



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ผลของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงจากรา *Monascus purpureus* TISTR 3541 ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์และ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยว”

The effect of red rice crude extract and red pigment from *Monascus purpureus* TISTR 3541 against bacterial canker, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*.

โดย นายจาตุรนต์ ทิพย์วงศ์ และคณะ

ธันวาคม 2557

สัญญาเลขที่ RDG5620017

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ผลของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงจากรา *Monascus purpureus* TISTR 3541 ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์และ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยว”

The effect of red rice crude extract and red pigment from *Monascus purpureus* TISTR 3541 against bacterial canker, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*.

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นายจาตุรนต์ ทิพย์วงศ์	มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี
2. ดร.เบญจมาศ หุ่นแป้น	มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี
3. ดร.เกษร เมืองทิพย์	มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

ชุดโครงการความร่วมมือ สกว.-มรส. การพัฒนางานวิจัยและการสนับสนุน
งานวิจัยเชิงพื้นที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี

รุ่นที่ 3 ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัยสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปผู้บริหาร

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ประชากรส่วนใหญ่ยังคงทำเกษตรกรรมเพื่อการดำรงชีพและการส่งออก ในการทำเกษตรกรรมนั้นมักประสบปัญหาจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคกับพืช ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อพืชผลทางเกษตร จนลุกลามกลายเป็นปัญหาทางเศรษฐกิจ เชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* และ *Ralstonia solanacearum* เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่สำคัญที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อพืชเศรษฐกิจได้หลายชนิด โดยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ทำให้เกิดโรคแคงเกอร์ ในพืชจำพวกตระกูลส้ม ไม่เพียงในประเทศไทยเท่านั้น แต่เชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชตระกูลส้มทั่วโลกและเชื้อ *R. solanacearum* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยว โดยเชื้อชนิดนี้สามารถระบาดและก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจ แม้กระทั่งพืช รวมมากกว่า 200 ชนิดในหลายวงศ์ อาทิเช่น พืชในวงศ์มะเขือ (Solanaceae) วงศ์กล้วย (Musaceae) วงศ์ขิง (Zingiberaceae) มะเขือเทศ มันฝรั่งและหอม เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้นั้น เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วและยากต่อการควบคุม ซึ่งการควบคุมการแพร่กระจายและป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อทั้งสองชนิดนี้สามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมกันมาก คือการใช้สารเคมีหรือสารปฏิชีวนะ ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ก่อให้เกิดผลเสียตามมามากมาย โดยจะมีการสะสมสารพิษทั้งในผลิตผลทางการเกษตร ดินและน้ำ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาเชื้อโรคเกิดการดื้อต่อสารเคมีได้อีกด้วย ทำให้ต้องมีการเพิ่มปริมาณการใช้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จึงเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและสภาพแวดล้อม เนื่องจากการตกค้างของสารพิษ ทำให้กระทบต่อระบบนิเวศได้ ในปัจจุบันจึงได้มีแนวคิดที่จะเปลี่ยนมาใช้สารที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้น เพื่อลดปัญหาการตกค้างซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการควบคุมเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังที่กล่าวมา โดยใช้สารเมทาบอลิท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ผลิตจากราที่มีชื่อว่า ราข้าวแดงหรือโมแนสคัส (*Monascus* sp.) โดยราชนิดนี้เริ่มมีการเลี้ยงกันเป็นเวลานานแล้วในเอเชียตะวันออก โดยเลี้ยงราบนข้าวเรียกว่า Ank Khak โดยรู้จักทั่วไปในชื่อของ “ข้าวแดง” ซึ่งเกิดขึ้นจากการสร้างสารสีของเชื้อราลงสู่เมล็ดข้าว สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส ประกอบด้วยโทนสี 3 สี คือ โทนสีแดง สีส้ม และสีเหลือง ซึ่งสารสีจากราโมแนสคัสมีการนำมาประยุกต์ใช้มากมายหลายด้าน เนื่องจากสามารถนำมาใช้ได้โดยตรงและมีความปลอดภัยค่อนข้างสูง มีคุณค่าทางโภชนาการ มีแร่ธาตุและวิตามินสูง (Palo et al., 1960) และยังมีสารฟีนอลิก (phenolic compound) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สูงอีกด้วย (Tseng et al., 2012) โดยเฉพาะในการนำมาใช้กับอาหารและเครื่องดื่ม เครื่องสำอาง ใช้เป็นยารักษาโรคพื้นบ้านของจีน ฯลฯ

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงจากข้าวแดงที่ผลิตโดยเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3541 ในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ 2 ชนิดประกอบด้วย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์และ *R. solanacearum*

สาเหตุโรคเหี่ยว โดยทำการผลิตสารสับอาหารแข็ง คือ ข้าวหอมมะลิ เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่สูง เหมาะสมต่อการผลิตสารสีได้ในปริมาณที่มากและก่อให้เกิดสารพิษในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำโดยพบว่าระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารสีได้ในปริมาณมากที่สุด คือ หมักนาน 14 วัน โดยมีปริมาณสารสีแดง สีเหลืองและสีส้ม มีค่าเท่ากับ 41.1 ± 0.81 , 37.53 ± 0.45 และ 27 ± 0.36 (หน่วย Au/g substrate) ตามลำดับ จากนั้นทำการสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอลเกรดวิเคราะห์และเอทานอลเกรดทางการค้า พบว่าประสิทธิภาพในการสกัดสารสีจากข้าวแดงของตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายทั้งสามมีค่าเท่ากับ 18.7 ± 0.5 , 17 ± 0.8 และ 18.5 ตามลำดับ การสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด สารสกัดหยาบที่ได้จะประกอบด้วยปริมาณสารสีแดงมากที่สุด รองลงมาคือสีเหลืองและสีส้ม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชนิดตัวทำละลายในการสกัดสารสีแดง พบว่าเมทานอลและเอทานอลเกรดทางการค้ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นถ้าหากคำนึงถึงต้นทุนในการเลือกตัวทำละลายในการนำไปใช้จริง สรุปได้ว่าสามารถใช้ตัวทำละลายเอทานอลแบบการค้ามีความเหมาะสมในการใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับสกัดสารสี เนื่องจากมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับตัวทำละลายบริสุทธิ์ มีความเป็นพิษน้อย และยังมีราคาที่ถูกกว่า ทำให้สามารถประหยัดต้นทุน

ต่อมาทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบเพื่อแยกสารสีแดงให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นด้วยเทคนิค prep-thin layer chromatography และ column chromatography พบว่าอัตราส่วนตัวชะระหว่างคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลที่เหมาะสมในการแยกสารสีแต่ละชนิดออกจากกัน คือ 9:1 (v/v) จากนั้นทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารสีแดงที่ได้ พบว่ายังปรากฏการปนเปื้อนของสารสีเหลืองอยู่ ดังนั้นในขั้นตอนถัดมาคือ การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวด้วยเทคนิค agar well-diffusion assay จึงต้องมีการนำสารสีเหลืองมาเป็นกลุ่มควบคุมด้วย พบว่าสารสกัดหยาบข้าวแดงสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ ในขณะที่สารสีแดงยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้เพียงชนิดเดียว ส่วนสารสีเหลืองไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวทั้ง 2 ชนิดได้

ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงที่สามารถยับยั้ง (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* และ *R. solanacearum* พบว่าสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic) เท่านั้น ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bactericidal) แบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวทั้งสองชนิดที่นำมาศึกษา โดยสารสกัดหยาบข้าวแดงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ดีกว่าเชื้อ *R. solanacearum* เนื่องจากค่า MIC ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* มีค่าเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ของสารสกัดหยาบข้าวแดงต่อเชื้อ *R. solanacearum* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสีแดงมีค่า MIC ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร แสดงว่าสารสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งได้น้อยกว่าสารสกัดหยาดราข้าวแดง จากนั้นศึกษาผลของสารสีแดงต่อค่า hydrophobic ความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวและการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่าสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น MIC (25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถเพิ่มสมบัติความเป็น hydrophobic ให้กับเซลล์ แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่งผลทำให้เซลล์แบคทีเรีย สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวได้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนจนมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ต่อมาทำการยืนยันผลว่าสารสีแดงมีผลต่อการเกาะกลุ่มของเซลล์ พร้อมทั้งศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยการย้อมด้วยสี methylene blue จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเมื่อสังเกตลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สารสีแดงมีผลทำให้เซลล์มีการเกาะกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและสารสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่านั้น เนื่องจากเมื่อย้อมด้วยสี methylene blue เซลล์แบคทีเรียย้อมไม่ติดสีแสดงว่าเซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่

ต่อมาศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาดราข้าวแดงในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในเรือนทดลอง พบว่าสารสกัดหยาดราข้าวแดงสามารถยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวในต้นมะเขือเทศได้ โดยเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศที่ราดด้วยสารสกัดหยาดราข้าวแดงมีค่าเท่ากับ 33.3 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายเท่ากับ 13.3 นอกจากนี้ยังสามารถลดปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* ในดินบริเวณรากของต้นมะเขือเทศได้ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7.1 Log CFU/g หลังการทดลอง 6 สัปดาห์ ปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 1.29 Log CFU/g ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 1.64 Log CFU/g และสารสกัดหยาดราข้าวแดงสามารถควบคุมโรคแคงเกอร์บนใบของต้นมะนาวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของต้นมะนาวมีค่าเท่ากับ 89.7 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 95

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบรากข้าวแดงและสารสีแดงจากรากข้าวแดงที่ผลิตโดยเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3541 ในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ 2 ชนิด ประกอบด้วย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาวและ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ โดยทำการผลิตรากข้าวแดงบนอาหารแข็ง คือ ข้าวหอมมะลิ จากผลการศึกษาพบว่าระยะเวลาการหมักที่ 14 วันเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีการผลิตสารสีชนิดต่าง ๆ ได้ในปริมาณมากที่สุด จากนั้นทำการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารและมีการคำนึงถึงต้นทุนการนำไปใช้จริง พบว่าเอทานอลเกรดทางการค้ามีประสิทธิภาพในการสกัดสารสีแดงจากรากข้าวแดงได้ดีที่สุดและมีเหมาะสมที่สุด ต่อมาทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบด้วยเทคนิค prep-thin layer chromatography (TLC) และ column chromatography (CC) จากนั้นศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* และ *R. solanacearum* ด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค agar well-diffusion assay พบว่าสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* และ *R. solanacearum* โดยสารสกัดหยาบข้าวแดงสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ ในขณะที่สารสีแดงยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้เพียงชนิดเดียว ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงที่มีฤทธิ์ยับยั้ง (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) ด้วยเทคนิค agar well-diffusion assay พบว่าค่า MIC ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* และ *R. solanacearum* มีค่าเท่ากับ 12.5 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสีแดงมีค่า MIC ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นศึกษาผลของสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น MIC (25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อค่า hydrophobic ที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค MATH test พบว่าเซลล์ที่มีการเติมสารสีแดงจะมีสมบัติความเป็น hydrophobic เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสีแดง ผลจากการเพิ่มค่าความเป็น hydrophobic นี้เองส่งผลทำให้เซลล์แบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวแก้วได้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสีแดง แต่ไม่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนจนมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของสารสีแดงต่อการเกาะกลุ่มของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และความมีชีวิตของเซลล์ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยการย้อมด้วยสี methylene blue พบว่า สารสีแดงมีผลทำให้เซลล์มีการเกาะกลุ่มด้วยกันเป็นก้อนขนาดเล็กและสารสีแดงไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับสารสีแดงได้ ดังนั้นสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic) เท่านั้น ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bactericidal) ต่อมาศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในเรือนทดลอง พบว่าสารสกัดหยาบข้าวแดงสามารถยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวใน

ต้นมะเขือเทศได้ โดยเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศที่ราดด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดง มีค่าเท่ากับ 33.3 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายเท่ากับ 13.3 นอกจากนี้ยังสามารถลดปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* ในดินบริเวณรากของต้นมะเขือเทศได้ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7.1 Log CFU/g หลังการทดลอง 6 สัปดาห์ ปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 1.29 Log CFU/g ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 1.64 Log CFU/g และสารสกัดหยาบข้าวแดงศึกษาสามารถควบคุมโรคแคงเกอร์บนใบของต้นมะนาวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของต้นมะนาวมีค่าเท่ากับ 89.7 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 95

Abstract

In this study, to investigate the antibacterial activity of crude extract red rice and red pigment were produced from *Monascus purpureus* TISTR 3541 to phytopathogenic bacterias including *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, a causing of canker disease and *Ralstonia solanacearum*, a causing of bacterial wilt. The red rices were fermented by solid-state fermentation using Jasmine rice. The optimal fermentation period was 14th days with the highest amounts of all pigments. To examine the best solvents for red pigment extraction and the costs are also considered. The results showed that commercial ethanol grad might be chosen for extraction with the highest amounts of red pigment. Thin layer chromatography and column chromatography were used for red pigment purification. The crude extract and purified red pigment were investigated for their antibacterial activity against *X. axonopodis* pv. *citri* and *R. solanacearum* by agar well diffusion assay using 200 mg/ml of the crude extract and purified red pigment. The crude extract showed zone of inhibition against all the tested bacteria, while the purified red pigment showed only zone of inhibition against *X. axonopodis* pv. *citri*. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were determined by the agar well diffusion method. The crude extract showed MIC values of 12.5 and 25 mg/ml for *X. axonopodis* pv. *citri* and *R. solanacearum*, respectively while the purified red pigment showed MIC values of 25 mg/ml for *X. axonopodis* pv. *citri*. The effect of purified red pigment against *X. axonopodis* pv. *citri* were sequentially evaluated. MIC concentration (25 mg/ml) of the purified red pigment was used to evaluate on cell-surface hydrophobicity by the MATH test. The results showed that the pigment-treated cells had higher hydrophobicity of the cell surface than nontreated cells. This effect seems to promote the pigment-treated cells adhere to glass surface. Whereas, cell pellet formation could not be visible. Cell aggregation was also observed with light microscope. Pigment-treated cells were partially into small pellets while nontreated cells were not. Viability test using methylene blue staining revealed that the purified red pigment could not kill the pigment treated cells. So, Both crude extract and purified red pigment were bacteriostatic extracts, not bactericidal extracts. Experiment on control bacterial wilt on tomatoes, caused by *R. solanacearum* and canker disease on lemon leave, caused by *X. axonopodis* pv. *citri*. in greenhouse found that red rice crude extract could inhibit the wilt of tomatoes with the survival at 33.3%

which was significantly different from control group with the survival at 13.3% and also reduced the *R. solanacearum* population at rhizosphere. *R. solanacearum* initial population was 7.1 Log CFU/g after six weeks post inoculation, crude extract-treated tomatoes had the lowest population at 1.29 Log CFU/g of soil which was significantly different from the highest population at 1.64 Log CFU/g of soil of the control. Addition, red rice crude extract treated-lemon leave showed the low canker disease incidence at 89.7% which was significantly different from control group with incidence at 95%

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความร่วมมือและสนับสนุนของหน่วยงาน บุคคลหลายฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณและจะจดจำพระคุณนี้ตลอดไป

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์จรัส เรียวเดชะ รองผู้อำนวยการด้านการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์และรักษาการผู้อำนวยการฝ่ายเกษตร รองศาสตราจารย์ มยุรจิยวัฒน์ รองผู้ช่วยผู้อำนวยการ สกว. ด้านสื่อสารสังคม (สกว.) รองศาสตราจารย์ นงนุช อังยุรกุล กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงษ์เทพ วิไลพันธ์ ผู้ประสานงาน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรชน ช่วยเกิด ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้ความช่วยเหลือแนะนำ ปรีक्षा และสนับสนุนให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย และขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชลิตา เล็กสมบุญรณ์ ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เมตตาและกรุณาเป็นอย่างยิ่งสำหรับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชทั้งสองชนิดที่ได้มอบให้คณะผู้วิจัย

งานวิจัยครั้งนี้จะสำเร็จมิได้หากไม่ได้รับความร่วมมือและการมีส่วนร่วมของอาจารย์คณะนักวิจัยในการดำเนินงานวิจัยมาโดยตลอด

ท้ายนี้ขอขอบพระคุณคณาจารย์ผู้ร่วมทีมวิจัยทุกท่าน ที่ได้ช่วยทำให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

จาตุรนต์ ทิพย์วงศ์ และคณะ

ธันวาคม 2557

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	(ก)
บทคัดย่อภาษาไทย	(ข)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(ค)
กิตติกรรมประกาศ	(ง)
สารบัญ	(จ)
สารบัญตาราง	(ฉ)
สารบัญรูปภาพ	(ช)
1. บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
2. บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	3
2.1 ลักษณะสัญญาณวิทยาของราโมแนสคัส	3
2.2 สารสี (pigments) ที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส	4
2.3 การผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส	6
2.4 สภาพการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีจากราโมแนสคัส	7
2.5 สารสีแดงกับสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์	8
2.6 โรคพืช	9
2.7 การยืดเกาะพื้นผิวเนื้อเยื่อพืชของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช	10
2.8 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	13
2.9 <i>Ralstonia solanacearum</i>	15
3. บทที่ 3 แนวทาง/ขั้นตอนการดำเนินงาน	17
3.1 การเตรียมเชื้อรา <i>Monascus purpureus</i> TISTR 3541 และแบคทีเรียก่อโรคในพืช	17
3.2 การเตรียมสารละลายสปอร์ของกล้ำเชื้อ <i>M. purpureus</i> TISTR 3541	17
3.3 การผลิตสารสีจากเชื้อรา <i>M. purpureus</i> TISTR 3541 โดยการหมักบนอาหารแข็ง	17
3.4 การแยกและทำบริสุทธิ์สารสีจากเชื้อรา <i>M. purpureus</i> TISTR 3541 ด้วยเทคนิค Column chromatography	18

