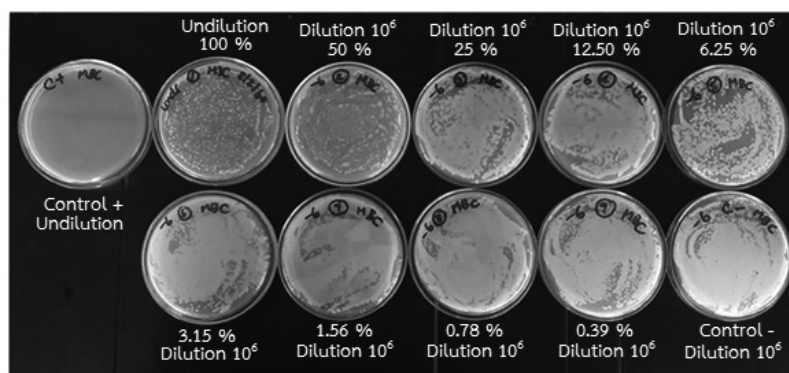
การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC)

เมื่อนำสารสกัดส่วนของชั้นที่มีหัวสูตร e CPs.2/2 มาทำการทดสอบค่า MIC ของ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ โดยทำการเจือจางสารสกัดแบบ 2 เท่า มีความเข้มข้นของสารสกัดตามลำดับ ดังนี้ 100 เปอร์เซ็นต์, 50 เปอร์เซ็นต์, 25 เปอร์เซ็นต์, 12.50 เปอร์เซ็นต์, 6.25 เปอร์เซ็นต์, 3.15 เปอร์เซ็นต์, 1.56 เปอร์เซ็นต์, 0.78 เปอร์เซ็นต์ และ 0.39 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งชุดควบคุมผลบวกจะใส่เพียงอาหาร TSB เท่านั้น

ส่วนชุดควบคุมผลจะเป็นอาหาร TSB เชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ พบว่านำหลอดที่มีค่า MIC ของสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ คือ หลอดที่มีความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4 ก.) จากนั้นจึงทำการทดสอบความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารวุ้น พบว่าสารสกัดส่วนที่มีขั้วสูตร e CPs.2/2 ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารสกัดลดลง พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดลดลง *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้มีการเจริญได้มากขึ้นตามลำดับ (ภาพที่ 4 ข.)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด (ก) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC)
(ข) ความเข้มข้นต่ำสุดของยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC)

การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ (Antagonistic activity)

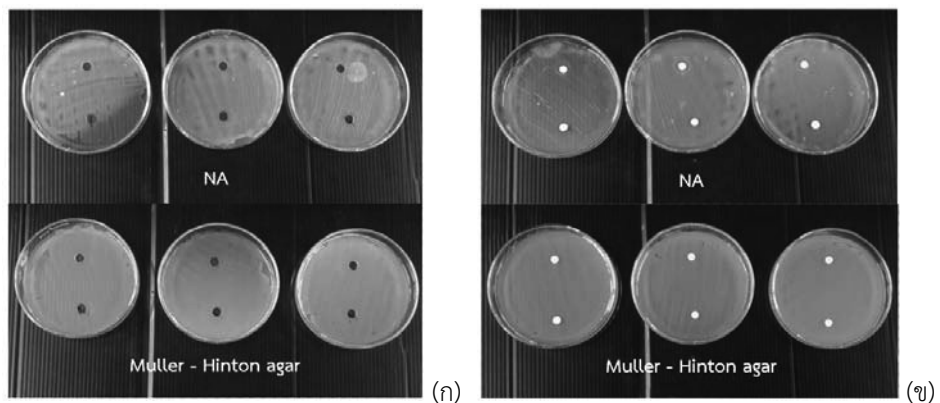
นำ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้มาทำการเตรียมหัวเชื้อในอาหาร NB ผสม CuCl_2 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน และมีความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการถ่ายเชื้อลงหลุมคอร์กบอเลอร์ ขนาด 8 มิลลิเมตร (ภาพที่ 5 ก.) และแผ่นกระดาษกรองทรงกลมปลอดเชื้อขนาด 6 มิลลิเมตร (ภาพที่ 5 ข.) บนอาหาร MHA และอาหาร NA ที่ทำการป้าย *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร ด้วยไม้พันสำลีพบว่า *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้ไม่สามารถยับยั้ง *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้

การนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์โดยการฉีดพ่นทางใบ

ทำการทดสอบกับตัวอย่างต้นมะนาวสายพันธุ์แป้นพิจิตรเป็นกิ่งตอน ระยะออกผล ที่มีการปลูกในถุงดำขนาด 12 x 24 นิ้ว ในสภาวะปกติ เป็นต้นปลอดโรค และมีการรดน้ำตามความเหมาะสมหรือตามความ

