ฤทธิ์ทางชีวภาพของไซเดอโรฟอร์ต้านเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในต้นหอมแดง
Biological Activity of Siderophore Against Fungi Disease in Onion Leaves

สมหมาย ปะติตังโข [1]
กิ่งแก้ว ปะติตังโข [2]

บทคัดย่อ

สารไซเดอโรฟอร์เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดได้จากทั้งแบคทีเรีย รา และพืช แล้วนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น การแพทย์ และการเกษตร เป็นต้น การศึกษาในครั้งนี้ได้นำสารไซเดอโรฟอร์จากแบคทีเรียที่อยู่ในดินภูเขาไฟเขากระโดง มาเลี้ยงในอาหารเหลว SA ซึ่งมีแบคทีเรีย 2 ลักษณะ (สีขาวขุ่นและสีเหลือง) มาทำการสกัดสารไซเดอโรฟอร์ได้ไซเดอโรฟอร์ 2 กลุ่ม คือ ไซเดอโรฟอร์ชนิดไฮดรอกซาเมท และไซเดอโรฟอร์ชนิดแคทีคอล ทดสอบการต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดโรครากเน่า *(Sclerotium cepivorum)* โรคใบจุดสีม่วง *(Alternaria porri)* โรคปลายใบแห้ง *(Stemphylium borysum)* และโรคต้นเน่า *(Collectorichum circinans)* ที่เกิดขึ้นในต้นหอมแดง พบว่า ไซเดอโรฟอร์ชนิดไฮดรอกซาเมทสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคต้นเน่าและโรครากเน่าได้ดี แต่ไม่สามารถต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคใบจุดสีม่วงและปลายใบแห้ง ส่วนไซเดอโรฟอร์ชนิดแคทีคอลสามารถต้าน เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคใบจุดสีม่วงและโรคปลายใบแห้งได้ดี แต่ต้านเชื้อราโรคต้นเน่าได้น้อย

คำสำคัญ : ไซเดอโรฟอร์ แบคทีเรีย การต้านเชื้อราก่อโรคหอมแดง

Abstract

Siderophores are the naturally occurring compounds that extracted from certain bacteria, fungi, and some plants then tanked them up used for medicine, agriculture and so on. This work deals with selection of bacterial from Kaokadong national park mountain habitat at Buriram province incubated them in SA medium broth and then extraction of some siderophores classified into two groups; hydroxamate and catecholate siderophore, for preliminary screening as anti-fungal diseases of onion leaves. The result have shown that hydroxamate siderophore inhibited *Collectorichum circinans*, *Sclerotium cepivorum* Berk. with high spectrum but not show any activity to *Alternaria porri* and *Stemphylium borysum*, for catecholate siderophore show high activities to *Alternaria porri* and *Stemphylium borysum* but against *Collectorichum circinans* with less activity.

Keyword: Siderophore, Bacteria, Anti-Fungal Diseases of Onion Leaves

---

1 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
2 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาบรรณารักษศาสตร์และสารสนเทศศาสตร์ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