3.5 ผลของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงจากเชื้อรา <i>M. purpureus</i> TISTR 3541 ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืชด้วยเทคนิค agar well-diffusion assays	18
3.6 การหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (minimum inhibitory concentration, MIC) และฆ่าเชื้อ (minimum bactericidal concentration, MBC)	19
3.7 การศึกษาผลของสารสีแดงจากเชื้อรา <i>M. purpureus</i> TISTR 3541 ต่อเซลล์ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	20
3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมการเกิดโรคพืชบางชนิดในเรือนทดลอง	22
4. บทที่ 4 ผลการศึกษา	25
4.1 การผลิตสารสีจากรา <i>M. purpureus</i> TISTR 3541 บนอาหารแข็ง โดยการหมักด้วยข้าวหอมมะลิ	25
4.2 การทำบริสุทธิ์สารสีแดงจากสารสกัดหยาบจากข้าวแดง	29
4.3 ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดง ต่อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช	31
4.4 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช	33
4.5 การศึกษาผลของสารสีแดงต่อเซลล์แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช	34
4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมการเกิดโรคพืชบางชนิดในเรือนทดลอง	38
5. บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	43
5.1 สรุปผลการทดลอง	43
5.2 ข้อเสนอแนะ	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	54
ตารางเปรียบเทียบวัตถุดิบ	57
ตารางเปรียบเทียบ output	59

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในพืชที่นำมาใช้ในการทดลอง	19
2. ร้อยละของสารสกัดหยาบข้าวแดงที่ป่มเป็นระยะเวลา 14 วัน	28
3. ปริมาณสารสีแต่ละชนิดในสารสกัดหยาบข้าวแดงที่ป่มเป็นระยะเวลา 14 วัน	28
4. เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชของสารสกัดหยาบและสารสีแดง	32
5. ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงที่สามารถยับยั้ง (MIC) แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช	33
6. ผลของสารสีแดงต่อเซลล์แบคทีเรีย <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	35
7. ประสิทธิภาพของสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อ <i>R. solanacearum</i> ในเรือนทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	39
8. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการยับยั้งปริมาณเชื้อ <i>R. solanacearum</i> (log CFU/g ของดิน) ในเรือนทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	40
9. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาวที่มีสาเหตุจากเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ในเรือนทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	41

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ลักษณะของแอสโคสปอร์ (ascospore) ของราโมแนสคัส	3
2. โครงสร้างเคมีของสารสีจากโมแนสคัส	5
3. ขั้นตอนการสังเคราะห์ citrinin และสารสีแดงของเชื้อ <i>M. ruber</i>	7
4. การเกิดโรคแคงเกอร์	14
5. รอยแผลของผลและใบมะนาวที่เป็นโรคแคงเกอร์	15
6. ลักษณะสัณฐาน <i>R. solanacearum</i> อาการของโรคเหี่ยว	16
7. การเจริญเติบโตของรา <i>M. purpureus</i> TISTR 3541 ที่หมักบนข้าวหอมมะลิ ภายใน 14 วัน	26
8. ปริมาณสารสีแดง สีเหลือง และสีส้ม ที่ได้จากข้าวแดงช่วงระยะเวลาการหมัก ตั้งแต่วันที่ 7 ถึงวันที่ 20	29
9. การทำ prep-TLC เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวชะระหว่างคลอโรฟอร์ม และเมทานอล	30
10. การแยกสารสีจากสารสกัดหยาบข้าวแดงที่ผลิตจากราโมแนสคัสด้วยเทคนิค column chromatography และการตรวจสอบความบริสุทธิ์สารสีแดงที่ได้ด้วยเทคนิค prep-TLC	30
11. วงสีที่เกิดจากการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> และ <i>R. solanacearum</i> ด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดง สารสีแดง และสารสีเหลือง	32
12. การเกาะกลุ่มของเซลล์ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	36
13. ความมีชีวิตของเซลล์ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ด้วยการย้อมด้วยสี methylene blue	37
14. แสดงการเปรียบเทียบความรุนแรงและการรอดตายของต้นมะเขือเทศที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์	40
15. แสดงการเปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดโรคแคงเกอร์ของใบต้นมะนาว ที่มีการปลูกเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์	42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ราข้าวแดงหรือโมนาสคัส (*Monascus sp.*) เริ่มมีการเลี้ยงกันเป็นเวลานานแล้วในเอเชียตะวันออก โดยเลี้ยงราบนข้าวเรียกว่า Ank Khak โดยรู้จักทั่วไปในชื่อของ “ข้าวแดง” ซึ่งเกิดขึ้นจากการสร้างสารสีของเชื้อราลงสู่เมล็ดข้าว สารสีจากเชื้อราโมนาสคัส ประกอบด้วยโทนสี 3 สี คือ โทนสีแดง สีส้ม และสีเหลือง ซึ่งสารสีจากราโมนาสคัสมีการนำมาประยุกต์ใช้มากมายหลายด้าน โดยเฉพาะในการนำมาใช้กับอาหารและเครื่องดื่ม เพราะสารสีจากเชื้อราโมนาสคัส นอกจากจะมีสีสวยแล้ว ยังมีคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากมีแร่ธาตุและวิตามินสูง (Palo *et al.*, 1960) และยังมีสารฟีนอลิก (phenolic compound) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สูงอีกด้วย (Tseng *et al.*, 2012) อาหารที่มีการนำสารสีจากเชื้อรามาใช้ เช่น ใช้แต่งสีอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ ปลา เต้าหู้ยี้ และไวน์ เป็นต้น นอกจากนี้สารสีจากเชื้อรามีการนำมาใช้ประโยชน์มากมาย เช่น ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง ใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนังของจีน นอกเหนือจากสารสีแล้วเชื้อราโมนาสคัสยังสามารถผลิตสารที่เป็นประโยชน์ชนิดอื่น ๆ อีก เช่น เอนไซม์ (Liu *et al.*, 2004) เอทานอล (Chen and Johns, 1994) และสารปฏิชีวนะ (Wong and Koehler, 1981) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด เป็นต้น

สารสีจากเชื้อราโมนาสคัส จัดเป็นสารเมทาบอลิท์ประเภทโพลีคีไทด์ (polyketide) เป็นสารทุติยภูมิที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมที่สำคัญ ๆ แต่มีรายงานระบุว่าสารสีดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ จากการศึกษาพบว่าสารสีแดงมีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียได้โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Mukherjee and Singh, 2011) เช่น *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* เชื้อรา เช่น *Trichoderma viridae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium roseum*, *Mucor*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus usarii*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium hirsutum*, *Aspergillus niger* และ *Penicillium citrinum* (Kim *et al.*, 2006a) ยีสต์ เช่น *Rhodotorula sp.*, *Candida utilis*, *Torulopsis utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fibuligera*

เชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* และ *Ralstonia solanacearum* เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่สำคัญที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อพืชเศรษฐกิจได้หลายชนิด โดยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ทำให้เกิดโรคแคงเกอร์ในพืชจำพวกตระกูลส้ม ไม่เพียงในประเทศไทยเท่านั้นแต่เชื้อชนิดนี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชตระกูลส้มทั่วโลกและเชื้อ *R. solanacearum* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยว โดยเชื้อชนิดนี้สามารถระบาดและก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจ

แม้กระทั่งวัชพืชมีมากกว่า 200 ชนิดในหลายวงศ์ อาทิเช่น พืชในวงศ์มะเขือ (Solanaceae) วงศ์กล้วย (Musaceae) วงศ์ขิง (Zingiberaceae) มะเขือเทศ มันฝรั่งและหม่อน เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วและยากต่อการควบคุม การควบคุมการแพร่กระจายและป้องกันการเกิดโรคสามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมกันมากคือ การใช้สารเคมีหรือสารปฏิชีวนะ ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ก่อให้เกิดผลเสียตามมามากมาย โดยจะมีการสะสมสารพิษทั้งในผลิตผลทางการเกษตร ดินและน้ำ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาเชื้อโรคเกิดการดื้อต่อสารเคมีได้อีกด้วย ทำให้ต้องมีการเพิ่มปริมาณการใช้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จึงเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและสภาพแวดล้อม เนื่องจากการตกค้างของสารพิษ นอกจากนี้สารเคมีที่ตกค้างยังไปทำลายสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์ทำให้กระทบต่อระบบนิเวศได้ ในปัจจุบันจึงได้มีแนวคิดที่จะเปลี่ยนมาใช้สารที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้น เพื่อลดปัญหาการตกค้างที่จะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม อาทิเช่น การใช้สมุนไพร เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงต้องการศึกษาประสิทธิภาพของสารสีจากราโมแนสคัสซึ่งมีความปลอดภัยสูง ในการนำมาใช้ควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช 2 ชนิด คือ *X. axonopodis* pv. *citri* และ *R. solanacearum* เพื่อที่จะสามารถนำมาใช้ทดแทน ทำให้ลดปริมาณการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาผลเบื้องต้นของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* TISTR 3541 ต่อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* และ *R. solanacearum*

1.2.2 ศึกษากลไกของสารสีแดงในระดับความเข้มข้นที่กำหนดต่อเซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri*

1.2.3 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมการเกิดโรคแคงเกอร์ (canker) และโรคเหี่ยว (ralstonia wilt) ภายในเรือนทดลอง

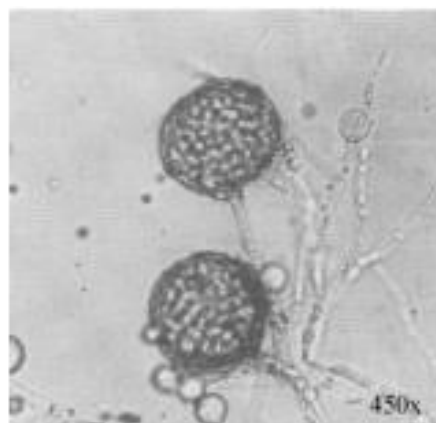
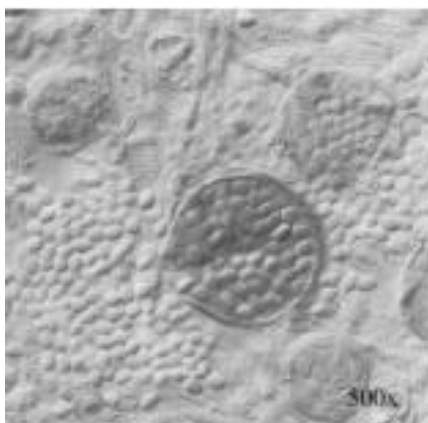
บทที่ 2

บทตรวจเอกสาร

2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของราโมแนสคัส

Monascus spp. จัดอยู่ในวงศ์ (family) Monascaceae กลุ่ม (class) Ascomycetes กลุ่มย่อย (subclass) Plectomycetidae อันดับ (order) Eurotiales เส้นใยมีผนังกัน (septate) มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมายและมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง

เชื้อราโมแนสคัสหรือราข้าวแดง (red rice mold) เป็นราเส้นสาย (filamentous fungus) ราชชนิดนี้มีเส้นใยที่มีผนังกัน (septate hyphae) แตกแขนงออกมากมาย ในระยะแรก ๆ ของการเจริญเติบโต เส้นใยจะมีสีขาวแต่เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยจะกลายเป็นสีแดง เจริญแบบไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ราชชนิดนี้เป็น homothallic fungus มีการสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ครบวงจรชีวิตได้ด้วยตัวเอง โดยสามารถสร้างสปอร์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ราโมแนสคัสสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 สปีชีส์ คือ *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber* และ *M. frigidus* โดยที่รา *M. purpureus* จะเป็นชนิดที่ง่ายต่อการแยกมากที่สุด โดยสามารถแยกได้จากแอสโคสปอร์ (ascospores) ซึ่งสปอร์จะมีลักษณะกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ไมโครเมตร หรือสปอร์อาจจะมีลักษณะกลมรีเหมือนไข่ก็ได้ (ขนาด 6x5 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของแอสโคสปอร์ (ascospore) ที่ผนังของถุงแอสคัส (ascus) แตกออก (ซ้าย) ถุงแอสคัสที่สมบูรณ์ (ขวา)

ที่มา : Pattanagul et al., (2007)

2.2 สารสี (pigments) ที่ได้จากเชื้อราข้าวแดง

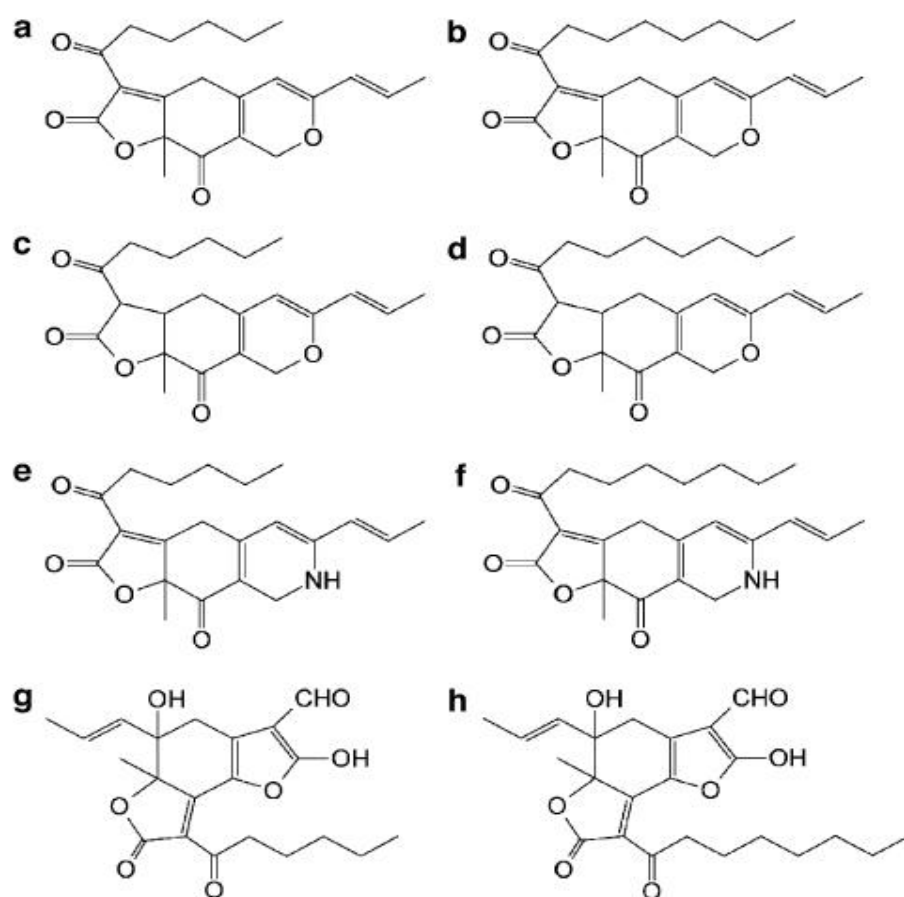
ราข้าวแดงเป็นแหล่งของสารที่สำคัญมากมาย อาทิเช่น โมนาโคลิน (monacolins) ไดไฮโดรโมนาโคลิน (dihydromonacolins) ซิตรีนิน (citrinin) แกมมา-อะมิโนบิวไทริกแอซิด (γ -aminobutyric acid: GABA) ไดเมอร์มิกแอซิด (dimerumic acid) และสารสี (pigments) สารเมทาบอลิท์ที่ได้จากราข้าวแดงสามารถจำแนกออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามการนำไปใช้ประโยชน์และหน้าที่ของสารเหล่านั้น ดังนี้ สารออกฤทธิ์ชีวภาพ (bioactive ingredients) สารพิษ (toxins) และสารสี (pigments)

2.2.1 สารสี (pigments)

สารสีจากราโมแนสคัสมีทั้งหมด 6 ชนิด แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม แยกตามสี คือ สารสีแดง ประกอบด้วย rubropunctamine และ monascorubramine สารสีในกลุ่มนี้พบมากที่สุด สารสีส้มประกอบด้วย rubropunctatin และ monascorubrin สารสีเหลืองประกอบด้วย monascin และ ankaflavin นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสารสีเหลืองชนิดใหม่ซึ่งแยกได้จาก *Monascus anka* คือ xanthomonasin A (ภาพที่ 2) สารสีที่สกัดจาก *M. anka* มีฤทธิ์ยับยั้ง 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการเกิดมะเร็งในหนู (Yasukawa *et al.*, 1996) ในจำนวนสารสีทั้งหมดจากราโมแนสคัส monascorubrin มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้ง TPA และยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ด้วย (Yasukawa *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาว่าสารในกลุ่มสีเหลืองสามารถยับยั้งมะเร็งได้เช่นกัน โดย monascin สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งผิวหนังที่มีสาเหตุจาก peroxynitrite หรือแสงยูวี (ultraviolet light) หรือจากการเพิ่มของ TPA ได้ (Akihisa *et al.*, 2005a) และ ankaflavin ยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) และยังมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) สาร monascin analogs ที่สังเคราะห์ขึ้นมาพบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ (Su *et al.*, 2005) ยังมีรายงานเพิ่มเติมว่าสารสีส้มมีฤทธิ์สามารถกดระบบภูมิคุ้มกัน mouse T splenocytes ได้ (Martínková *et al.*, 1999) ความคงตัวของเม็ดสี ได้มีการศึกษาพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัว คือ แสง อุณหภูมิ และพีเอช กล่าวคือ สารสีแดงที่ได้รับแสงนาน 50 วัน จะโดนทำลายไป 20 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเก็บสารสีแดงไว้ในอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง สารสีแดงจะโดนทำลายไป 30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สารสีแดงจะมีความคงตัวที่สภาวะความเป็นกลาง (pH 7) หรือสภาวะความเป็นเบส (pH 9.5) ได้ดีกว่าสภาวะกรด (pH 3) เป็นระยะเวลานาน 5 ชั่วโมง

ในปัจจุบันได้มีการนำสารสีแดงจากราโมแนสคัสไปประยุกต์ใช้กับอาหารโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์จากเนื้อ โดยมีความต้องการนำไปใช้ทดแทนสารเคมีที่ช่วยเพิ่มสี เช่น เกลือไนไตรท์ (nitrite salts) หรือ cochineal เป็นต้น โดยมีการเติมสารสี ปริมาณ 0.25-1.2 กรัมต่อกิโลกรัมของผลิตภัณฑ์เนื้อ (เช่น ไส้กรอก) ผลจากการเติมสารสีจากราโมแนสคัสมีข้อดี คือ สีของ