ต้องการของพืช เริ่มการทดสอบด้วยการใช้หลอดฉีดยาที่ทำการถอดเข็มฉีดยาออกแล้ว กดลงบนใบมะนาวที่มีมีร่องรอยอยู่ด้วยหลังของใบให้เกิดรอยชำ เพื่อสร้างบาดแผลให้เชื้อก่อโรคสามารถเข้าไปภายในเนื้อเยื่อพืชได้ดีขึ้นโดยการเลือกใบมะนาวที่นับจากยอดลงมาลำดับที่ 4 หรือ 5 ใบละ 2 รอย โดยใช้การทดลองสองแบบคือ ปักจี้เพื่อการป้องกันจะทำการฉีดพ่นสารสกัด ทั้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการฉีดพ่น

Xanthomonas sp. ที่คัดแยกได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร และปักจี้เพื่อการควบคุมจะทำการฉีดพ่น *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ทั้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการฉีดพ่นสารสกัด โดยชุดควบคุม ผลผลจะทำการฉีดพ่นสารสกัดเท่านั้น ส่วนชุดควบคุมผลบวกจะทำการฉีดพ่น *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้เท่านั้นจำนวน 3 ซ้ำ หลังครบระยะเวลา 20 วัน



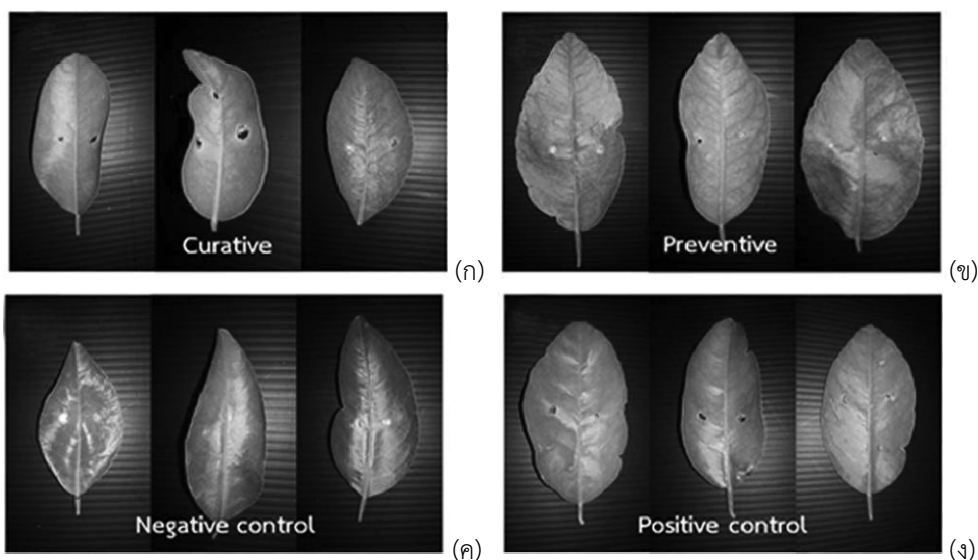
ภาพที่ 5 ผลการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ (ก) แบบที่ 1 ใช้คอร์กบอร์ขนาด 8 มิลลิเมตร (ข) แบบที่ 2 แผ่นกระดาษกรองทรงกลมปลอดเชื้อขนาด 6 มิลลิเมตร

พบว่าพืชมีการแสดงอาการของโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มในทุก ๆ ปักจี้ แต่มีความแตกต่างของลักษณะบาดแผลที่เกิดขึ้น คือ ในปักจี้เพื่อการป้องกันที่ทำการฉีดพ่นสารสกัดลงไปก่อนการฉีดพ่น *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ (ภาพที่ 6 ก) และชุดควบคุมผลลบ ที่ทำการฉีดพ่นสารสกัดลงไปเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 6 ค) พบว่าลักษณะบาดแผลจะแตกต่างจากปักจี้เพื่อการควบคุมที่ทำการฉีดพ่น *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ลงไปก่อนการฉีดพ่นสารสกัด (ภาพที่ 6 ข) และชุดควบคุมผลบวกที่ทำการฉีดพ่นเชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 6 ง) เนื่องจากส่วนใหญ่เนื้อเยื่อบริเวณที่มีการทำให้เกิดรอบช้ำนั้นไม่มีการหลุดออกไป เนื้อเยื่อจะยังมีการเกาะติดอยู่ ส่วนปักจี้เพื่อการควบคุม และชุดควบคุมเชิงบวกพบว่าเนื้อเยื่อบริเวณรอยแผลที่มีการกดให้เกิดรอยช้ำนั้นมีการหลุดออกไป แสดงผลเช่นเดียวกับการทดสอบการก่อโรคกับต้นมะนาวของ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้

อภิปรายผล

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถสารคัดแยกเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *Xanthomonas* sp. จากใบมะนาวสายพันธุ์แป้นพิจิตร (*C. aurantifolia* Swingle) ที่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มได้นำเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้มาทำการศึกษการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยทำการเลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสม CuCl_2 ความเข้มข้น 0.01 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน พบว่าการเจริญของ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้มีการเจริญในระยะคงตัว (Stationary phase) ยาวนานส่งผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งตามหลักการของ