บทนำ

ประเทศไทยมีอาชีพเกษตรกรรมเป็นอาชีพหลักของคนส่วนใหญ่ ซึ่งแต่ละจังหวัดมีการปลูกพืชหลากหลายชนิด ดังเช่นในเขตอำเภอเมืองจังหวัดบุรีรัมย์ มีการปลูกต้นหอมในหลายหมู่บ้าน โดยแต่ละหมู่บ้านจะมีการรวมกลุ่มกัน เพื่อจัดจำหน่ายผลผลิตสู่ตลาด ต้นหอมซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจและสร้างรายได้หลักของคนแถบนี้ แต่การปลูกต้นหอมนั้นก็ยังประสบปัญหาต่าง ๆ มากมายที่สำคัญมากคือการเกิดโรคเนื่องจากเชื้อรา เช่น โรครา้ดำเกิดจากเชื้อรา *Aspergillus niger Van tiegh.*, โรคเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytris allii, B.byssoidea, B.squamosa*, โรคแอนแทรนโนส และโรคสมัดจ์ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum circinans* หรือ *Colletotrichum gloeosporioides*, โรคใบจุดสีม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria porri (Ell.) Cif.*, โรคหัวและรากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc. หรือ *Sclerotium cepivorum* Berk., โรครา้น้ำค้างที่เกิดจากเชื้อ *Peronosporadestructor* (Berk) Casp., โรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora duddiae*, โรคปลายใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Stemphylium borysum* เป็นต้น จนทำให้ต้นหอมที่ได้มีคุณภาพต่ำลงและส่งผลให้เกษตรกรต้องใช้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้นเพื่อที่จะคงระดับคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตรให้อยู่ในเกณฑ์ที่ดี เกษตรกรก็จะใช้สารเคมีในการกำจัดโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในพืช ซึ่งส่งผลตกค้างในผลผลิตที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและเกษตรกรผู้ทำการเพาะปลูกเอง อีกทั้งส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมด้วย จากการศึกษารวบรวมข้อมูล คณะผู้วิจัยพบว่า สารที่เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดหนึ่งที่เกิดจากความต้องการธาตุเหล็กของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อเจริญเติบโตอยู่ในสภาวะที่มีธาตุเหล็กจำกัด เนื่องจากธาตุเหล็กเป็นสารที่มีความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมหลายกระบวนการ และยังเป็นส่วนประกอบของเซลล์ มีผลต่อผลผลิตต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Neiland. 1989) ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียหรือรา ดังนั้นหากจุลินทรีย์เหล่านี้ขาดธาตุเหล็กหรือมีธาตุเหล็กน้อยมาก จุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้างกลไกพิเศษขึ้นมาเพื่อจับธาตุเหล็กและนำมาใช้ ดังนั้นจุลินทรีย์จำเป็นต้องผลิตสารเคมีขึ้นมา ซึ่งมีชื่อว่าไซเดอโรฟอร์ (Siderophore) (Braun and Braun. 2002; Braun and Killmann. 1999) ที่มีสมบัติทางเคมีแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ปล่อยไซเดอโรฟอร์ออกมาสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกเพื่อจับกับธาตุเหล็กแล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กไซเดอโรฟอร์ สารนี้จะถูกส่งผ่านเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์และนำธาตุเหล็กไปใช้ประโยชน์ต่อไป นอกจากนั้นเรายังสามารถนำมาพัฒนาทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีได้ โดยเฉพาะในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเนื่องจากเทคโนโลยีในด้านนี้ปัจจุบันกำลังเป็นที่น่าสนใจและมีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง ด้วยเหตุผลที่ว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้นั้นส่วนใหญ่จะไม่ ก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถเพิ่มผลผลิตได้อย่างรวดเร็ว และได้ทั้งปริมาณและจำนวนอีกด้วย ถ้าหากมีการศึกษาและพัฒนาอย่างจริงจังและมีประสิทธิภาพ จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา พบว่าไซเดอโรฟอร์มีความสามารถในการจับเหล็กได้เป็นอย่างดี แต่ขึ้นอยู่กับชนิดของ ไซเดอโรฟอร์ เช่น กลุ่มไฮดรอกซาเมท (Hydroxamate) หรือ กลุ่มแคทีคอล (แคทีโคเลท; Catecholate) ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนี้มีความเสถียรสูงและละลายน้ำได้ดี ด้วยคุณสมบัติของไซเดอโรฟอร์ดังกล่าวคณะผู้วิจัย

จึงสนใจที่จะทดลองนำสารไซเดอโรฟอร์มาใช้กำจัดเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในต้นหอม เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์และพัฒนาให้เกิดผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ที่เป็นสารสกัดจากธรรมชาติและสามารถใช้กับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นต่อไป

1. อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุ

1.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Agar, Ammonium sulphate, Iron(II) sulphate, L-Asparagin rein.H_2O, Magnesium Sulphate, Potassium dihydrogen phosphate., Potassium Chloride, Di-potassium hydrogen phosphate, Sucrose, Sodium Nitrate, Sodium acetate, Sodium arsenite, N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, Sodium hydroxide, Sodium carbonate, N,N-dimethylformamide สารทั้งหมดที่ใช้เป็น AR Grade

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

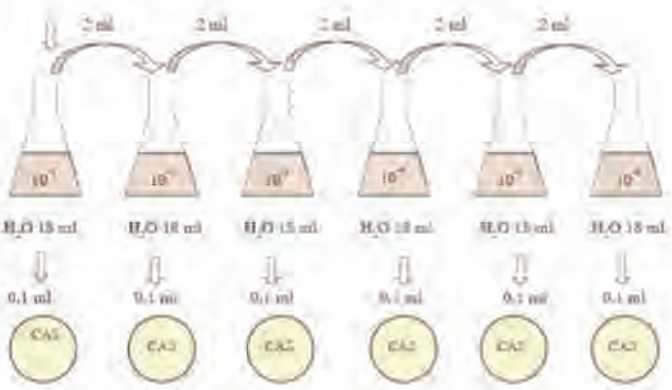
Magnetic Stirrer, Shaker, Autoclave, Lamina Air Flow, Hot Air Oven, Refrigerator Centrifuge, Rotary Evaporator, Hot Plate, Column และน้ำใช้ Deionization Water