ผลิตภัณฑ์สามารถอยู่ได้เป็นระยะเวลานานถึง 3 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศ นอกจากจะมีความคงตัวนานแล้วยังทำให้เนื้อสัมผัสและรสชาติของผลิตภัณฑ์ดีขึ้นอีกด้วย



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างเคมีของสารสีจากโมแนสคัส a คือ rubropunctatin, b คือ monascorubrin, c คือ monascin, d คือ ankaflavin และ e คือ rubropunctamine, f คือ monascorubramine, g คือ xanthomonasin A, h คือ xanthomonasin B

ที่มา : Lin *et al.*, (2008)

2.3 การผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส

Su and Huang. (1980) ศึกษาเกี่ยวกับสีที่เชื้อราโมแนสคัสสร้างขึ้นซึ่งมีลักษณะเป็น granular fluid จะถูกปลดปล่อยออกมาตามรูหรือรอยแตกของผนังเส้นใยของเชื้อรา บางครั้ง การปลดปล่อยสีออกนอกเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์นั้นจะทำให้สีติดอยู่ตามปลายของเส้นใยเกิดการสะสมจำนวนมากก่อนที่จะหลุดออกจากเส้นใยขณะเดียวกันสีบางส่วนยังคงสะสมอยู่ภายในของเชื้อรา

สีจากเชื้อราโมแนสคัสเป็นสารประเภท polyketide ซึ่งเกิดจากการรวมกันระหว่าง อะซีเตต (acetate) 1 โมเลกุลกับมาโลเนต (malonate) 5 โมเลกุล โดยเอนไซม์ polyketide synthase เกิดเป็น hexaketide chromophore ซึ่งกระบวนการจะดำเนินต่อไปเรื่อย ๆ จนได้ polyketide chromophore แล้วจึงจะมารวมกับกรดไขมันขนาดกลาง (medium-chain fatty acid) เช่น octanoic acid ที่ถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (fatty acid biosynthetic pathway) โดยปฏิกิริยา trans-esterification เกิดเป็นสารสีส้ม คือ monascorubrin (หรือได้ rubropunctatin ถ้ากรดไขมันที่ทำปฏิกิริยา trans-esterification กับ polyketide chromophore เป็น hexanoic acid) จากนั้นสารสีส้ม monascorubrin จะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) แล้วได้เป็นสารสีเหลือง คือ ankaflavin (หรือได้สารสีเหลือง monascin ที่เกิดขึ้นจากสารสีส้ม rubropunctatin) ในขณะที่สารสีแดง ได้แก่ monascorubramine และ rubropunctamine เกิดจากสารสีส้มทำปฏิกิริยา amination กับ NH_3 units (Hajjaj *et al.*, 2000a; Manchand and Whalley, 1973; Turner, 1971,) ดังภาพที่ 3

Hajjaj *et al.* (2000b) ได้เพาะเลี้ยง *M. ruber* ในอาหารเหลวที่มีการเติมกลูโคสและกลูตาเมต พบว่าเชื้อจะผลิตสารสีแดงและ mycotoxin คือ ซิตรีนิน (citrinin) ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด การผลิต metabolite ทั้ง 2 ชนิดนี้สัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ซึ่งจัดเป็นสารเมทาบอลไลต์ปฐมภูมิ กล่าวคือ ในสภาวะที่มีออกซิเจนมากเกินไป การผลิตซิตรีนินซึ่งเป็นสารเมทาบอลไลต์ทุติยภูมิ จะผลิตมากระหว่าง stationary phase ส่งผลให้การผลิตสีลดลงอย่างรวดเร็วตลอดการเพาะเลี้ยง

55 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน บดให้ละเอียดเป็นผง สามารถนำไปใช้เพื่อสร้างสีในอาหารได้เลย (Pattanagul, 2002) ในการผลิตข้าวแดง สามารถใช้ข้าวได้หลากหลายสายพันธุ์ในการผลิต ยกเว้นข้าวเหนียวซึ่งเป็นข้าวเพียงชนิดเดียวที่ไม่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อผลิต สารสีจากราโมแนสคัส เนื่องจากข้าวเหนียวมีเนื้อสัมผัสที่ค่อนข้างแข็ง เหนียวและเมล็ดข้าวจับตัวกันแน่นมากเกินไป (Palo *et al.*, 1960) นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีความพยายามที่จะหาแหล่งอาหารใหม่เพื่อใช้ในการผลิตสารสีจากราโมแนสคัส อาทิเช่น ข้าว มันสำปะหลัง ข้าวสาลี ข้าวโพด (Carvalho *et al.*, 2007) เต๋อย (Pattanagul *et al.*, 2008) เมล็ดขนุน (Babitha *et al.*, 2006) เมล็ดทุเรียน (Srianta *et al.*, 2012) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีพืชหรือเมล็ดผลไม้หลายชนิดที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อผลิตสารสี แต่ปัจจัยสำคัญที่ควรคำนึงถึงเพื่อให้ประสิทธิภาพในการผลิตสารสีหรือสารเมทาบอลิท์อื่น ๆ เช่น เมวินอลิน (mevinolin), ซิตรีนิน และเอนไซม์อะไมเลส เป็นต้น เกิดขึ้นได้ดีที่สุด คือ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (Jozlová *et al.*, 1994; Lin and Demain, 1991; Lopez *et al.*, 2003; Pichyangkura, 1979; Wong *et al.*, 1981)

2.5 สารสีแดงกับสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์

มีรายงานการวิจัยมากมายที่นำสารสีมาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา เป็นต้น

Mukherjee and Singh. (2011) ค้นพบสารสีแดงชนิดใหม่จาก *M. purpureus* ที่เกิดขึ้นจากการหมักเพื่อผลิตสารสีในอาหารเหลว เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วย UV-vis, IR, GC-MS และ NMR analyses พบว่าโครงสร้างของสารสีชนิดใหม่ คือ 9-(1-hydroxyhexyl)-3-(2-hydroxypropyl)-6a-methyl-9,9a-dihydrofuro [2,3-h]isoquinoline-6,8 (2H, 6aH)-dione คล้ายกับสารสีแดงชนิดเก่าทั้ง rubropunctamine และ monascorubramine โดยแตกต่างกันที่มีหมู่ hydroxy alkane แทนที่ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 9 เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสีชนิดใหม่ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี

Kim *et al.* (2006b) ได้ทำการผลิตสารสีในอาหารเหลว โดยทำการเปลี่ยนแปลงชนิดกรดอะมิโนที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน จากการศึกษพบว่าสารสีแดงที่ใช้กรดอะมิโนชนิด L-Phe, D-Phe, L-Tyr และ D-Tyr เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 4–8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสีแดงที่ใช้กรดอะมิโนชนิด L-Asp, D-Asp, L-Tyr และ D-Tyr เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* และยีสต์ *Candida albicans* ได้ การยับยั้งของสารสีต่อเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะสารสีที่ใช้กรดอะมิโนที่มีวงแหวน phenyl เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเฉพาะ Phe และ Tyr พบว่ามีประสิทธิภาพดีที่สุด นอกจากนี้สารสีที่ได้จาก L-Phe ทำให้เซลล์ *B. subtilis* เกิดการจับตัวกันแน่นจนกลายเป็นตะกอน เมื่อทำการศึกษาดูดซึมของสารสีที่ได้จาก L-Phe ด้วย

เทคนิค SEM และ TEM โดยใช้เซลล์ *E. coli* เป็นต้นแบบ พบว่าการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ จุลินทรีย์ลดลง ดังนั้นกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสีสัมพันธ์กับการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์

Ungureanu and Ferdes (n.d.) รายงานว่าสารสีเหลืองที่ได้จากเชื้อรา *M. purpureus* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Escherichia* และเชื้อราสกุล *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* และ *Fusarium* ได้

2.6 โรคพืช

หมายถึง พืชที่แสดงอาการผิดปกติทางด้านสรีรวิทยาและทางกายภาพ เช่น การสังเคราะห์แสง การแบ่งเซลล์ การลำเลียงน้ำและอาหารเพื่อใช้บำรุงต้น นอกจากนี้สามารถรวมถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับพืชจนทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง โรคพืชจะเกิดขึ้นได้นั้นต้องมีปัจจัย 3 อย่างคือ

1. พืชอ่อนแอต่อการเกิดโรค
2. เชื้อสาเหตุของโรค
3. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค

ปัจจัยทั้ง 3 กระทบกันเอื้อต่อกันก็สามารถก่อให้เกิดโรคแก่ต้นพืชได้

2.6.1 สาเหตุการเกิดโรค

สาเหตุการเกิดโรคสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ จากสิ่งที่ไม่มีชีวิต เช่น สภาพแวดล้อมที่อากาศเป็นพิษ ดินเค็ม อากาศหนาวเย็น ลมพัดแรง ฤดูแล้ง และการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช และสาเหตุที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ พืชและแมลง เช่น

- เชื้อรา (fungi) พบอาการมากมายหลายแบบ ถ้าอากาศมีความชื้นมากอาจจะพบเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราได้ ตัวอย่างโรคที่เกิดกับพืช เช่น โรคใบจุด โรครากเน่าโคนเน่า โรคแอนแทรคโนส โรคเหี่ยว โรคราแป้ง โรคสแคป โรคเน่าระดับดิน โรคใบไหม้ โรคราสนิม โรคราน้ำค้าง
- แบคทีเรีย (bacteria) โดยมากมักเป็นจุดดำน้ำเน่า ถ้าในอากาศมีความชื้นสูงอาจพบเมือกแบคทีเรียทะลักออกจากแผลตัวอย่างโรคที่เกิดกับพืช เช่น โรคเหี่ยว โรคขอบใบแห้ง โรคเน่า และโรคเน่าดำ โรคแคงเกอร์
- ไร้เดือนฝอย (nematode) ต้นพืชชะงักการเจริญเติบโตเนื่องจากรากถูกทำลาย เกิดปมราก รากเป็นแผลหรือบิดเบี้ยว เป็นต้น ตัวอย่างโรคที่เกิดกับพืช เช่น โรครากปม
- ไวรัส (virus) พืชแสดงอาการขีดเหลืองต่าง ใบบิดเบี้ยวเสียรูปร่าง พบแมลงปากดูดเป็นพาหะของโรค ตัวอย่างโรคที่เกิดกับพืช เช่น โรคใบด่าง โรคใบหงิกงอ

- ไฟโตพลาสมา (phytoplasma) ต้นพืชชะงักการเจริญเติบโต เหลือง การแตกยอด ใบ ตา ผิดปกติตัวอย่างโรคที่เกิดกับพืช เช่น โรคใบขาว โรคพุ่มไม้กวาด
- สาหร่าย (algal disease) พบสาหร่ายเป็นกลุ่ม ๆ สืบเชื้อสายสืบมบนส่วนของพืช เช่น ใบ ซึ่งจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากพืชอาศัยและทำให้พืชสังเคราะห์แสงน้อย
- พืชชั้นสูง เช่น กาฝากฝอยทอง โดยส่วนของรากพืชเหล่านี้ จะฝังลึกลงไปดูดน้ำเลี้ยงจากพืชอาศัย ทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต ยอดบิดเบี้ยวและเหลืองตายในที่สุด
- แมลง และสัตว์ศัตรูอื่น ๆ พบร่องรอยการกัดกินตามส่วนต่าง ๆ ของพืชหรือบางชนิด อาจดูดกินน้ำเลี้ยง ทำให้เนื้อเยื่อบิดเบี้ยว ชีดเหลือง

2.6.2. แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (Plant Diseases Caused by Bacteria)

ลักษณะของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (characteristics of phytopathogenic bacteria)

- รูปร่างเป็นแท่ง ยกเว้น *Streptomyces* sp.
- ส่วนใหญ่เป็นพวกไม่มีการสร้างสปอร์ ยกเว้น *Streptomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, coryneform bacteria (*Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Rhodococcus*)
- ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ยกเว้น *Streptomyces* sp. และ coryneform bacteria
- แบคทีเรียโรคพืชส่วนใหญ่ เป็นพวกต้องการออกซิเจน ยกเว้น *Erwinia* ที่เป็นชนิดมีหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้
- ส่วนใหญ่เป็น soil borne และ facultative parasites
- มี 7 genera ที่สร้างสารสีได้
- ส่วนใหญ่มี slime layer/capsule
- มี flagella (ยกเว้น *Streptomyces* sp., *E. stewartii*, coryneform bacteria) ที่ยาวกว่าขนาดของเซลล์ (ธรรมบุญ อ่อนแก้ว, 2553)

2.7 การยืดเกาะพื้นผิวเนื้อเยื่อพืชของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช จะก่อให้เกิดโรคกับพืชได้นั้น กระบวนการแรกที่สำคัญต่อการเกิดโรค คือ ความสามารถในการยืดเกาะกับผิวหน้าของเนื้อเยื่อพืชให้ได้ เมื่อแบคทีเรียสามารถยืดเกาะพื้นผิวเนื้อเยื่อพืชได้แล้ว จะเพิ่มจำนวนตรงบริเวณที่มีการยืดเกาะ ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคกับพืชได้ในที่สุด ภายหลังจากแบคทีเรียยืดเกาะกับเนื้อเยื่อพืชได้แล้ว แบคทีเรียจะพยายามรักษาหรือยืดเกาะเนื้อเยื่อพืชให้ได้อย่างเหนียวแน่น สมบัติของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชมักจะทนต่อความแห้งแล้ง รังสียูวี และทนต่อการกำจัดออกจากเนื้อเยื่อที่ยืดเกาะด้วยวิธีทางกายภาพ

เช่น ฝนและลมได้ดี (Binns and Thomashow, 1988; Daniels *et al.*, 1988; Dixon and Lamb, 1990)

2.7.1 แรงที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะระหว่างเซลล์พืชและเซลล์แบคทีเรีย

การเริ่มต้นยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียต่อพื้นผิวเนื้อเยื่อพืชนั้น มักจะเป็นกระบวนการที่ไม่มีความจำเพาะและไม่มีความแข็งแรงในการจับ แต่เมื่อยึดเกาะกับเนื้อเยื่อได้แล้ว การยึดเกาะจะมีความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น ในสภาพที่มีความชื้นสูง ถ้าหากประจุสุทธิที่พื้นผิวเนื้อเยื่อพืชและเซลล์แบคทีเรียมีประจุเป็นลบ จะทำให้เกิดแรงผลักทางไฟฟ้า (electrostatic force) ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียไม่สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวเนื้อเยื่อพืชได้ ดังนั้นเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการยึดเกาะพื้นผิวเนื้อเยื่อพืชให้ได้ จะต้องสร้างพันธะใดพันธะหนึ่งกับประจุบวกบนพื้นผิวเนื้อเยื่อพืช เช่น พันธะไอออนิก พันธะไฮโดรเจนหรือแรงแวนเดอวาลส์ (van der Waals) นอกจากนี้ องค์ประกอบบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อพืชและโปรตีนที่ผิวเซลล์แบคทีเรียที่มีลักษณะไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะทำให้เซลล์แบคทีเรีย สามารถเข้ามาอยู่ใกล้ชิดกับเซลล์ของพืชได้มากขึ้น ทำให้เกิดการยึดเกาะระหว่างกันได้ง่ายยิ่งขึ้น (Bell, 1978; Lippincott and Lippincott, 1984)

2.7.2 ความจำเพาะของเซลล์เจ้าบ้านและบริเวณที่ยึดเกาะ

การยึดเกาะเบื้องต้นระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับเซลล์พืชนั้นจะไม่มี ความจำเพาะและเมื่อยึดเกาะได้แล้วจะเพิ่มปริมาณเป็นจำนวนมากตรงบริเวณที่ยึดเกาะ เช่น เชื้อ *Pseudomonas syringae* 5 สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรค จะสามารถยึดเกาะพืชที่ก่อให้เกิดโรคอยู่แล้วกับใบของต้นถั่วซึ่งเป็นพืชที่ปกติที่ไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อชนิดนี้ได้ดีเท่า ๆ กัน (Korhonen *et al.*, 1987; Romantschuk *et al.*, 1991) และสายพันธุ์ *lachrymans* และ *glycinea* สามารถยึดเกาะใบของแตงกวาและถั่วได้ (Jasalavich, 1987) เช่นเดียวกันเชื้อแบคทีเรีย *Klebsiella* และ *Enterobacter* สามารถยึดเกาะขนรากของพืชภายในหลอดทดลองได้ ซึ่งไม่เคยมีรายงานการยึดเกาะที่รากของพืชที่เป็นพืชที่จำเพาะกับเชื้อชนิดนี้ในธรรมชาติมาก่อน (Haahtela *et al.*, 1986)

ความจำเพาะของตำแหน่งการยึดเกาะที่เนื้อเยื่อผิวของพืชก็มีความสำคัญ เชื้อ *P. syringae* pv. *phaseolicola* จะชอบยึดเกาะปากใบของถั่วเหลืองมากกว่าบริเวณอื่น ๆ (Romantschuk *et al.*, 1986) ในขณะที่ pv. *syringae* ที่ก่อให้เกิดโรคในข้าวโพดและถั่วเหลือง มักจะยึดเกาะที่บริเวณใบมากกว่าบริเวณอื่น ๆ ของพืชที่ทำให้เกิดโรคและพืชที่ไม่เกิดโรค (Mills *et al.*, 1991; Nurmiäho-Laasila *et al.*, 1991) เชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi* ชอบยึดเกาะบริเวณปากใบของ hyacinth มากกว่าบริเวณอื่น ๆ (van Doorn *et al.*, 1991) เชื้อ *Klebsiella* spp. ชอบยึดเกาะเซลล์ผิว (epidermal cell) ที่ขนราก แต่ไม่ยึดเกาะกับเซลล์บริเวณอื่น ๆ ของราก (Haahtela *et al.*, 1986)