การสร้างสารเมแทบอลิท์ของจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น จะต้องมีการเจริญในระยะคงตัวเป็นเวลานาน สอดคล้องกับผลการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยสารสกัดส่วนที่มีขั้วสูตร e CPs.2 ที่ทำการสกัดด้วย Ethyl acetate เพียงสูตรเดียวที่แสดงการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ มีความเข้มข้นยาต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ หรือความเข้มข้นสูงสุดที่ยังไม่ทำการเจือจาง จากนั้นจึงทดสอบความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารร่วน (MBC) พบว่าสารสกัดไม่มีศักยภาพมากพอที่จะทำให้เชื้อก่อโรคตายได้ ส่วนผลการควบคุมโดยวิธีชีวภาพในแปลงทดลองพบว่าเชื้อ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้สามารถก่อโรคแคงเกอร์และพบการอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช



ภาพที่ 6 ผลการนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์ทางใบ (ก) ปักจี้เพื่อป้องกัน (Preventive)

(ข) ปักจี้เพื่อการ ควบคุม (Curative) (ค) ชุดควบคุมผลลบ (Negative control)

(ง) ชุดควบคุมผลบวก (Positive control)

หลังจากการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้โดยการฉีดพ่นทางใบพบลักษณะของบาดแผลที่มีลักษณะแตกต่างจากการไม่ใช้สารสกัด นอกจากนี้ผลจากการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ (Antagonistic activity) แสดงให้เห็นว่า *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้หากไม่ได้ทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้ สอดคล้องกับการทดสอบการเจริญของ *Xanthomonas* sp. ที่คัดแยกได้บนอาหาร NA ที่ผสมกับของเหลวที่ผ่านการกรอง ดังนั้นจากการศึกษาความสามารถของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการกำจัดโรคแคงเกอร์ในแปลงทดลองที่สภาวะแวดล้อมปกติถือว่าประสบความสำเร็จ แต่ยังคงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาศักยภาพของสารสกัดให้มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ที่มีส่วนในการสนับสนุนให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- การปลูกมะนาวในประเทศไทย. (2558). [Online]. Available : <http://www.Rakbankerd.com/agriculture/page.php?id=1735&s=tblplant>. [2559, ตุลาคม 15].
- ณรงค์ แดงเปี่ยม และคนอื่นๆ. (2553). การทดสอบพันธุ์มะนาวลูกผสมต้านทานโรคแคงเกอร์ในท้องถิ่นภาคเหนือตอนล่าง. พิจิตร : ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร.
- ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. (2548). มะนาว. กรุงเทพฯ : นาคา อินเตอร์ มีเดีย.
- พิชญาพร สีเข้ม, จินดา ขลิบทอง และภรณ์ ต่างวิวัฒน์. (ม.ป.ป.). สภาพการผลิตส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาของเกษตรกรในจังหวัดชัยนาท. วิทยานิพนธ์เกษตรศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.
- ภาคณ ศรัคาลัย. (2558). แคงเกอร์. [Online]. Available : http://paccapon.blogspot.com/2015/07/blogpost_28.html?m=1. [2559, ตุลาคม 15].
- วิชัย ศุภลักษณ์, เศรษฐสิทธิ์ แสงโสมณจิตร และกัญญา จิระเจริญรัตน์. (2552). การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่โดยวิธีทางชีวโมเลกุล. กรุงเทพฯ : คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ศศิธร วุฒินิชย์. (2549). โรคของผักและการควบคุมโรค. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เศรษฐกิจและพยากรณ์ทางการเกษตร, ศูนย์วิจัย. (2555). เอกสารแสดงผลการสำรวจปัญหาของเกษตรกรเรื่องสาเหตุของผลผลิตส้มที่ลดลงส่งผลให้ราคาเสื่อม. เชียงใหม่ : ศูนย์วิจัยเศรษฐกิจและพยากรณ์ทางการเกษตร.
- Chen, P.-S., et al. (2012). Understanding cellular defence in kumquat and calamondin to citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 79(Supplement C), 1-12.
- de Oliveira, A. G., et al. (2011). Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, 56(2), 125-131.
- _____. (2016). Bioactive Organocopper Compound from *Pseudomonas aeruginosa* Inhibits the Growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in Microbiology**, 7, 113.
- Favaro, M. A., et al. (2017). Relationships between copper content in orange leaves, bacterial biofilm formation and citrus canker disease control after different copper treatments. **Crop Protection**, 92(Supplement C), 182-189.
- Huang T-P., et al. (2012) DNA Polymorphisms and Biocontrol of *Bacillus* Antagonistic to Citrus Bacterial Canker with Indication of the Interference of Phyllosphere Biofilms. **PLoS ONE**7(7), e42124.
- Islam MA., et al. (2014). Isolation, identification and in-vitro antibiotic sensitivity pattern of citrus canker causing organism *Xanthomonas axonopodis*. **Adv. life sci**, 1(4), 215-222.
- Kalita, P., Bora, L. C. & Bhagabati, K.N. (1996). Phylloplane microflora of citrus and their role management of citrus canker. **Indian Phytopathology**, 49(3), 234-237.
- Schubert, T. S. & Sun, X. (2003). Bacterial Citrus Canker. **Plant Pathology Circular**, 37, 1-6.

- Spago, F. R., et al. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. **Crop Protection**, **62**(Supplement C), 46-54.
- You, J., et al. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. **Biological Control**, **101**(Supplement C), 31-38.