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างดินจากปากปล่องและจอมปลวกบนภูเขาไฟเขากระโดง อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ มาทำการเตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้นจำนวน 6 ความเข้มข้นดัง ภาพประกอบ 1 แล้วปิเปตสารละลายแต่ละความเข้มข้นจำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร CAS Agar อยู่ แล้วนำไปบ่มในอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง จะได้เชื้อที่มีลักษณะต่าง ๆ มากมาย แต่ในคณะผู้วิจัยเลือกแบบเจาะจงมาทำการศึกษาจำนวน 4 ไอโซเลต คือ VMBH17, VMBH18, MHB12 และ MHB13 ตามลำดับ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์



ภาพประกอบ 1 Preparation and Dilution of Bacterial Soils from Kaokadong Mountain
ที่มา : Incubation CAS Agar (2017)

2.2 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์

นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการเลี้ยงใน ตารางที่ 1 แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค Streak Plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

2.3 การผลิตสารไซเดอโรฟอร์

ทำการเตรียมอาหาร SA Medium แล้วบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 3 ลิตร หลังจากนั้นนำอาหาร SA Medium ทำการฆ่าเชื้อต่าง ๆ ในเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที แล้วนำ เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะต่าง ๆ ลงใน อาหาร SA Medium จากนั้นนำไปทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.4 การแยกสารไซเดอโรฟอร์

นำสารละลายที่จากการเลี้ยงเชื้อไปเติมแอมโมเนียซัลเฟตเพื่อตกตะกอนโปรตีน จำนวน 10.00 กรัม/ลิตร ของอาหารเหลว SA แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Refrigerator Centrifuge เป็นเวลา 15 นาที ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารไซเดอโรฟอร์ไปทำการระเหยด้วยระบบความดันต่ำ ให้มีปริมาตรน้อยลงแล้วปล่อยให้แห้งจะได้สารไซเดอโรฟอร์ทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ Column Chromatography ที่บรรจุด้วยสาร Silica Gel และใช้น้ำ : เมทานอล 1 : 1 เป็นสาร Mobile Phase ในการชะ

2.5 การศึกษาตรวจสอบชนิดของสารไซเดอโรฟอร์

2.5.1 การวิเคราะห์หาแคทีโคเลตไซเดอโรฟอร์ (Catecholate Siderophore) ด้วยวิธี Arnow เติมสารละลายไซเดอโรฟอร์ของในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 5.00 มิลลิลิตร เติมสารละลาย

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

0.5 โมลาร์ ของกรดไฮดรอคลอริกและเติมสารลายไนไตรต์-โมลิเดท 1.00 มิลลิลิตร เขย่าให้เขากันแล้วเติมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์แล้วทำการสแกนหาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย

2.5.2 การทดสอบสารไซเดอโรฟอร์ซนิดไฮดรอกซาแมทไซเดอโรฟอร์มี 2 วิธีคือ วิธี Csaky และ Berg and Becker ดังนี้

ก. การทดสอบไซเดอโรฟอร์ซนิดไฮดรอกซาเมท ด้วยวิธี Csaky Test

นำสารตัวอย่างจำนวน 2.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายกรดซัลฟิวริก 3.00 มิลลิลิตร จำนวน 2.00 มิลลิลิตร แล้ว Hydrolyzed ในตู้อบเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50.00 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 2 โมลาร์ ของโซเดียมอาซีเตต จำนวน 7.00 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายซัลฟานิลามีดเข้มข้น 1.00 ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตรจำนวน 2 มิลลิลิตร และสารลายไอโอดีนที่มีความเข้มข้น 0.65 ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันและปล่อยให้ทำปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์เป็นเวลา 5 นาที และไอโอดีนที่เกิดพอกำจัดโดยการโดย การเติมสารละลายโซเดียมเอไซด์และเติมสารละลายแนพธิลแอลธิลีนไดเอมีน จำนวน 2.00 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