2.7.3 โครงสร้างของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะ

กลไกการจดจำและการยึดจับระดับโมเลกุลของแบคทีเรียต่อเนื้อเยื่อพืชนั้นมีไม่กี่ระบบ แต่อย่างไรก็ตามระบบดังกล่าวก็มีความสำคัญ มีความจำเพาะและเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมการจับของเซลล์แบคทีเรียต่อพื้นผิวเนื้อเยื่อพืชเป้าหมาย โครงสร้างต่าง ๆ ที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรียหรือโมเลกุลที่ขับออกมาจากเซลล์ เรียกว่า adhesins ที่มีความสำคัญต่อการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียโรคพืช ประกอบด้วย 1) โปรตีนที่เป็นรยางค์ออกมาจากเซลล์ ประกอบด้วยฟิมเบเลีย (fimbriae) และพิล (pili) 2) พอลิแซ็กคาไรด์ เช่น เซลลูโลส 3) โมเลกุลขนาดเล็กที่ละลายน้ำได้ เช่น β -1,2-glucan

- ฟิมเบเลีย (fimbriae) และพิล (pili)

ฟิมเบเลีย (fimbriae) และพิล (pili) เป็นรยางค์ที่ออกมาจากเซลล์แบคทีเรียหลายชนิด โครงสร้างจะประกอบด้วยโปรตีน รยางค์ทั้งสองนี้มีความยาวประมาณ 0.2-20 ไมโครเมตร กว้างประมาณ 3-14 นาโนเมตร (Ottow, 1975) รยางค์ทั้งสองนี้จะประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยหลักที่มีขนาดตั้งแต่ 9 ถึง 22 กิโลดาลตัน (Ottow, 1975; Jann and Jann, 1990) มาจับตัวเรียงกันเป็นเกลียว และยังมีหน่วยย่อยรองที่อยู่บริเวณปลายสุดของรยางค์ ซึ่งโปรตีนหน่วยย่อยรองนั้นจะทำหน้าที่เป็น adhesins ใช้ในการยึดจับกับตัวรับที่ผิวเนื้อเยื่อพืชเป้าหมาย รยางค์ทั้งสองนี้จะมีฐานฝังตัวอยู่ในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ ตัวรับการยึดเกาะของฟิมเบเลียจะเป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตของไกลโคโปรตีนและไขมัน การจับของฟิมเบเลียต่อตัวรับคาร์โบไฮเดรตจะมีความจำเพาะค่อนข้างสูง (Jann and Jann, 1990) ส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช มักจะมีการสร้างฟิมเบเลียหรือพิล (Cuppels *et al.*, 1979; Haahtela *et al.*, 1985; Korhonen *et al.*, 1986)

ฟิมเบเลียจะมีจำนวนมากกว่าพิล แต่จะสั้นและแข็งกว่าพิล ในขณะที่พิลจะยาวและยืดหยุ่นกว่า พิลอาจจะทำหน้าที่ในกระบวนการ conjugation และเป็นตัวรับของ bacteriophage (Bradley, 1972; Novotny and Fives, 1974) หน้าที่ของฟิมเบเลียและพิล คือเป็นโครงสร้างที่ใช้ในการยึดเกาะกับเซลล์อื่น ๆ ไม่ว่าจะเป็นสัตว์ พืช แบคทีเรียหรือพื้นผิวอื่น ๆ ที่ไม่ใช่สิ่งมีชีวิตก็ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพิลเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่อีกด้วย แบคทีเรียที่มีฟิมเบเลียและพิล ประกอบด้วย *P. solanacearum*, *P. syringae*, *P. savastanoi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium trifolii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Erwinia* และ *Xanthomonas* (Stemmer and Sequeira, 1987)

เชื้อ *Erwinia rhapontici* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคกับต้น rhubarb (*Rheum rhaponticum*) และข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และกล้องจุลทรรศน์ fluorescence พบว่าเชื้อชนิดนี้จะใช้ฟิมเบเลียในการยึดเกาะเซลล์กับผิวใบของต้น rhubarb และข้าวสาลี (Louhelainen *et al.*, 1990) เชื้อ *P. solanacearum* จะใช้

พืชมเบสียในการยึดเกาะกับผนังเซลล์ของใบยาสูบและใช้ในการเกาะกลุ่มกัน (Stemmer and Sequeira, 1987; Young and Sequeira, 1986)

ไฟบริล (fibrils) เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ลูโลสที่พบในแบคทีเรีย จากการศึกษาพบว่าภายหลังจากการยึดจับ 2 ชั่วโมง รอบ ๆ เซลล์แบคทีเรียจะเกิดไฟบริลล้อมรอบเซลล์เป็นจำนวนมาก เมื่อระยะเวลาผ่านไปเซลล์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นและจะเกาะกลุ่มกันระหว่างเซลล์แบคทีเรียด้วยกันเองและระหว่างเซลล์แบคทีเรียกับเซลล์พืชโดยใช้ไฟบริลตรงบริเวณที่ยึดจับกับเนื้อเยื่อพืช เมื่อทำการกลายพันธุ์เซลล์แบคทีเรียจนไม่สามารถสร้างไฟบริลได้ พบว่าเซลล์จะไม่มีเกาะกลุ่มกัน ถึงแม้ไฟบริลจะไม่ได้มีความสำคัญมากจนถึงกับขาดไม่ได้แต่การสร้างไฟบริลขึ้นมาก็จะทำให้ประสิทธิภาพการยึดเกาะดีขึ้นและยากต่อการล้างออก (Deasey and Matthysse, 1984)

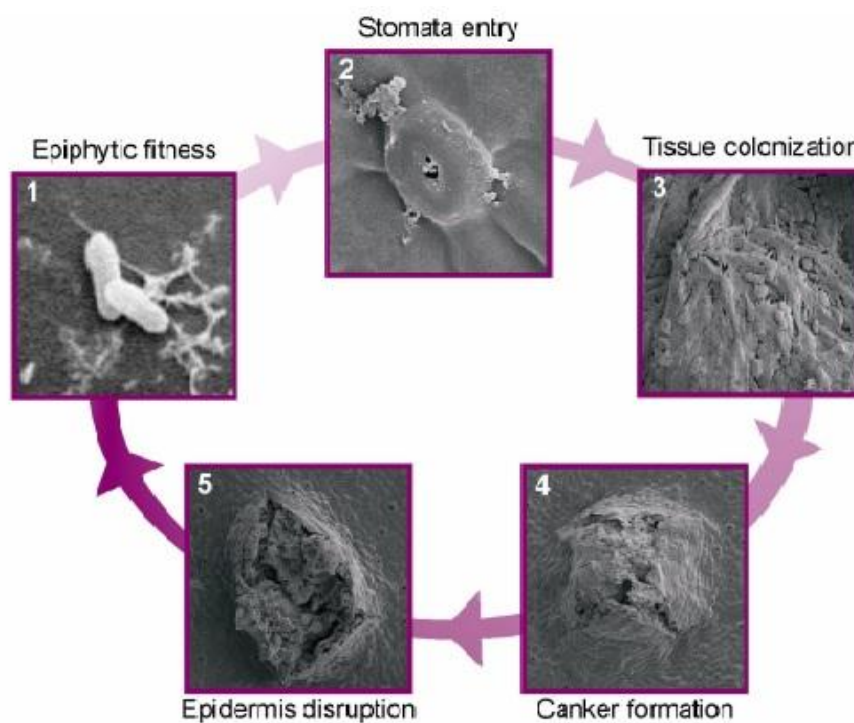
โมเลกุล β -1,2-glucan เป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญของ *Agrobacterium* ต่อการยึดเกาะเซลล์พืชและทำให้เกิดโรค การทำการกลายพันธุ์ยีนที่สร้างโมเลกุลดังกล่าว จะทำให้ความสามารถในการยึดเกาะของ *Agrobacterium* ต่อเซลล์พืชลดลง (Cangelosi *et al.*, 1987; Douglas *et al.*, 1985)

2.8 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคแคงเกอร์ที่ก่อให้เกิดความเสียหายเป็นจำนวนมากกับพืชตระกูลส้มทั่วโลก โรคชนิดนี้พบได้บ่อยในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในพื้นที่แถบอเมริกาใต้นั้นพบการระบาดครั้งแรกที่ประเทศบราซิล จากนั้นก็แพร่กระจายอย่างกว้างขวาง เช่น ประเทศอาร์เจนตินา ซึ่งเป็นผู้ผลิตหลักในการผลิตส้ม มะนาว ส้มเขียวหวาน และผลไม้จำพวกส้มอื่น ๆ การแพร่ระบาดของเชื้อชนิดนี้นั้นก่อให้เกิดความเสียหายทางการค้าในประเทศที่มีการปลูกพืชตระกูลส้ม เนื่องจากไม่สามารถจำหน่ายในรูปของผลไม้สดได้ เพราะเกิดความเสียหายต่อผล มีตำหนิ ทำให้ไม่สามารถส่งขายไปยังตลาดต่างประเทศได้ ในปัจจุบันการกำจัดโรคแคงเกอร์สามารถกระทำได้โดยการเผาทำลายต้นพืชที่เป็นโรค (Graham *et al.*, 2004)

เชื้อชนิดนี้จะเข้าสู่ต้นพืชผ่านทางใบ ลำต้นและผล โดยเชื้อมักจะเข้าสู่ลำต้นพืชผ่านทางปากใบและบาดแผลที่เกิดขึ้นกับต้นพืช อาการเริ่มต้นของโรคแคงเกอร์จะปรากฏลักษณะเป็นรอยจุดกลม ๆ ที่ผิวใบ ต่อมาเชื้อจะเพิ่มปริมาณจำนวนมากภายในช่องว่างระหว่างเซลล์พืช จากนั้นเชื้อจะไปกระตุ้นให้เนื้อเยื่อผิวเกิดการเพิ่มจำนวนมากผิดปกติ (cell hyperplasia) จนเนื้อเยื่อผิวของใบถูกทำลาย (ภาพที่ 4) เมื่อระยะเวลาผ่านไปใบ ลำต้นและผลที่มีการติดเชื้อจะปรากฏรอยแผลไหม้ขยายวงกว้าง สีเข้มและหนาขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งเป็นลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากการตายของเซลล์ ภายในรอยแผลดังกล่าว เชื้อชนิดนี้สามารถอยู่รอดและแบ่งตัวเพิ่มจำนวน

ได้ ถ้าหากได้รับน้ำ (ฝนตก) จะทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ใหม่และแพร่กระจายไปยังพืชต้นใหม่ได้ (Brunings and Gabriel, 2003)



ภาพที่ 4 แสดงการเกิดโรคแคงเกอร์ แบคทีเรียยึดเกาะกับใบ ลำต้นและผล (ปกติเชื้อชนิดนี้จะ เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่บนผิวเซลล์ของพืช) (1) เชื้อจะเข้าสู่ต้นพืชผ่านทางปากใบและทางบาดแผล (2) อาการเริ่มต้นจะมีลักษณะเป็นรอยจุดกลม ๆ บนผิวใบ จากนั้นแบคทีเรีย จะเพิ่มจำนวนภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ (3) รอยแผลขยายวงกว้าง สีเข้มและหนา มากขึ้น ทำให้เกิดลักษณะของโรคแคงเกอร์ชัดเจน (4) แบคทีเรียกระตุ้นการเพิ่มจำนวน เซลล์มากจนผิดปกติ ทำให้เนื้อเยื่อผิวใบถูกทำลาย (5) แบคทีเรียสามารถแพร่กระจาย ได้ โดยอาศัยลมและฝน ไปยังต้นพืชต้นใหม่จะวนเวียนเป็นวัฏจักร

ที่มา : Gottig *et al.*, (2010)



ภาพที่ 5 แสดงรอยไหม้ของผลและใบมะนาวที่เป็นโรคแคงเกอร์ โดยจะเกิดเป็นแผลกลม จากนั้นขยายใหญ่ พุ่มนคล้ายฟองน้ำ มีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีเหลืองเข้ม ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและจะแตกเป็นสะเก็ด มีสีเหลืองล้อมรอบแผล

ที่มา : Polek *et al.*, (N.D.)

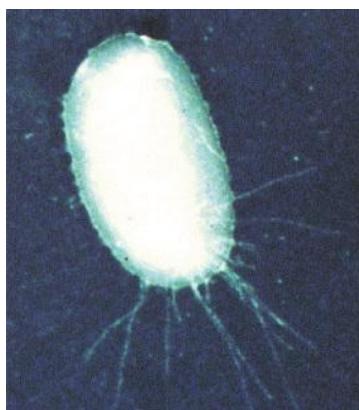
2.9 *Ralstonia solanacearum*

เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) เซลล์หัวท้ายมนขนาดเฉลี่ย $0.5-0.6 \times 0.8-1.2$ ไมครอน เคลื่อนได้โดย polar flagella 1-4 เส้นซึ่งติดอยู่ที่ขั้วด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (polar flagella) เชื้อพวกรุนแรง (virulent) ส่วนใหญ่เป็นแบบ non-flagella ไม่เคลื่อนที่ เชื้อพวกที่ไม่รุนแรง (avirulent) จะใช้ flagella ช่วยในการเคลื่อนที่ เชื้อชนิดนี้อาจกล่าวได้ว่าเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชผลทางการเกษตรทั่วโลกมากที่สุด สายพันธุ์ของเชื้อชนิดนี้มีมากมายที่แตกต่างกันไปตามแหล่งที่อยู่ พืชที่เข้าทำลายและพฤติกรรมทำให้เกิดโรค (Denny, 2006; Genin, 2010) เชื้อชนิดนี้สามารถเข้าทำลายพืชได้มากมายหลากหลายชนิด โดยพบว่าสามารถทำลายพืชได้สูงถึง 200 ชนิด โดยที่เชื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคเน่าสีน้ำตาลในมันฝรั่ง (potato brown rot) โรคเหี่ยว (bacterial wilt) ในมะเขือเทศ ยาสูบ มะเขือยาวและไม้ดอกไม้ประดับ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดโรค Moko ในกล้วยด้วย

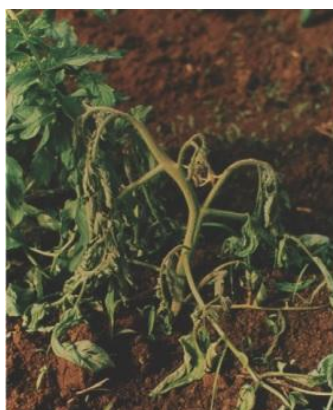
R. solanacearum เป็นเชื้อที่อยู่ในดิน จะเข้าสู่ภายในต้นพืชและก่อให้เกิดอาการเหี่ยวนั้น ส่วนใหญ่เข้าทางบาดแผลหรือเข้าทางช่องเปิดธรรมชาติของพืช ส่วนการเข้าทำลายที่รากหรือส่วนของพืชที่อยู่ในดินส่วนใหญ่จะผ่านทางบาดแผลที่อาจเกิดจากการทำเกษตรกรรมหรือการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย เมื่อเชื้อชนิดนี้เข้าสู่ต้นพืชได้แล้ว จะทำการเพิ่มจำนวนที่ชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex) อย่างรวดเร็ว จากนั้นจะเข้าสู่ท่อลำเลียงน้ำ (xylem) แพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืช เซลล์ของเนื้อเยื่อพืชจะถูกทำลายทำให้สารต่าง ๆ ภายในเซลล์ไหลมารวมกันทำให้เกิดแรงดันรอบเซลล์ parenchyma ท่อน้ำแตกออกเชื้อจะเข้าทำลาย pith, cambium, phloem ต่อไป ท่อน้ำท่ออาหารจะเต็มไปด้วยเซลล์ของแบคทีเรียและเมือก (slime) ซึ่งเมือกนี้จะ

เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของพวก polysaccharide (complex polysaccharide) สารเมื่อจะเพิ่มความเหนียวขึ้นทำให้เกิดการอุดตันขึ้นภายในท่อน้ำและท่ออาหาร พืชดูดน้ำและอาหารขึ้นไปหล่อเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของลำต้นได้น้อยกว่าปกติ ก่อให้เกิดอาการเหี่ยวขึ้นและตายในที่สุด

ความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เกิดจากการเข้าทำลายของ *R. solanacearum* ต่อพืชผลทางการเกษตรอยู่ในระดับที่สูง เนื่องจากเชื้อชนิดนี้สามารถทำลายพืชได้หลายชนิดและสามารถแพร่กระจาย มีชีวิตอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลายได้ จากการประเมินค่าความเสียหายการเข้าทำลายของเชื้อชนิดนี้ในต้นมะเขือเทศ พบว่าความเสียหายในแต่ละปีทั่วโลกคิดเป็นมูลค่ากว่า 1 พันล้านดอลลาร์ (Elphinstone, 2005) ความเสียหายที่เกิดขึ้นมักจะเกิดในการเกษตรของประเทศกำลังพัฒนาที่อยู่ในเขตร้อนชื้น โดยเชื้อชนิดนี้จะแฝงตัวอยู่ในดินตรวจสอบได้ยาก เมื่อใช้ดินดังกล่าวทำการเพาะปลูกต่อเนื่อง จึงทำให้เชื้อสามารถทำลายพืชต่อไปได้เรื่อย ๆ เกิดความเสียหายมากขึ้นตามมาเป็นลำดับ การกำจัดเชื้อชนิดนี้ให้หมดไปกระทำได้ยาก เนื่องจากยังไม่มีวิธีการกำจัดที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดและเชื้อสามารถอยู่รอดได้นานนับปีภายในดินที่เปียกชื้น แหล่งน้ำตามธรรมชาติและเซลล์พืชที่ตายแล้วหรือในวัชพืชที่ไม่แสดงอาการของโรค ถึงแม้จะมีความพยายามพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่ต้านทานต่อเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามก็เป็นการป้องกันได้เพียงระดับหนึ่ง เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีหลายสายพันธุ์ ดังนั้นพืชที่ได้ใหม่อาจจะไม่สามารถต้านทานเชื้อได้ทุกสายพันธุ์



ก.



ข.



ค.

ภาพที่ 6 ลักษณะสัณฐาน *R. solanacearum* (ก) แสดงอาการเหี่ยวของต้นมะเขือเทศ (ข) แสดงการไหลของเชื้อออกจากท่อน้ำเลี้ยงน้ำ ภายหลังการตัดลำต้น (ค)

ที่มา : Mansfield *et al.*, (2012)

บทที่ 3

แนวทาง/ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.1 การเตรียมเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3541 และแบคทีเรียก่อโรคในพืช

นำเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3541 ที่ส่งชื่อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) มาเพาะเชื้อบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สำหรับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. ชลิดา เล็กสมบุรณ์ ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient glucose agar (NGA) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในตลอดการทดลอง

3.2 การเตรียมสารละลายสปอร์ของกล้าเชื้อ *M. purpureus* TISTR 3541

นำเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3541 ไปขีดเชื้อ (streak) บนอาหารแข็งเลี้ยง PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำสารละลายสปอร์โดยใช้ phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในขั้นตอนต่อไป

3.3 การผลิตสารสีจากเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3541 โดยการหมักบนอาหารแข็งตามวิธีการของ Lee *et al.* (2002)

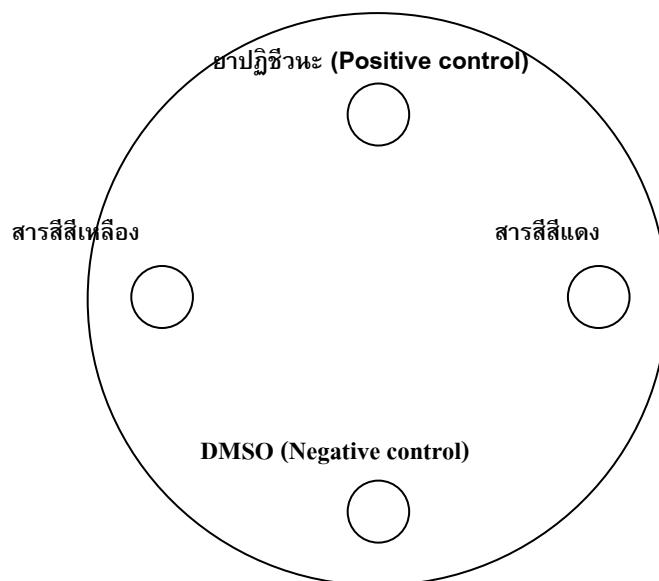
แช่ข้าวหอมมะลิ 100 กรัม ในน้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยน้ำทิ้งและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ใส่ข้าวที่แช่แล้วลงใน erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Yongsmith *et al.*, 2000) นำสารละลายสปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากข้อ 3.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในข้าวหอมมะลิที่นึ่งฆ่าเชื้อและทิ้งให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบเวลาทำการสกัดสารสีแดง โดยนำข้าวแดงที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดละเอียดแล้วสกัดด้วย 95% เอทานอล โดยใช้อัตราส่วนข้าวแดง 1 กรัม ต่อ 95% เอทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาหมุนเหวี่ยงแยกเอาของแข็งออกที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำของเหลวที่ได้ไปวัดปริมาณสารสีเหลือง (ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร) สารสีส้ม (ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร) และสารสีแดง (ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จะได้ปริมาณสารสีที่แสดงในหน่วยต่อ 1 กรัมของน้ำหนักแห้งข้าวแดง (Au/g substrate) โดยสารสี 1 หน่วย (Unit) คือ สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนั้น ๆ เท่ากับ 1 โดยใช้ 95% เอทานอล เป็นสารละลายเปรียบเทียบมาตรฐาน จากนั้นนำสารสกัดหยาบข้าวแดงไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator

3.4 การแยกและทำบริสุทธิ์สารสีจากเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3541 ด้วยเทคนิค column chromatography ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim et al. (2006b)

นำสารสกัดหยาบจากข้อ 3.3 มาทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography เริ่มต้นจากหาระบบของอัตราส่วนตัวชะที่เหมาะสมระหว่างตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ คลอโรฟอร์มและเมทานอล ที่สามารถทำให้สารสีแต่ละชนิดแยกออกจากกันด้วยเทคนิค prep-TLC (preparative-thin layer chromatography) จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากข้าวแดงมาละลายด้วยตัวชะดังกล่าวข้างต้น ดูดแบ่งสารละลายข้าวแดง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับ silica gel ปริมาณ 1 กรัม (หรือเติมในสัดส่วนที่ silica gel สามารถดูดซับสารละลายข้าวแดงได้หมดพอดี) ซึ่ง silica gel จะดูดซับสารละลายเอาไว้ จากนั้นนำ silica gel ใส่ลงในคอลัมน์ขนาด 70x300 มิลลิเมตร ทำการแยกสารสีแดงออกมาด้วยสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอล นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไประเหยตัวทำละลาย (คลอโรฟอร์มและเมทานอล) ออกจนแห้ง ต่อมานำสารสีที่ได้จากการทำ column chromatography มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค prep-TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 65 : 25 : 4 (v/v)

3.5 ผลของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงจากเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3541 ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืชด้วยเทคนิค agar well-diffusion assays

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในพืช (ดังตารางที่ 1) ในอาหาร nutrient glucose broth (NGB) จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.2 ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 - 10^9 CFU/ml ต่อมาดูดสารละลายเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารแข็ง NGA ทำการเจาะรูด้วย cork borer ที่ปราศจากเชื้อ หยดสารละลายของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงจากเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3541 ที่ระดับความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสีเหลืองที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยใช้ยาปฏิชีวนะ streptomycin ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ DMSO เป็นกลุ่มควบคุม ดังต่อไปนี้



จากนั้นทำการบ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 29°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ บันทึกผลโดยการสังเกตวงใสที่เกิดขึ้น ถ้าเกิดวงใสแสดงว่าสารสกัดยับยั้ง สารสีแดงและสารสีเหลืองจากเชื้อราโมแนสคัสสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ทดสอบได้

ตารางที่ 1 แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในพืชซึ่งนำมาใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	Host plants	โรค
1. <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	Crucifer Lemon	Black rot Canker
2. <i>R. solanacearum</i>	Potato	Ralstonia wilt

3.6 การหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (minimum inhibitory concentration, MIC) และฆ่าเชื้อ (minimum bactericidal concentration, MBC)

การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) แบคทีเรียเป้าหมายด้วยเทคนิค well-diffusion assays ทำได้โดยการเจือจางสารสกัดหยาดขาวแดงและสารสีแดง ในเอทานอล ความเข้มข้น 95% ให้ได้ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 1.56 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยา streptomycin ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ได้ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0156 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายที่ระดับความเข้มข้นข้างต้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของจานอาหาร NGA ที่มีการเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่มีความเข้มข้น 10^5 CFU/ml บ่มเชื้อที่ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสที่เกิดขึ้น โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทำให้เกิดวงใส ถือว่าเป็นค่า MIC จากนั้นนำห่วงเชียบเชื้อ (loop) แต่ละบริเวณ

วงใส ไปขีดเชื่อบนอาหาร NGA จานใหม่ บันทึกผลว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื่อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นค่า MBC ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.7 การศึกษาผลของสารสีแดงจากเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3541 ต่อเซลล์ *X. axonopodis* pv. *citri* ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.* (2006b)

3.7.1 ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงอุลตราไวโอเลต

ทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชในอาหารเหลว NGB จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) เท่ากับ 0.2 ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณเป็น 10^8 - 10^9 CFU/ml จากนั้นทำการเติมสารสีแดงลงไปที่มีความเข้มข้นระดับค่า MIC โดยใช้เอทานอล ความเข้มข้น 95% เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นทำการบ่มอาหารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.7.2 ผลต่อค่า hydrophobicity ที่ผิวเซลล์ (cell-surface hydrophobicity)

ใช้วิธี microbial adhesion to hydrocarbon (MATH) test ตามวิธีการของ Martin *et al.* (1989) โดยนำเซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เจริญในอาหารเหลว NGB ซึ่งมีการเติมสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น 1/4MIC, 1/2MIC และ MIC มาทำการล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง และละลายใน sterile saline (0.85%) จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 นำสารละลายเซลล์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ พร้อมกับเติม toluene ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเป็นเวลา 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หลังจาก toluene แยกชั้นกับน้ำ ดูดแยกชั้นส่วนที่เป็นน้ำออกมาใส่ในหลอดทดลองใหม่ วัดค่าการดูดกลืนแสงของส่วนที่เป็นน้ำดังกล่าวที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยที่กลุ่มควบคุมจะประกอบด้วยเซลล์ที่มีการเติมหรือไม่มีการเติม 1% (v/v) เอทานอล ความเข้มข้น 95% แล้วนำไปคำนวณ ดังสูตร

$$\text{The hydrophobicity index (HPBI)} = (\text{OD}_{\text{เริ่มต้น}} - \text{OD}_{\text{สุดท้าย}} / \text{OD}_{\text{เริ่มต้น}}) \times 100$$

ถ้าค่าที่ได้มากกว่า 70% จะถือว่าเป็น hydrophobic

3.7.3 ผลต่อการยึดเกาะต่อผิวแก้ว (adherence to smooth glass surfaces)

ผลของสารสีแดงต่อการยึดเกาะ ดูจากการยับยั้งความสามารถของเซลล์ในการยึดเกาะต่อผิวแก้ว ตามวิธีการของ Segal *et al.* (1985) โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ในอาหารเหลว NGB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 2% (w/v) sucrose สารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น 1/4MIC, 1/2MIC และ MIC โดยใช้ 1% (v/v) เอทานอล ความเข้มข้น 95% เป็นกลุ่มควบคุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้น

ย้ายไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เขย่าหลอดทดลองเบา ๆ เทของเหลวทั้งหมดออกจากหลอดทดลอง จากนั้นทำการละลายเซลล์ที่เกาะที่ผิวด้านในของหลอดทดลองด้วย NaOH 0.5 M ปั่นตกตะกอนและล้างเซลล์ รวมถึงทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วย saline ต่อมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้อาหารเหลว NGB ที่มีเชื้อทดสอบเป็น positive control

3.7.4 ผลต่อการเกาะกลุ่มของเซลล์ (cellular aggregation)

ศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์ใน dextran T2000 ตามวิธีการของ Murchison *et al.*, (1981) โดยนำเซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มีความขุ่นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.8 มาบ่มร่วมกับสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น 1/4MIC, 1/2MIC และ MIC จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม dextran ลงไป โดยที่กลุ่มควบคุมจะประกอบด้วยเซลล์ที่มีหรือไม่มีการเติม 1% (v/v) เอทานอล ความเข้มข้น 95% การเกาะกลุ่มของเซลล์จะบันทึกผลเป็นช่วงคะแนน ตั้งแต่ 0 ถึง 4+ โดยกำหนดช่วงคะแนนดังนี้

- 0 คือ ไม่มีการเกาะกลุ่ม
- 1+ คือ เกาะกลุ่มเล็กน้อย หลอดอาหารยังขุ่น
- 2+ คือ เกาะกลุ่มเป็นก้อนเล็ก ๆ มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หลอดอาหารยังขุ่น
- 3+ คือ เกาะกลุ่มเป็นก้อนมากขึ้น หลอดอาหารใสเพิ่มมากขึ้น
- 4+ คือ เกาะกลุ่มเป็นก้อนใหญ่ หลอดอาหารใส

3.7.5 การศึกษา Viability test โดยใช้สีย้อม methylene blue

ทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ในอาหารเหลว NGB จนได้ความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10^8 - 10^9 CFU/ml จากนั้นทำการเติมสารสกัดสารสีแดง (ละลายในน้ำกลั่น) ที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC ลงไป ในขณะที่กลุ่มควบคุมจะเติมน้ำกลั่นลงไป จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 29°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม 0.1% methylene blue ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้อง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ (Kim *et al.*, 2006b)

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมการเกิดโรคพืชบางชนิดในเรือนทดลอง

3.8.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อ *R. solanacearum* ตามวิธีการของจิตรยา จารุจิตร (2552)

เตรียมสารสกัดหยาบข้าวแดง โดยสกัดตามวิธีการข้อ 3.3 จากนั้นนำมาผสมน้ำในอัตราส่วน 1:10 (v/v) และนำมาราดโคนต้นมะเขือเทศอายุ 60 วัน ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง ก่อนการปลูกเชื้อ 1 วัน ทำการปลูกเชื้อโดยนำเชื้อ *R. solanacearum* ปริมาณ 10^8 - 10^9 CFU/ml มาปลูกเชื้อที่ต้นพืชด้วยวิธีราดที่โคนต้นมะเขือเทศ ในปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อกระถางซึ่งมีดินน้ำหนัก 1 กิโลกรัม หลังจากนั้นราดที่โคนต้นมะเขือเทศด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดงที่ผสมน้ำเรียบร้อยแล้ว ภายหลังปลูกเชื้อแล้วสัปดาห์ละ 1 ครั้ง รวมทั้งหมด 6 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) ทำการทดลอง treatment ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ต้น ดังนี้

- T1 = ปลูกเชื้อ *R. solanacearum* และราดน้ำผสมเอทานอลสัดส่วน 1:10 ครั้งละ 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง 1 วัน ก่อนปลูกเชื้อ *R. solanacearum* และหลังจากปลูกเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง รวม 6 สัปดาห์ (positive control)
- T2 = ราดสารสกัดหยาบข้าวแดงครั้งละ 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง 1 วัน ก่อนปลูกเชื้อ *R. solanacearum* และหลังจากปลูกเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง รวม 6 สัปดาห์
- T3 = ใช้น้ำผสมเอทานอลสัดส่วน 1:10 เพียงอย่างเดียว (negative control)

บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนต้นที่แสดงอาการเหี่ยวทุกสัปดาห์และตรวจสอบการเข้าทำลายและความรุนแรงของเชื้อ *R. solanacearum* ภายในต้นมะเขือเทศเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดตายและความรุนแรงของโรค ศึกษาจำนวนประชากรเชื้อโดยเก็บตัวอย่างดินทุกสัปดาห์จากบริเวณรากต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคมารับการแยกเชื้อโดยนำตัวอย่างดินน้ำหนัก 1 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นหนึ่งขวดแล้วปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 30 นาที แล้วนำมาแยกเชื้อโดยวิธี dilution plate method ตรวจนับปริมาณประชากรของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mSM-1 (ปิยรัตน์, 2541)

$$\text{การรอดตายของมะเขือเทศ (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นมะเขือเทศที่รอดตาย}}{\text{จำนวนต้นมะเขือเทศทั้งหมด}} \times 100$$

ระดับความรุนแรงของโรคเหี่ยว :	1 = พืชไม่แสดงอาการ
	2 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 1 ใบ
	3 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 2-3 ใบ
	4 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 4 ใบหรือมากกว่า
	5 = พืชตาย

3.8.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคแคงเกอร์ (canker) ของมะนาวที่มีสาเหตุจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ดัดแปลงจากวิธีการของ Leksomboon et al. (2001)

ศึกษาผลของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการยับยั้งโรคแคงเกอร์บนใบต้นมะนาวที่มีอายุ 6 เดือน โดยทำการเจาะใบของต้นมะนาวด้วยเข็มเย็บเชื้อ จากนั้นทำการหยดเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เลี้ยงในอาหาร NGB ความเข้มข้นประมาณ 10^8 - 10^9 CFU/ml ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนรอยเจาะที่ใบใบละ 4 แผล โดยใช้จำนวนต้นมะนาว 10 ต้น ต้นละ 5 ใบ รวม 200 แผล เตรียมสารสกัดหยาบข้าวแดง โดยสกัดตามวิธีการข้อ 3.3 จากนั้นนำมาผสมน้ำในอัตราส่วน 1:5 (v/v) ต่อมาทำการพ่นสารสกัดหยาบข้าวแดง ภายหลังจากการปลูกเชื้อนาน 30 นาที โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) ทำการทดลอง treatment ละ 3 ซ้ำ ๆ ดังนี้

- T1 = ปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พร้อมพ่นน้ำผสมเอทานอลสัดส่วน 1:10 เพียงอย่างเดียว (negative control)
- T2 = พ่นสารสกัดหยาบข้าวแดง ต้นละ 200 มิลลิตร ภายหลังจากการปลูกเชื้อนาน 30 นาทีและหลังจากปลูกเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง รวม 6 สัปดาห์เพียงอย่างเดียว
- T3 = หยดอาหารเปล่าที่ปราศจากเชื้อ

บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนต้นที่แสดงอาการของโรคทุกสัปดาห์และตรวจสอบการเข้าทำลายและความรุนแรงของเชื้อบนใบของต้นมะนาวเป็นเวลอย่างน้อย 4 สัปดาห์ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรค แล้วนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนแผลปลูกเชื้อที่แสดงอาการโรคแดงเกอร์} \times 100}{\text{จำนวนแผลปลูกเชื้อทั้งหมด}}$$

- ระดับความรุนแรงของแผลปลูก :
- 1 = เกิดแผลขนาดเล็กพบด้านใดด้านหนึ่ง
 - 2 = เกิดแผลสะเก็ดขนาดเล็ก
 - 3 = เกิดแผลสะเก็ดขนาดปานกลาง
 - 4 = เกิดแผลสะเก็ดขนาดใหญ่พูนูน ไม่มีวงสีเหลืองล้อมรอบ
 - 5 = เกิดแผลสะเก็ดขนาดใหญ่พูนูน และมีวงสีเหลืองล้อมรอบ

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 การผลิตสารสีจากรา *M. purpureus* TISTR 3541 บนอาหารแข็งโดยการหมักด้วยข้าวหอมมะลิ

ราโมแนสคัสหลาย ๆ สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตสารสี อาทิเช่น *M. purpureus*, *M. pilosus*, *M. ruber* และ *M. anka* (Cheng *et al.*, 2012a,b) ในการผลิตสารสีนั้นสามารถทำได้ 2 รูปแบบ คือ การหมักบนอาหารแข็ง (solid -state fermentation : SSF) เช่น ข้าว เป็นต้น ข้าวจัดเป็นอาหารแข็งที่เหมาะสมที่สุด ต่อการผลิตสารสีจากราโมแนสคัสเนื่องจากมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนสูง จึงจัดเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของรา นอกจากนี้การหมักเพื่อผลิตสารสีโดยใช้ข้าวสามารถนำมาทำให้แห้งและบดให้ละเอียด ใช้เป็นสีผสมอาหารได้โดยตรง และการหมักรูปแบบถัดมา คือ การหมักบนอาหารเหลว (liquid-state fermentation : LSF) การหมักบนอาหารเหลวนั้น จะต้องมีการสกัดสารสีออกมาก่อนจึงจะนำไปใช้ การหมักบนอาหารแข็งมีข้อดี คือ ทำได้ง่าย มีการสูญเสียผลผลิตระหว่างกระบวนการสกัดน้อย กระบวนการยับยั้งการผลิตผลิตภัณฑ์สุดท้ายน้อย ผลิตภัณฑ์ที่ได้สูญเสียสภาพน้อย เกิดของเสียที่เป็นอันตรายน้อยกว่า คุ้มค่าผลิตภัณฑ์ได้ง่าย และให้ผลผลิตสูงกว่าการหมักแบบเหลว (Joshi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002)