ข. การทดสอบไซเดอโรฟอร์ซนิดไฮดรอก ซาเมทด้วยวิธี Berg & Becker Test

เติมสารตัวอย่างจำนวน 2.00 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50.00 มิลลิลิตร เติม 8-Hydroxyquinoline 2.00 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1.00 โมลาร์ 2.00 มิลลิลิตร เขย่า 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 โมลาร์ 14.00 มิลลิลิตร และโซเดียมคาร์บอเนต 1.00 โมลาร์ 2.00 มิลลิลิตร เพื่อไฮโดรไลซีสสารผสม ปรับ pH ให้คงที่ที่ 11.00 $\pm$ 0.50 จะได้สารละลายสีน้ำเงินอมเขียว

2.6 การทดสอบฆ่าเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในต้นหอม

ทำการเก็บสารตัวอย่างต้นหอมที่เกิดโรค ต้นเน่า รากเน่า ใบจุดสีม่วง และปลายใบแห้ง จากตำบลสะแกซำ อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ มาทำการเลี้ยงเชื้อราดังต่อไปนี้

1) ทำการเตรียมอาหาร Czapek Solution Agar With Sucrose แล้วมีการทำการฆ่าเชื้อในเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทิ้งอาหารไว้ข้ามคืน

2) นำอาหารมาละลายแล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแล้วทิ้งอาหารให้แข็งตัวที่อุณภูมิห้อง

3) นำสารตัวอย่างไปวางบนอาหารในจานแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4) ทำเชื้อราให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค Streak Plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) นำเชื้อราที่มีลักษณะต่าง ๆ มาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารอยู่ให้เชื้อราขึ้นให้เต็มจานภายในเวลา 12 ชั่วโมง

6) เตรียมสารละลายไซเดอโรฟอร์จำนวน 3 ความเข้มข้นคือ 100, 50 และ 25 ปริมาณของตัวถูกละลายในสารละลายล้านส่วน โดยใช้ DMF (N, N-Dimethylformamide) เป็นตัวทำละลายแล้วนำไปทดสอบฆ่า เชื้อราที่ได้จากต้นห้อมที่เกิดโรคต่างดัง

3. ผลของการทดลอง

3.1 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย ที่ได้จากการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ได้จากตัวอย่างดินภูเขาไฟเขากระโดง ได้ผลดัง ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Characterization of Bacteria from Volcano Mouth and Molehill of Kaokadong National Park Mountain After Incubation with CAS Agar

Sample	Characterization of Bacteria
Soil from Volcano Mouth	Yellow
	Tubid
soil from molehill	Yellow
	Tubid

3.2 ลักษณะสารไซเดอโรฟอร์ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

หลักจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้สารละลายไซเดอโรฟอร์ดัง ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Color of Supernatant Siderophore from Bacteria

Bacterial Isolate	Color of Siderophore
VMBH 17	Tubid
VM BH18	Colorless
MHB12	Yellow
MH B13	Tubid

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

3.3 ลักษณะของสารไซเดอโรฟอร์

หลังจากที่ได้สารไซเดอโรฟอร์ โดยการนำเอาสารละลายส่วนใส (Supernatant Siderophore) ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะต่าง ๆ มาทำให้แห้งโดยการนำไประเหยภายใต้ระบบสุญญากาศ (Vacuum Evaporate) ให้มีปริมาตรน้อยและปล่อยให้แห้งจะได้สารไซเดอโรฟอร์ที่มีลักษณะต่าง ๆ ดัง ภาพประกอบ 2 และตารางที่ 3

ภาพประกอบ 2 The Siderophore After Purify and Dry Properly

ตารางที่ 3 Color of Siderophore After Purify and Dry Properly

Type of Bacteria	Color of Siderophore
VMBH 17	Colorless
VM BH 18	Brown
MHB 12	Dark red
MH B 13	Black

3.4 ผลที่ได้จากการทดสอบชนิดของไซเดอโรฟอร์ชนิดไฮดรอกซาเมท

3.4.1 ผลที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี Csaky

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

ตารางที่ 4 Classification of Hydroxamate Siderophore by Csaky Test

Siderophore from Bacterial Isolate	Color of The Solution	λ_{max} (nm)
VMBH 17	VMBH 17	360
VM BH 18	VM BH 18	370
MHB 12	MHB 12	364
MH B 13	MH B 13	360

จาก ตารางที่ 4 พบว่า สารตัวอย่างทุกตัวที่ได้นำมาทดสอบไซเดอโรฟอร์ชนิดไฮดรอกซาเมทด้วยวิธี Csaky มีผลเป็นลบ คือไม่ปรากฏสีคราม หลักจากที่เติมรีเอเจนต์ครบและปล่อยให้ทำปฏิกิริยาสมบูรณ์