จากการศึกษาของเรณู ปิ่นทอง และจุลยุทธ บุญสร้างสม (2546) พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสและชนิดของข้าว มีผลต่อปริมาณสารสีแดงและสารซีทรินินซึ่งเป็นสารพิษที่ราโมแนสคัสผลิตขึ้นมา โดยพบว่ารา *M. purpureus* ATCC 16365 เป็นราที่ผลิตสารสีแดงได้มากที่สุดและให้ปริมาณสารซีทรินินค่อนข้างต่ำ ในขณะที่การใช้ข้าวหอมมะลิเป็นแหล่งอาหาร ให้ปริมาณสารสีแดงสูงที่สุดและก่อให้เกิดการผลิตสารซีทรินินต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวเจ้า พิจิตรและข้าวซ้อมมือ

สำหรับการศึกษานี้ได้เลือกใช้รา *M. purpureus* TISTR 3541 และข้าวหอมมะลิ ในการเป็นสายพันธุ์และแหล่งอาหารเพื่อผลิตสารสีแดง โดยผลการศึกษาพบว่าระยะ 2 วันแรกของการหมักเชื่อจะมีการเจริญเติบโตบนเมล็ดข้าวอย่างช้า ๆ พอเข้าสู่วันที่ 5 ของการหมัก เชื้อราจะมีการเจริญเติบโตบนเมล็ดข้าวเพิ่มมากขึ้น ข้าวมีสีแดงเพิ่มมากขึ้น จนเข้าสู่วันที่ 7 ข้าวทุกเมล็ดจะเริ่มมีสีแดงมากขึ้น และจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงการเจริญเติบโตของรา *M. purpureus* TISTR 3541 ที่หมักบนข้าวหอมมะลิ ภายใน 14 วัน

สารสีส่วนใหญ่ที่ได้จากราโมแนสคัส มีทั้งที่สามารถละลายน้ำและไม่ละลายน้ำแต่ส่วนใหญ่มักจะเป็นสารสีที่ไม่ละลายน้ำ เนื่องจากสารสีจากราโมแนสคัสมีสภาพขั้วค่อนข้างต่ำ (Qian and Wu, 2010) ดังนั้นจึงสามารถสกัดสารสีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น n-hexane, benzene, methanol, ethanol เป็นต้น การสกัดสารสีส่วนใหญ่จะใช้เอทานอลที่ความเข้มข้น

ต่าง ๆ กันในการสกัด (Babitha *et al.*, 2006, 2007; Lai *et al.*, 2011) จากนั้นทำการหาปริมาณสารสีทั้งหมดด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งแต่ละสารสีจะมีค่าความยาวคลื่นแสงที่จำเพาะแต่ละชนิดไม่เท่ากัน จึงทำให้ทราบปริมาณสารสีแต่ละชนิดได้ (Hajjaj *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2013)

Carvalho *et al.* (2007) ระบุว่าตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 95% และเมทานอลมีประสิทธิภาพดีสุดในการสกัดสารสีจากราโมแนสค์สที่ใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้ตัวทำละลายสามชนิดในการสกัดสารสีจากข้าวแดง ประกอบไปด้วย เมทานอล เอทานอลเกรดวิเคราะห์และเอทานอลเกรดการค้า ต่อมาหาปริมาณสารสีต่าง ๆ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน เพื่อหาชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สามารถสกัดสารสีแดงออกมาได้มากที่สุด

ผลการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพในการสกัดสารสีจากข้าวแดงของตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายทั้งสามมีค่าเท่ากับ 18.7 ± 0.5 , 17 ± 0.8 และ 18.5 ± 0.0 ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 การสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดสารสกัดหยาบที่ได้ จะประกอบด้วยปริมาณสารสีแดงมากที่สุด รองลงมาคือสีเหลืองและสีส้ม ตามลำดับ โดยปริมาณสารสีชนิดต่าง ๆ ที่สกัดด้วยเมทานอล มีค่าเท่ากับ 28 ± 0.0 , 21.5 ± 0.6 และ 21.2 ± 0.2 Au/g substrate ตามลำดับ สกัดด้วยเอทานอลเกรดวิเคราะห์ มีปริมาณสารสีแดง สีเหลืองและสีส้ม เท่ากับ 23.3 ± 1.01 , 19.5 ± 0.8 และ 15.6 ± 0.7 Au/g substrate ตามลำดับ และสกัดด้วยเอทานอลเกรดทางการค้า มีค่าเท่ากับ 25.4 ± 0.9 , 21.5 ± 1.7 และ 12.6 ± 6.7 Au/g substrate ตามลำดับ ดังตารางที่ 3

จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอลเกรดทางการค้าในการสกัดสารสีแดงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นถ้าหากคำนึงถึงต้นทุนในการเลือกตัวทำละลายในการนำไปใช้จริง สรุปได้ว่าสามารถใช้ตัวทำละลายเอทานอลแบบการค้าในการใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับสกัดสารสี เนื่องจากมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับตัวทำละลายบริสุทธิ์ มีความเป็นพิษน้อยและยังมีราคาถูกกว่า ทำให้สามารถประหยัดต้นทุน

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดสารสีแดงระหว่างตัวทำละลายเอทานอลเกรดวิเคราะห์ (ไม่มีน้ำเจือปน) และเอทานอลเกรดการค้า (มีน้ำประมาณ 5%) พบว่าตัวทำละลายเอทานอลเกรดการค้ามีประสิทธิภาพดีกว่าเอทานอลเกรดวิเคราะห์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Carvalho ในปี 2006 ระบุว่าสารสีแดงนั้น ละลายได้ดีในตัวทำละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้น 60-70% แสดงว่าการที่มีน้ำเจือปนจะยิ่งเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารสีแดงออกมาจากสารตั้งต้น

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละของสารสกัดหยาบข้าวแดงที่บ่มเป็นระยะเวลา 14 วันที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์	ร้อยละสารสกัดหยาบ (%yield)
เมทานอล	18.7±0.5 ^a
เอทานอล (AR grade)	17±0.8 ^a
เอทานอล (commercial grade)	18.5±0.0 ^a

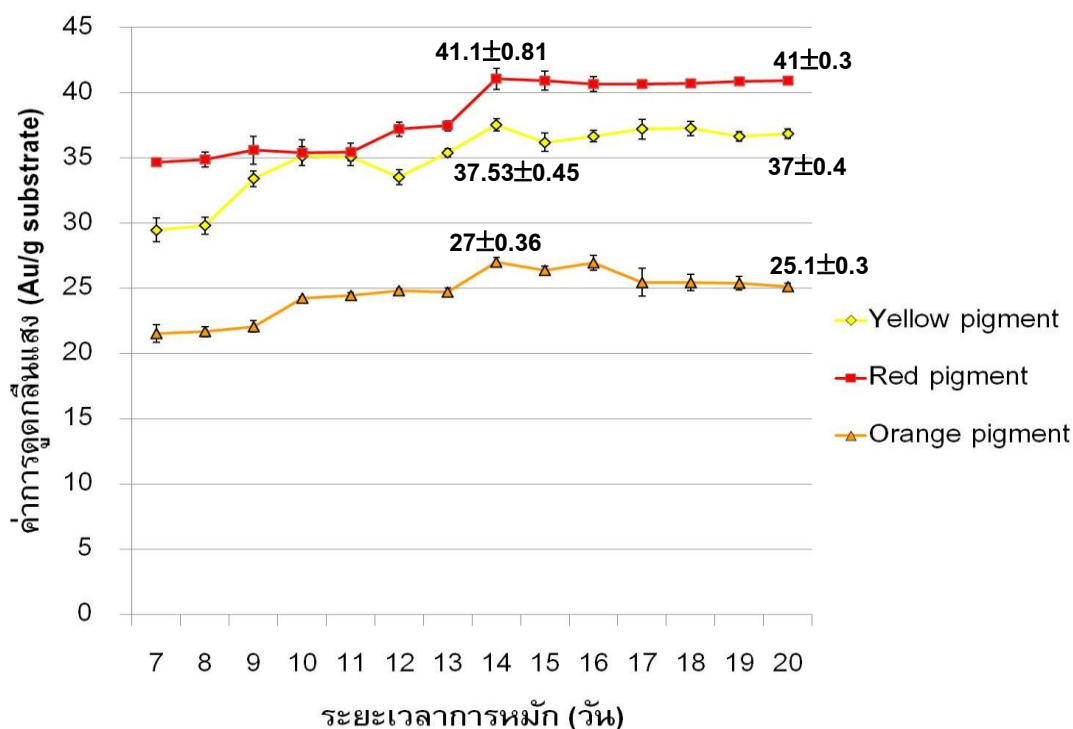
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณสารสีแต่ละชนิด ในสารสกัดหยาบข้าวแดงที่บ่มเป็นระยะเวลา 14 วัน (หน่วยเป็น AU/g substrate)

ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์	สารสีเหลือง (400 nm)	สารสีส้ม (470 nm)	สารสีแดง (500 nm)
เมทานอล	21.5±0.6 ^{cd}	21.2±0.2 ^{bcd}	28±0.0 ^e
เอทานอล (AR grade)	19.5±0.8 ^{bc}	15.6±0.7 ^{ab}	23.3±1.01 ^{cd}
เอทานอล (commercial grade)	21.5±1.7 ^c	12.6±6.7 ^a	25.4±0.9 ^{de}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ต่อมาทำการศึกษาหาระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมที่ราโมแนสค์มีการผลิตสารสีแดงลงสู่เมล็ดข้าวมากที่สุด โดยทำการศึกษาระยะเวลาการหมักข้าวตั้งแต่วันที่ 7 ถึงวันที่ 20 พบว่าปริมาณสารสีต่าง ๆ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยปริมาณสูงสุดของสารสี พบได้ในวันที่ 14 ของการหมัก โดยปริมาณสารสีแดง สีเหลืองและสีส้ม จะมีค่าเท่ากับ 41.1±0.81, 37.53±0.45 และ 27±0.36 Au/g substrate ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณสารสีสีแดงและสารสีเหลืองค่อนข้างจะคงที่ ไม่มีการผลิตเพิ่มขึ้นถึงแม้ระยะเวลาการหมักจะเพิ่มขึ้น ยกเว้นสารสีสีส้มที่มีแนวโน้มปริมาณสารสีลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 20 วัน ดังภาพที่ 8



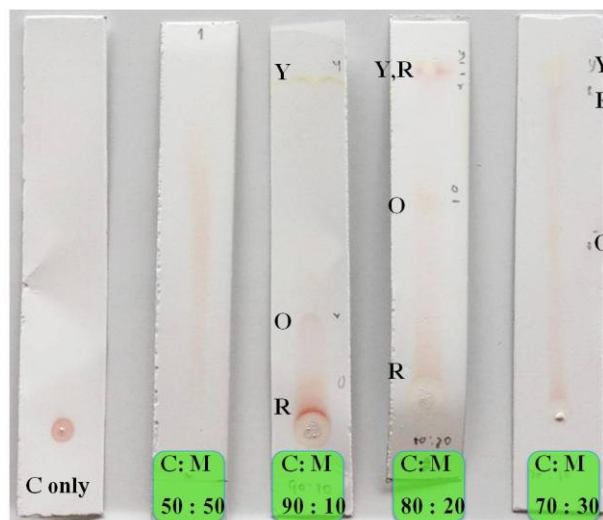
ภาพที่ 8 แสดงปริมาณสารสีแดง สีเหลือง และสีส้ม ที่ได้จากข้าวแดงช่วงระยะเวลาการหมักตั้งแต่วันที่ 7 ถึงวันที่ 20 สกัดสารสีด้วยตัวทำละลายเอทานอลเกรดทางการค้า

4.2 การทำบริสุทธิ์เพื่อแยกสารสีแดงจากสารสีชนิดอื่น ๆ

การแยกและทำบริสุทธิ์สารสีแดงจากสารสีอื่น ๆ มีหลายวิธีในการแยก อาทิเช่น column chromatography (CC), thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE) และ high speed counter-current chromatography การทำ column chromatography เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการทำบริสุทธิ์สารสีจากราโมแนสคัส จากนั้นจะนำไปทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยเทคนิค TLC และ HPLC (Kim *et al.*, 2006b; Vidyalakshmi *et al.*, 2009a)

การศึกษารังนี้ทำการแยกสารสีเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC เพื่อหาอัตราส่วนตัวชะที่เป็นสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์ (Kim *et al.*, 2006a,b) จากการศึกษพบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวชะในการแยกสารสีต่าง ๆ ออกจากกัน คือ 9:1 (v/v) (คลอโรฟอร์ม : เมทานอล) เนื่องจากมีการแยกสารสีแต่ละสีออกจากกันอย่างชัดเจน อัตราส่วนตัวทำละลายผสมดังกล่าวนี้สามารถแยกสารสีเหลืองออกมาได้เป็นลำดับแรก จากนั้นตามมาด้วยสารสีส้มและสารสีแดง ตามลำดับ เมื่อได้อัตราส่วนตัวชะที่เหมาะสมต่อมาทำการแยกสารสีแดงด้วยเทคนิค CC ต่อไป (ภาพที่ 9) เมื่อได้สารสีแดงที่แยกได้จากเทคนิค CC แล้ว ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารสีแดงที่ได้ด้วย prep-TLC ในระบบของตัวชะที่

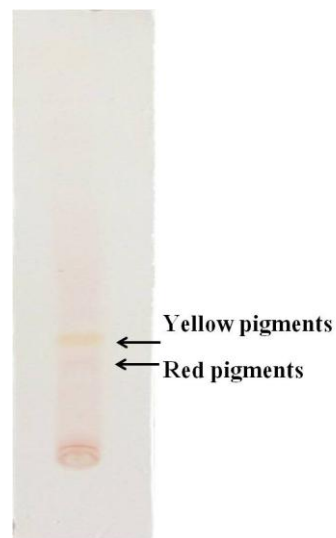
เป็นสารละลายผสมระหว่าง คลอโรฟอร์ม:เอทานอล:น้ำ ในอัตราส่วน 65:25:4 (v/v) (Kim *et al.*, 2006b; Vidyalakshmi *et al.*, 2009a) พบว่าสารสีแดงที่แยกได้นั้นยังมีสารสีเหลืองผสมอยู่ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 แสดงภาพการทำ TLC เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวชะระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอล โดยที่ Y คือ สารสีเหลือง O คือ สารสีส้ม และ R คือ สารสีแดง



(ก)



(ข)

ภาพที่ 10 แสดงการแยกสารสีจากสารสกัดหยาบขาวแดงที่ผลิตจากราโมแนสคัส ด้วยเทคนิค column chromatography (ก) และการตรวจสอบความบริสุทธิ์สารสีแดงที่ได้ด้วยเทคนิค prep-thin layer chromatography (ข)

4.3 ศักยภาพด้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาดข้าวแดงและสารสีแดงต่อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ระบุถึงสมบัติของสารสีจากราโมแนสคัส ว่ามีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลาย ๆ กลุ่มได้ โดยเฉพาะอนุพันธ์สารสีแดงที่ได้มาจากการดอมีโนตั้งต้นในกลุ่ม hydrophobic ที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน จะเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ราและยีสต์ได้ดี โดยสารสีแดงจะไปเพิ่มค่า hydrophobic ให้กับเซลล์ สาเหตุเนื่องจากสารสีที่มาจากกรดอมีโนตั้งต้นในกลุ่ม hydrophobic ถูกดูดซับไว้ที่ผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารสีที่ผลิตแบบวิธีดั้งเดิมและสารสีแดงที่มาจากอนุพันธ์ของกรดอมีโนในกลุ่ม hydrophilic ทำให้เซลล์เกาะกลุ่มกันมากขึ้น ท้ายที่สุดจำกัดการแพร่ออกซิเจนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เซลล์จึงถูกยับยั้งการเจริญเติบโตในที่สุด (Kim *et al.*, 2006b; Martínková *et al.*, 1999)

การศึกษารั้งนี้ ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาดข้าวแดงและสารสีแดงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 2 ชนิด ประกอบด้วย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์และ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยว พบว่าสารสกัดหยาดข้าวแดงสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 1.1 ± 0.12 และ 1.05 ± 0.06 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสีแดงสามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้เพียงชนิดเดียว โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 1.15 ± 0.06 เซนติเมตร ส่วนสารสีเหลืองไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ได้

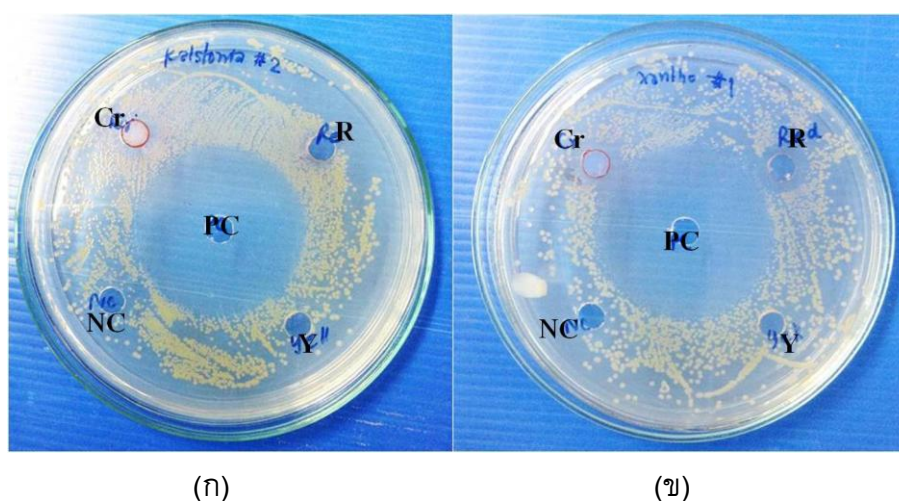
จะเห็นได้ว่าเชื้อ *R. solanacearum* ถูกยับยั้งได้เฉพาะสารสกัดหยาดข้าวแดง ในขณะที่สารสีแดงที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไม่สามารถยับยั้งเชื้อชนิดนี้ได้ นั้นแสดงว่าเชื้อชนิดนี้อาจถูกยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยสารชนิดอื่นที่ผลิตจากราโมแนสคัส จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานระบุว่าราโมแนสคัสสามารถผลิตสารพิษที่มีชื่อว่าซิตรีนิน (citrinin) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดได้ (Sroykesorn *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมว่าสารสีส้มมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้เช่นกัน แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้น้อยกว่าสารสีแดง (Martínková *et al.*, 1995) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อ *R. solanacearum* อาจจะถูกยับยั้งการเจริญโดยซิตรีนินหรือสารสีส้มที่พบในสารสกัดหยาด ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้งสองชนิดก็เป็นไปได้ ในทางตรงกันข้ามสารสีแดงที่ผ่านการทำบริสุทธิ์อาจจะไม่ปรากฏสารซิตรีนินและสารสีส้มหรือพบน้อยมากจนไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญ จึงทำให้สารสีแดงที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อชนิดนี้

ถึงแม้สารสีแดงที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค CC จะยังปรากฏสารสีเหลืองปะปนอยู่ แต่จากการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสีเหลืองไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิดเลย ดังนั้นการที่สารสีแดงสามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ จึงน่าจะมีฤทธิ์มาจากสารสีแดงเท่านั้น

ตารางที่ 4 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชของสารสกัดหยาดและสารสีแดง

แบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (cm)				
	สารสกัด หยาด (200 mg/ml)	สารสีแดง (200 mg/ml)	สารสีเหลือง (200 mg/ml)	Streptomycin (100 mg/ml)	DMSO
<i>R. solanacearum</i>	1.05±0.06	ND	ND	3.95±0.06	ND
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	1.1±0.12	1.15±0.06	ND		

ND คือ No detection



ภาพที่ 11 แสดงวงใสที่เกิดจากการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช *R. solanacearum* (ก) และ *X. axonopodis* pv. *citri* (ข) ด้วยสารสกัดหยาดข้าวแดง สารสีแดงและสารสีเหลือง โดยที่ Cr คือ สารสกัดหยาดจากข้าวแดง R คือ สารสีแดง Y คือ สารสีเหลือง PC คือ positive control และ NC คือ negative control

4.4 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

เมื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงที่มีฤทธิ์ยับยั้ง (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* และ *R. solanacearum* พบว่าสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic) เท่านั้น ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bactericidal) ต่อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชทั้งสองชนิดที่นำมาศึกษา โดยสารสกัดหยาบข้าวแดงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ดีกว่าเชื้อ *R. solanacearum* เนื่องจากค่า MIC ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* มีค่าเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ของสารสกัดหยาบข้าวแดงต่อเชื้อ *R. solanacearum* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสีแดงมีค่า MIC ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 5) แสดงว่าสารสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งได้น้อยกว่าสารสกัดหยาบข้าวแดง อาจเป็นไปได้ว่าในสารสกัดหยาบประกอบด้วยสารหลายชนิด อาทิเช่น ซิตรีนิน สารสีส้ม เป็นต้น ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานว่ามียุทธิต้านจุลินทรีย์ สารดังกล่าวอาจเสริมฤทธิ์กัน จึงทำให้ค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษาในครั้งนี้จึงมีค่าต่ำกว่าค่า MIC ของสารสีแดงเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงที่สามารถยับยั้ง (MIC) แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช	ค่า MIC (mg/ml)		
	สารสกัดหยาบ	สารสีแดง	Streptomycin
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	12.5	25	0.25
<i>R. solanacearum</i>	25	-	0.0625

หมายเหตุ - คือ สารสีแดงไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum*

4.5 การศึกษาผลของสารสีแดงต่อเซลล์แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

4.5.1 ค่า hydrophobic ความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวและการเกาะกลุ่มของเซลล์

ในการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์หรือพืช ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่มีผลต่อการยึดเกาะของแบคทีเรีย คือ ความเป็น hydrophobic ของผนังเซลล์แบคทีเรีย

จากการศึกษาผลของสารสีแดงต่อค่า hydrophobic ความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวและการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่าสารสีแดงสามารถเพิ่มสมบัติความเป็น hydrophobic ให้กับเซลล์ได้ โดยที่ระดับความเข้มข้น 1/4MIC (6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 1/2MIC (12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ความเป็น hydrophobic ของเซลล์มีค่าเท่ากับ 27.9 ± 1.1 และ 29.8 ± 1.9 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากกลุ่มควบคุมที่มีค่า hydrophobic ของเซลล์มีค่าเท่ากับ 27.3 ± 4.0 แต่ที่ระดับความเข้มข้นของสารสีแดงเท่ากับ MIC (25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ความเป็น hydrophobic ของเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า hydrophobic เท่ากับ 33.2 ± 2.8 ซึ่งผลจากการที่เซลล์แบคทีเรียมีค่าความเป็น hydrophobic เพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้น MIC จึงทำให้ความสามารถของเซลล์กลุ่มที่มีการเติมสารสีแดงที่ระดับ MIC จึงยึดเกาะกับพื้นผิวได้สูงขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของกลุ่มทดลองที่มีการเติมสารสีแดงที่ระดับ MIC มีค่าเท่ากับ 0.082 ± 0.001 ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.078 ± 0.001 ในขณะที่กลุ่มทดลองที่มีการเติมสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น 1/4MIC และ 1/2MIC ค่าการดูดกลืนแสงไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 0.079 ± 0.002 และ 0.081 ± 0.001 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) การที่สารสีแดงสามารถเพิ่มค่า hydrophobic ให้กับเซลล์ได้ อาจเนื่องมาจากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการผลิตสารสีบนอาหารแข็ง ซึ่งก็คือข้าวหอมมะลิ ซึ่งสมบัติทางเคมีของข้าวจะประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนสูง ดังนั้นการที่เชื้อราเจริญเติบโตและใช้ข้าวเป็นแหล่งอาหาร อาจจะทำให้ได้อนุพันธ์ของสารสีแดงที่มีความเป็น hydrophobic สูง จึงส่งผลทำให้ค่าความเป็น hydrophobic ของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับสารสีแดงเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย

ถึงแม้สารสีแดงที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ MIC สามารถไปเพิ่มสมบัติความเป็น hydrophobic และเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะพื้นผิวให้กับเซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* แต่จากการศึกษาผลของการเกาะกลุ่มของเซลล์หลังจากการเติมสารสีแดง พบว่าในทุกกลุ่มการทดลอง ไม่ว่าจะเป็นกลุ่มควบคุม (ไม่มีการเติมสารสี) และกลุ่มเซลล์แบคทีเรียที่มีการเติมสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เซลล์ไม่มีการเกาะกลุ่มที่จะสามารถมองเห็นได้ด้วยตา

เปล่า (ตารางที่ 5) เนื่องมาจากว่าถึงแม้สารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น MIC จะเพิ่มความเป็น hydrophobic ก็ตาม แต่ก็ไม่มากเพียงพอ (ไม่ถึง 70%) ที่จะทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่มเป็นก้อน ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ว่าการเพิ่มความเป็น hydrophobic ของสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น MIC มีผลเกี่ยวข้องกับการเกาะกลุ่มของเซลล์หรือไม่ จะทำการสังเกตลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป

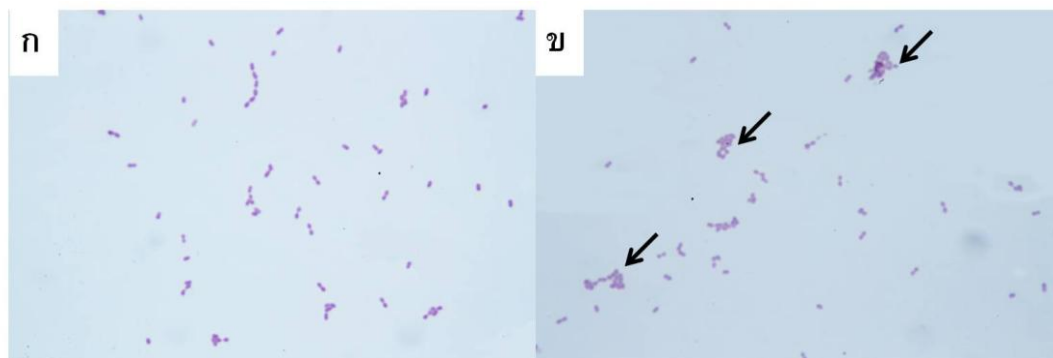
ตารางที่ 6 แสดงผลของสารสีแดงต่อเซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri*

ความเข้มข้นของ สารสีแดง (mg/ml)	Cell-surface hydrophobicity		HPBI	Cellular adherence	Cellular aggregation
	O.D ₆₀₀ เริ่มต้น	O.D ₆₀₀ สุดท้าย			
6.25	0.31±0.01	0.22±0.01	27.9±1.1 ^a	0.079±0.002 ^a	0
12.5	0.31±0.01	0.22±0.01	29.8±1.9 ^a	0.081±0.001 ^{ab}	0
25	0.30±0.01	0.19±0.05	33.2±2.8 ^b	0.082±0.001 ^b	0
Control	0.30±0.01	0.22±0.01	27.3±4.0 ^a	0.078±0.001 ^a	0

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

4.5.2 ศึกษาการจัดเรียงตัวของเซลล์และศึกษาความมีชีวิต (viability test) โดยใช้สีย้อม methylene blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงอุลตราไวโอเลต

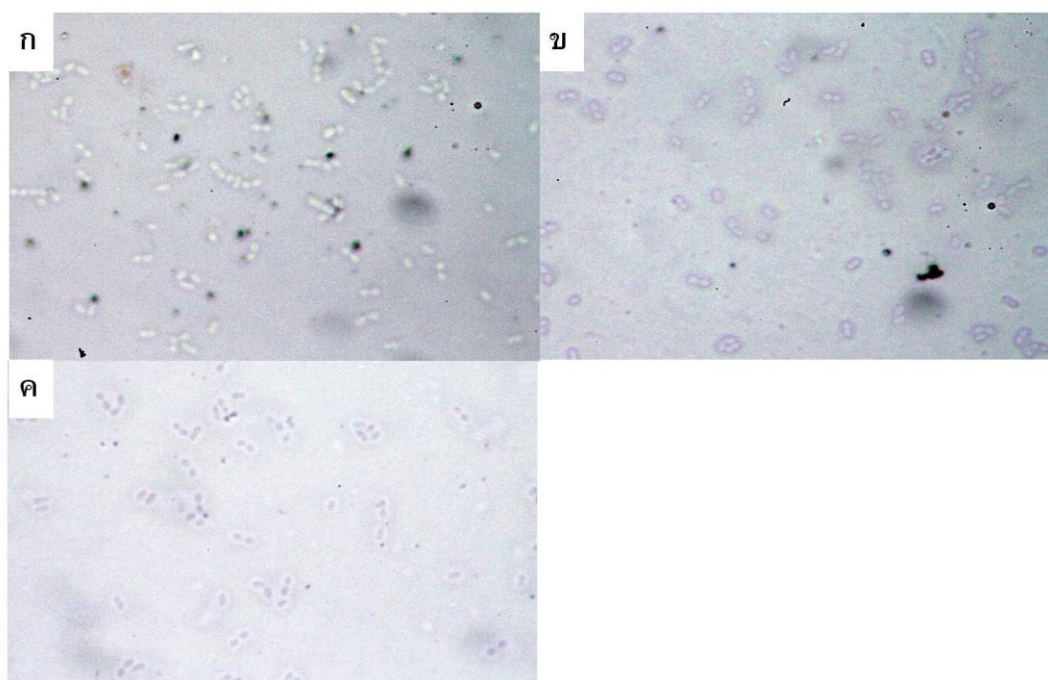
เมื่อศึกษาผลของสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น MIC ต่อการเกาะกลุ่มและความมีชีวิตของเซลล์ *X. axonopodis* pv. *citri* จากการศึกษาพบว่าสารสีแดงมีผลทำให้เซลล์มีการเกาะกลุ่มเป็นก้อนขนาดเล็กเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 12ข) ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสีแดงลงไป เซลล์จะไม่มีการเกาะกลุ่ม (ภาพที่ 12ก) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้เนื่องจากสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น MIC ไปเพิ่มค่าความเป็น hydrophobic ของเซลล์ *X. axonopodis* pv. *citri* ดังนั้นจึงมีผลทำให้เซลล์มีการเกาะกลุ่มเพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 12 แสดงการเกาะกลุ่มของเซลล์ *X. axonopodis* pv. *citri* เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ไม่มีการเติมสารสีแดง (ก) และเซลล์ที่ได้รับสารสีแดง (ข) ที่กำลังขยาย 200 เท่า

จากนั้นศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ได้รับสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น MIC เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับยาปฏิชีวนะ streptomycin และน้ำกลั่น โดยศึกษาเปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ ด้วยการย้อมด้วยสี methylene blue ผลจากการย้อมด้วยสีชนิดนี้นั้นเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะไม่สามารถย้อมติดสีชนิดนี้ได้ ในขณะที่เซลล์ที่ตายแล้วหรือไม่มีชีวิต จะสามารถย้อมติดสีชนิดนี้ได้

ผลการศึกษาค้นคว้า พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารสีแดงและเซลล์ที่มีการเติมน้ำกลั่นลงไป เซลล์จะไม่ติดสีย้อม methylene blue (ภาพที่ 13ก และ 13ข) จึงทำให้มองเห็นเซลล์มีลักษณะใส ๆ นั้นแสดงว่าเซลล์ทั้งสองกลุ่มการทดลองยังคงมีชีวิตอยู่ ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับยาปฏิชีวนะ streptomycin จะติดสีย้อม methylene blue แสดงว่าเซลล์ที่ได้รับยาปฏิชีวนะ คือ เซลล์ที่ตายแล้ว (ภาพที่ 13ค) เนื่องจากยาคีชนิดนี้มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ สอดคล้องกับผลการทดลองในหัวข้อ 4.4 พบว่าสารสีแดงนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตแต่ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ดังนั้นเซลล์ที่ได้รับสารสีแดงจึงไม่ติดสีย้อม methylene blue เนื่องจากยังคงมีชีวิตนั่นเอง



ภาพที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยการย้อมด้วยสี methylene blue ระหว่างเซลล์ที่การเติมน้ำกลั่น (ก) เติมสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น MIC (25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ข) และเซลล์ที่ได้รับสารยาปฏิชีวนะ streptomycin ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ค) ที่กำลังขยาย 400 เท่า

จากผลการทดลองทั้งหมดดังกล่าว พอจะกล่าวถึงกลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้ว่า สารสีแดงที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ MIC (25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จะไปเพิ่มค่า hydrophobic ของเซลล์ *X. axonopodis* pv. *citri* ส่งผลทำให้เซลล์แบคทีเรียมีการเกาะกลุ่มเข้าด้วยกันมากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Kim *et al.* (2006b) พบว่าสารสีแดงมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ โดยใช้เซลล์ *E. coli* เป็นกลุ่มศึกษา พบว่าสารสีแดงนั้นจะไปห่อหุ้มเซลล์ ทำให้เพิ่มค่า hydrophobic ของเซลล์ ทำให้เซลล์แบคทีเรียมีการเกาะกลุ่มเข้าด้วยกัน ซึ่งผลจากการที่เซลล์แบคทีเรียเกาะกลุ่มกันนี้เอง ทำให้การขนส่งของออกซิเจนเข้าสู่ตัวเซลล์ลดลง ทำให้เซลล์ถูกยับยั้งการเจริญในที่สุด

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมการเกิดโรคพืชบางชนิดในเรือนทดลอง

4.6.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อ *R. solanacearum*

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคเหี่ยวของต้นมะเขือเทศที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *R. solanacearum* ในเรือนทดลอง เป็นระยะเวลานาน 6 สัปดาห์ พบว่า สารสกัดหยาบข้าวแดงสามารถยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวในต้นมะเขือเทศได้ โดยเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศที่ราดด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดง (T2) มีค่าเท่ากับ 33.3 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ที่ราดด้วยตัวทำละลาย (T1) โดยเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศ มีค่าเท่ากับ 13.3 ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อลงไปและมีการราดเฉพาะตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว (T3) ไม่แสดงอาการเหี่ยวหรือแสดงอาการของโรค มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศ เท่ากับ 100 ส่วนระดับความรุนแรงของโรค พบว่าในช่วงระยะเวลา 3 สัปดาห์แรก ต้นมะเขือเทศที่ราดสารสกัดหยาบข้าวแดงสามารถลดระดับความรุนแรงของโรคได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่หลังจากนั้นระยะสัปดาห์ที่ 4-6 ความรุนแรงของโรค กลุ่มที่ราดด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดงและกลุ่มควบคุมที่ราดตัวทำละลายไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยความรุนแรงของโรคที่ 6 สัปดาห์ มีค่าเท่ากับ 4.7 และ 4.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบข้าวแดง มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่านั้น แต่ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *R. solanacearum* จึงยังคงมีชีวิตอยู่ ดังนั้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป 6 สัปดาห์ อาจจะมีความเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ของสารสกัดหยาบข้าวแดงน้อยลงหรือหมดไป และ/หรือประกอบกับเชื้อมีการปรับตัวต่อสารสกัดหยาบข้าวแดงได้ ดังนั้นเชื้อจึงมีการเจริญเติบโตอีกครั้ง ส่งผลทำให้ความรุนแรงของโรคกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบข้าวแดงกับกลุ่มที่ราดด้วยตัวทำละลาย มีระดับความรุนแรงที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* จากดินบริเวณรากของต้นมะเขือเทศ พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มีการปลูกลงดิน มีค่าเท่ากับ 8.1 Log CFU/ml ปริมาตร 100 มิลลิลิตร/ดิน 1 กิโลกรัม (คิดเป็น 7.1 Log CFU/g) เมื่อนำดินบริเวณรากของต้นมะเขือเทศมาทำการนับจำนวนด้วยวิธี dilution plate method บนอาหาร mSM-1 พบว่า หลังการปลูกเชื้อลงในดินปลูกมะเขือเทศ 1 สัปดาห์ ปริมาณเชื้อในแต่ละกลุ่มมีปริมาณเชื้อลดลงที่ต่างกัน โดยกลุ่มควบคุม (T1) ที่มีการปลูกเชื้อและราดด้วยตัวทำละลาย มีปริมาณเชื้อลดลงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการปลูกเชื้อและราดด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดง (T2) โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 4.19 และ 3.52 Log CFU/g ตามลำดับ จากนั้นช่วงสัปดาห์ที่ 2-3 ปริมาณเชื้อยังคงลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยที่กลุ่ม T2 สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้แตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม T1 โดยปริมาณเชื้อในกลุ่ม T2 มีค่าเท่ากับ 2.95 และ 2.91 Log CFU/g ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม T1 มีปริมาณเชื้อ เท่ากับ 3.76 และ 3.22 Log CFU/g ตามลำดับ ต่อมาช่วงสัปดาห์ที่ 4-5 ปริมาณเชื้อทั้งสองกลุ่มทดลองยังคงมีแนวโน้มลดลง โดยปริมาณเชื้อทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปริมาณเชื้อของกลุ่ม T2 มีค่าเท่ากับ 2.38 และ 1.98 Log CFU/g ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม T1 มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 2.26 และ 2.13 Log CFU/g ตามลำดับ สัปดาห์ที่ 6 พบว่าปริมาณเชื้อของกลุ่ม T2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม T1 โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.29 และ 1.64 Log CFU/g ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อ *R. solanacearum* ในเรือนทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรค						การรอดตาย (%)
	สัปดาห์						
	1	2	3	4	5	6	
T1	1 ^a	1.3 ^b	2.3 ^c	3.1 ^c	3.5 ^b	4.9 ^b	13.3 ^b
T2	1 ^a	1 ^a	1.3 ^b	2.6 ^b	3.3 ^b	4.7 ^b	33.3 ^c
T3	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	100 ^a