3.4.2 ผลที่ได้จากการทดสอบวิธี Berg & Becker

ตารางที่ 5 Classification of Hydroxamate Siderophore by Berg and Becker Test

Siderophore from Bacterial Isolate	Color of The Solution	λ_{max} (nm)	Abs (700 nm)
VMBH 17	Green yellow	405	0.014
VM BH 18	Yellow	405	0.004
MHB 12	Green	405	0.012
MH B 13	Green	405	0.006

จากตารางที่ 5 พบว่า ไซเดอโรฟอร์ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย MHB12 และ MHB13 มีสีเป็นเขียว แสดงว่าไซเดอโรฟอร์จากแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตนี้เป็นชนิดไฮดรอกซาเมท (Hydroxamate siderophore)

3.5 ผลที่ได้จากการทดสอบชนิดของสารแคทีคอลไซเดอโรฟอร์

นำสารตัวอย่างมาทำการทดสอบเพื่อวิเคราะห์สารไซเดอโรฟอร์ชนิดแคทีคอลซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ตารางที่ 6 Classification of Catecholate Siderophore by Arnow Test

Siderophore from Bacterial Isolate	Color of The Solution	λ_{max} (nm)	Abs (700 nm)
VMBH 17	Orange	420	0.089
VM BH 18	Red	500	0.059
MHB 12	Colorless	460	0.020
MH B 13	Pink	425	0.022

จากตารางที่ 6 พบว่าหลังจากสารตัวอย่างทุกตัวที่ปฏิกิริยากับรีเอเจนต์สมบูรณ์ มีสารตัวอย่าง 2 สาร คือ VMBH17 และ VMBH18 ปรากฏให้เห็นสีแดงและสีส้มตามลำดับแสดงว่าสาร 2 สารนี้เป็นไซเดอโรฟอร์ชนิดแคทีคอล (Catecholate Siderophore)

3.6 ผลของการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อที่เกิดโรคในต้นหอมแดง

หลังจากการเลี้ยงเชื้อราที่มีชนิดต่าง ๆ ในอาหาร Czapek Solution Agar with Sucrose ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำสารไซเดอโรฟอร์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ไปทดสอบโดยใช้ Paper Disc Diffusion จะได้ผลดัง ตารางที่ 7

ตารางที่ 7 Siderophore Activities Against Fungi Diseases of Onion Leaves

Siderophore from Bacterial Isolate	Concentration (ppm)	Clear zone (mean, mm)			
		Collectorichum circinans	*Sclerotium cepivorum*	*Alternaria porri*	*Stemphylium borysum*
VMBH17	Control	-	-	-	-
	100	12	-	17	15
	50	10	-	16	14
	25	9	-	15	12
VMBH18	Control	-	-	-	-
	100	-	-	17	-
	50	-	-	16	-
		-	-	16	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Siderophore from Bacterial Isolate	Concentration (ppm)	Clear zone (mean, mm)			
		Collectorichum circinans	Sclerotium cepivorum	Alternaria porri	Stemphylium borysum
MHB12	25	-	-	16	-
	Control	-	-	-	-
	100	12	14	-	-
	50	10	12	-	-
MHB13	25	8	10	-	-
	Control	-	-	-	-
	100	14	15	-	-
	50	12	13	-	-
	25	9	11	-	-

จากตารางที่ 7 พบว่าไซเดอโรฟอร์ที่ผลิตจาก VMBH17 และ VMBH18 ซึ่งเป็นแคทีคอลสามารถต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดสีม่วงและ โรคปลายใบแห้งได้ดี แต่ต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคต้นเน่าได้น้อย สำหรับ ไซเดอโรฟอร์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย MHB12 และ MHB13 เป็นชนิดไฮดรอกซาเมทมีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของ โรคต้นเน่าและโรครากเน่าได้ดี แต่ไม่สามารถต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดสีม่วงและโรคปลายใบแห้ง

สรุปผลและอภิปรายผล

การวิจัยครั้งนี้เป็นการนำแบคทีเรียจากปากปล่องและจอมปลวกในดินของภูเขาไฟเขากระโดง จังหวัดบุรีรัมย์ เพื่อทำการผลิตไซเดอโรฟอร์ ซึ่งเป็นสารที่สร้างขึ้นจากกระบวนการเมตาโบลิซึมในเซลล์ของแบคทีเรีย และนำ ไซเดอโรฟอร์ไปทำการทดสอบชนิด นอกจากนั้นยังนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืชในต้นหอมซึ่งประกอบด้วยโรครากเน่า โรคต้นเน่า โรคใบจุดสีม่วงและโรคปลายใบแห้ง

แบคทีเรียที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วยแบคทีเรียจากดินปากปล่องภูเขาไฟจำนวน 2 ลักษณะ (VM BH17 และ VMBH18) และแบคทีเรียจากดินจอมปลวกบนภูเขาไฟเขากระโดงจำนวน 2 ลักษณะเช่นกัน (MHB12 และ MHB13) แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว SA Medium เพื่อสกัดสารไซเดอโรฟอร์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

เชื้อแบคทีเรีย VMBH17, VMBH18, MHB12 และ MHB13 นำไปเลี้ยงในอาหาร SA Medium ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะได้สารไซเดอโรฟอร์มีลักษณะสีขาวใส (Colorless) สีน้ำตาล (Brown) สีแดงเข้ม (Dark Red) และสีดำ (Black) ตามลำดับ การทดสอบชนิดไซเดอโรฟอร์พบว่า สารสกัดที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย VMBH17 และ VMBH18 เป็นไซเดอโรฟอร์ชนิดแคทีคอล ส่วนไซเดอโรฟอร์ที่ได้จาก MHB12 และ MHB13 เป็นสารไซเดอโรฟอร์ไฮดรอกซาเมท

เมื่อทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในต้นหอมจำนวน 4 ลักษณะ พบว่าไซเดอโรฟอร์แต่ละชนิดมีความสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ต่างกัน โดยไซเดอโรฟอร์ไฮดรอกซาเมทสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคต้นเน่าและโรครากเน่าได้ดี แต่ไม่สามารถต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุด สีม่วงและโรคปลายใบแห้ง ส่วนไซเดอโรฟอร์ชนิดแคทีคอลสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคใบจุดสีม่วง โรคปลายใบแห้ง และต้านเชื้อราก่อโรค ต้นเน่าได้ โดยกลไกการออกฤทธิ์ของไซเดอโรฟอร์จะเกี่ยวข้องกับ การแย่งจับกับเหล็กที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตทำให้เชื้อราก่อโรคของหอมแดงตายไป (Ali and Vidhale. 2013) นอกจากนี้ ไซเดอโรฟอร์ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เชื้อโรคผลิตออกมาเพื่อให้ผักเป็นแผลได้อีกด้วย (Ferramola et al., 2013) ดังนั้นการกำจัดเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคบนต้นหอมแดงแต่ละโรคจะต้องใช้สารไซเดอโรฟอร์ต่างชนิดกันหรือใช้สารไซเดอโรฟอร์ทั้งสองกลุ่มผสมกันและผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้ปลูกหอมแดง ตลอดจนผู้บริโภคทั่วไป เนื่องจากไซเดอโรฟอร์เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ไม่เป็นพิษและไม่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนอุดหนุน และผู้ประกอบการโรงงานปุ๋ยชีวภาพ บ้านนาราใหญ่ อำเภอกระสัง จังหวัดบุรีรัมย์ที่อนุเคราะห์แหล่งเรียนรู้ และขอขอบคุณท่านอาจารย์รุ่งเรือง งาหอม ที่แนะนำเทคนิคทางจุลินทรีย์และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์จนทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ . 2548. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ali, S.S. and Vidhale, N.N., 2013. Bacterial Siderophore and Their Application : A review. Int. **J.Curr.Microbiol. App.Sci**. 2(12): 303-312.

Braun, V. and Braun, M. 2002. Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. **FEBS Lett.** 529:78–85.

Ferramola, M.I.S., et al., 2013. **Microbial pathogens and strategies for combating them : science, technology and education.** 1385-1394.

Neilands , J. B. 1995. Siderophores: Structure and Function of Microbial IronTransport Compounds. **The journal of biological chemistry** 270(45): 26723–26726.

Matthijs, S. Tehrani, K. A. 2007. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. **Environmental Microbiology** 9(2): 425–434.

Patitungkho, S. 1998. **Isolation, purification and application of siderophore for iron determination.** Khon Kaen : Khon Kaen University.

Panomupathum. S, 1996. **Isolation and optimization of siderophore producing bacteria.** Khon Kaen : Khon Kaen University.

คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์