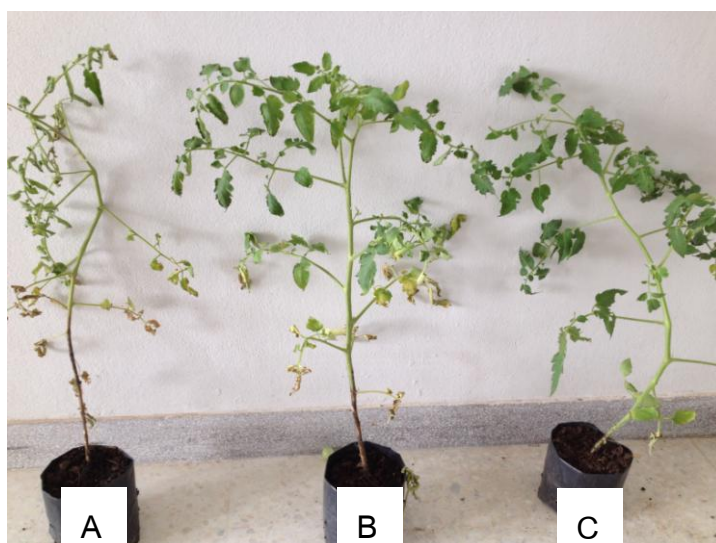
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการยับยั้งปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* (log CFU/g ของดิน) ในเรือนทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

กรรมวิธี	ปริมาณเชื้อ <i>R. solanacearum</i> (log CFU/g ของดิน)					
	สัปดาห์ 1	สัปดาห์ 2	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 4	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6
T1	4.19 ^b	3.76 ^c	3.22 ^c	2.26 ^b	2.13 ^b	1.64 ^b
T2	3.52 ^b	2.95 ^b	2.91 ^b	2.38 ^c	1.98 ^b	1.29 ^c
T3	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ปลูกเชื้อลงดินโดยใส่เชื้อความเข้มข้น 8.1 Log CFU/ml ปริมาณ 100 มิลลิลิตร/ดิน 1 กิโลกรัม (คิดเป็น 7.1 Log CFU/g)



ภาพที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบความรุนแรงและการรอดตายของต้นมะเขือเทศที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ โดยที่ A คือ กลุ่มควบคุมที่มีการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* ร่วมกับการราดตัวทำละลายน้ำผสมเอทานอล สัดส่วน 1:10 B คือ กลุ่มทดลองที่มีการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* ร่วมกับการราดสารสกัดหยาบข้าวแดง ในขณะที่ C คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อและราดด้วยตัวทำละลายน้ำผสมเอทานอล สัดส่วน 1:10 เพียงอย่างเดียว

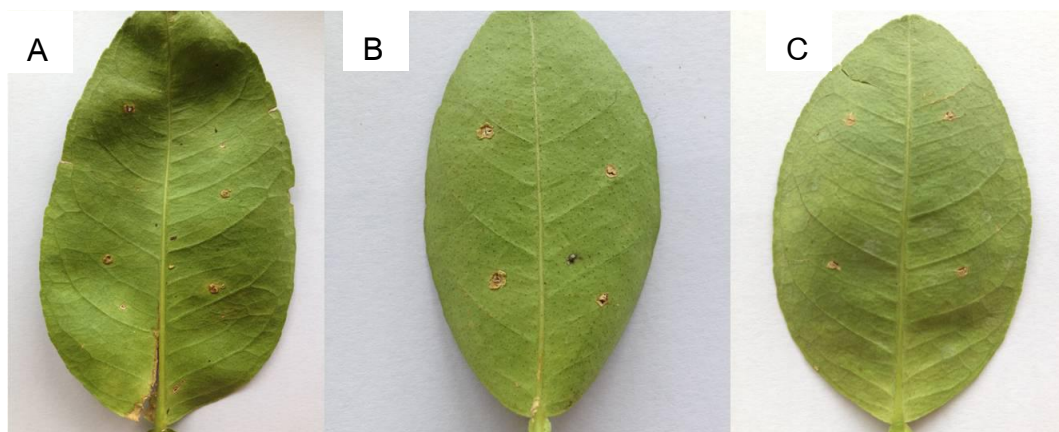
4.6.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคแคงเกอร์ (canker) ของใบมะนาวที่มีสาเหตุจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคแคงเกอร์บนใบของต้นมะนาว เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ พบว่าสารสกัดหยาบข้าวแดงมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของต้นมะนาวกลุ่มที่มีการฉีดพ่นด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดง (T2) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการฉีดพ่นด้วยตัวทำละลายน้ำผสมเอทานอล (T1) โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมีย่ำแย่เท่ากับ 89.7 และ 95 ตามลำดับ แต่เมื่อศึกษาระดับความรุนแรงของโรค พบว่า ระดับความรุนแรงของโรคในกลุ่มทดลอง T1 และ T2 มีระดับความรุนแรงเพิ่มสูงขึ้น เมื่อระยะเวลาผ่านไป และความรุนแรงของโรคทั้งสองกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั้นแสดงว่าสารสกัดหยาบข้าวแดงไม่สามารถลดระดับความรุนแรงของโรคแคงเกอร์ได้ โดยระดับความรุนแรงของโรคที่ระยะเวลาสัปดาห์ที่ 2-4 ของกลุ่มทดลองที่มีการฉีดพ่นด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดงมีค่าเท่ากับ 0.8, 1.7 และ 2.53 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่มีการฉีดพ่นด้วยตัวทำละลายเพียงอย่างเดียวมีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 0.7, 1.6 และ 2.53 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาวที่มีสาเหตุจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในเรือนทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

กรรมวิธี	ความรุนแรงของแผลปลูก			เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	
T1	0.7 ^b	1.6 ^b	2.53 ^b	95 ^c
T2	0.8 ^b	1.7 ^b	2.53 ^b	89.7 ^b
T3	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan's new multiple range test



ภาพที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดโรคแคงเกอร์ของใบต้นมะนาวที่มีการปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยที่ A คือกลุ่มควบคุมที่มีการฉีดพ่นด้วยตัวทำละลายน้ำผสมเอทานอล สัดส่วน 1:10 B คือ กลุ่มทดลองที่มีการฉีดพ่นด้วยสารสกัดหยาดข้าวแดง ในขณะที่ C คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อ แต่ใช้อาหารเพียงอย่างเดียวในการปลูกเชื้อที่แผลของใบต้นมะนาว

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงจากข้าวแดงที่ผลิตโดยเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3541 ในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ 2 ชนิด ประกอบด้วย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์และ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยว โดยทำการผลิตสารสืบนอาหารแข็ง คือ ข้าวหอมมะลิ จากผลการศึกษาพบว่าระยะเวลาการหมักที่ 14 วันเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีการผลิตสารสีชนิดต่าง ๆ ได้ในปริมาณมากที่สุด โดยมีปริมาณสารสีแดง สีเหลืองและสีส้ม มีค่าเท่ากับ 41.1 ± 0.81 , 37.53 ± 0.45 และ 27 ± 0.36 (หน่วย Au/g substrate) ตามลำดับ

จากนั้นทำการสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอลเกรดวิเคราะห์และเอทานอลเกรดทางการค้า พบว่าประสิทธิภาพในการสกัดสารสีจากข้าวแดงของตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความใกล้เคียงกันโดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 18.7 ± 0.5 , 17 ± 0.8 และ 18.5 ± 0.0 ตามลำดับ โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดสารสกัดหยาบที่ได้ จะประกอบด้วยปริมาณสารสีแดงมากที่สุด รองลงมาคือสีเหลืองและสีส้ม ตามลำดับ โดยปริมาณสารสีชนิดต่าง ๆ ที่สกัดด้วยเมทานอล มีค่าเท่ากับ 28 ± 0.0 , 21.5 ± 0.6 และ 21.2 ± 0.2 ตามลำดับ สกัดด้วยเอทานอลเกรดวิเคราะห์ มีค่าเท่ากับ 23.3 ± 1.01 , 19.5 ± 0.8 และ 15.6 ± 0.7 ตามลำดับ และสกัดด้วยเอทานอลเกรดทางการค้า มีค่าเท่ากับ 25.4 ± 0.9 , 21.5 ± 1.7 และ 12.6 ± 6.7 ตามลำดับ ดังนั้นถ้าหากคำนึงถึงต้นทุนในการเลือกตัวทำละลายในการนำไปใช้งานจริง สรุปได้ว่าสามารถใช้ตัวทำละลายเอทานอลแบบการค้าในการใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับสกัดสารสี เนื่องจากมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับตัวทำละลายบริสุทธิ์ มีความเป็นพิษน้อย และยังมีราคาถูกกว่า ทำให้สามารถประหยัดต้นทุน

การทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบ เพื่อแยกสารสีแดงให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น ด้วยเทคนิค prep-thin layer chromatography และ column chromatography พบว่าอัตราส่วนตัวชะระหว่างคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลที่เหมาะสมในการแยกสารสีแต่ละชนิดออกจากกัน คือ 9:1 (v/v)

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดง สารสีแดงและสารสีเหลืองด้วยเทคนิค agar well-diffusion assay พบว่าสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* และ *R. solanacearum* โดยสารสกัดหยาบข้าวแดงสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 1.1 ± 0.12 และ 1.05 ± 0.06 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสีแดงยับยั้งเชื้อ

X. axonopodis pv. *citri* ได้เพียงชนิดเดียว โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 1.15 ± 0.06 เซนติเมตร ส่วนสารสีเหลืองไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิดได้

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงที่มีฤทธิ์ยับยั้ง (MIC) และฆ่าเชื้อ (MBC) แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* และ *R. solanacearum* พบว่าสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic) เท่านั้น ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bactericidal) แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชทั้งสองชนิดที่นำมาศึกษา โดยสารสกัดหยาบข้าวแดงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ดีกว่าเชื้อ *R. solanacearum* เนื่องจากค่า MIC ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* มีค่าเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ของสารสกัดหยาบข้าวแดงต่อเชื้อ *R. solanacearum* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสีแดงมีค่า MIC ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าสารสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งได้น้อยกว่าสารสกัดหยาบข้าวแดง

การศึกษาผลของสารสีแดงต่อค่า hydrophobic ความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวและการเกาะกลุ่มของเซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่าสารสีแดงที่ระดับความเข้มข้น MIC (25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถเพิ่มสมบัติความเป็น hydrophobic ให้กับเซลล์แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่งผลทำให้เซลล์แบคทีเรียสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวได้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

การศึกษาผลของสารสีแดงต่อการเกาะกลุ่มภายใต้กล้องจุลทรรศน์และควมมีชีวิตของเซลล์ *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยการย้อมด้วยสี methylene blue พบว่าเมื่อสังเกตลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สารสีแดงมีผลทำให้เซลล์มีการเกาะกลุ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสารสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแต่ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ เนื่องจากเมื่อย้อมด้วยสี methylene blue เซลล์แบคทีเรียย้อมไม่ติดสี แสดงว่าเซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่

ศึกษาผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อ *R. solanacearum* พบว่า สารสกัดหยาบข้าวแดงสามารถยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวในต้นมะเขือเทศได้ โดยเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศที่ราดด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดง มีค่าเท่ากับ 33.3 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุมที่ราดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลกับน้ำ (สัดส่วน (1:10) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นมะเขือเทศ มีค่าเท่ากับ 13.3 ส่วนระดับความรุนแรงของโรค พบว่าในช่วงระยะเวลา 3 สัปดาห์แรก ต้นมะเขือเทศที่ราดสารสกัดหยาบข้าวแดงสามารถลดระดับความรุนแรงของโรคได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่หลังจากนั้นระยะสัปดาห์ที่ 4-6 ความรุนแรงของโรค กลุ่มที่ราดด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดงและกลุ่มควบคุมที่ราดด้วยตัวทำละลายไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยความรุนแรงของโรคที่ 6 สัปดาห์ มีค่าเท่ากับ 4.7 และ 4.9 ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดหยาบข้าว

แดงน้อยลงหรือหมดไป และ/หรือประกอบกับเชื้อยังคงมีชีวิตและสามารถปรับตัวเพื่อทนทานต่อสารสกัดหยาบข้าวแดงได้

การศึกษาปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* จากดินบริเวณรากของต้นมะเขือเทศ พบว่าสารสกัดหยาบข้าวแดงสามารถลดปริมาณเชื้อได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสัปดาห์ที่ 6 พบว่าปริมาณเชื้อของกลุ่มทดลองที่มีการปลูกเชื้อ ร่วมกับรากสารสกัดหยาบข้าวแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการปลูกเชื้อร่วมกับรากตัวทำลายผสมระหว่างเอทานอลกับน้ำเพียงอย่างเดียว โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.29 และ 1.64 Log CFU/g ตามลำดับ

ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคแคงเกอร์บนใบของต้นมะนาวเป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์ พบว่าสารสกัดหยาบข้าวแดงมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของต้นมะนาวกลุ่มที่มีการฉีดพ่นด้วยสารสกัดหยาบข้าวแดงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการฉีดพ่นด้วยตัวทำลายน้ำผสมเอทานอล โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมีค่าเท่ากับ 89.7 และ 95 ตามลำดับ แต่เมื่อศึกษาระดับความรุนแรงของโรค พบว่าสารสกัดหยาบข้าวแดงไม่สามารถลดระดับความรุนแรงของโรคได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 สายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัสที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่ใช่สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณการผลิตสารสีมากที่สุด ดังนั้นการเลือกสายพันธุ์ที่จะนำมาใช้ในการผลิตสารสี ควรจะเป็นสายพันธุ์ที่ดีให้ปริมาณการผลิตสารสีมากที่สุด

5.2.2 ควรจะมีการพัฒนาวิธีการสกัด เช่น วิธีการสกัด ระยะเวลา อุณหภูมิที่ใช้ ความเร็วรอบในการเขย่า รวมถึงศึกษาอัตราส่วนตัวทำลายผสมที่เหมาะสมต่อการสกัด อาทิ เช่น ตัวทำลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

5.2.3 ควรทำ scanning wavelength ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อหาค่า λ_{max}

5.2.4 การทำบริสุทธิ์สารสีแดงไม่ควรจะมีสารอื่น ๆ เจือปน

5.2.5 ในการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบข้าวแดงและสารสีแดงที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) พบว่าสารสกัดหยาบมีค่า MIC ต่ำกว่าสารสีแดงที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ดังนั้นควรจะมีการศึกษาฤทธิ์ของสารชนิดอื่นที่มีรายงานว่ามีความสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรีย อาทิเช่น สารสีส้ม และสารซิติรีนิน เป็นต้น เพื่อเป็นสนับสนุนข้อมูลที่ได้

เอกสารอ้างอิง

- จิตรยา จารุจิตร. การควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศโดยไซสาร์สจากพืชและธาตุซิลิกอนใน
เรือนทดลอง [ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)]. กรุงเทพฯ :
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ; 2552.
- ธรรมบุญ อ่อนแก้ว. (2553). การวินิจฉัยโรคพืช. แหล่งที่มา : http://www.sdoae.doe.go.th/News/g_Product/2553/4.pdf, 10 กันยายน 2556.
- ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. โรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.)
และการป้องกันกำจัด [ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)]. กรุงเทพฯ :
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ; 2541.
- เรณู ปิ่นทอง และจุลยุทธ บุญสร้างสม. (2546). ผลของสายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส และชนิดของ
ข้าวต่อปริมาณซีตรินินในข้าวแดง. ว. วิทย. กษ. 34 : 4-6 (พิเศษ) : 168-171.
- Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, Kiyota A, Yasukawa K, Sakamoto N, Kimura Y, Suzuki
T, Takayasu J, Nishino H. (2005a). Anti-tumor-initiating effects of monascin, an
azaphilone pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice (red-
mold rice). Chem. Biodivers. 2 : 1305–1309.
- Babitha S, Soccol C, Pandey A. (2006). Jackfruit seed-a novel substrate for the
production of *Monascus* pigments through solid-state fermentation. Food
Technol. Biotechnol. 44 : 465–471.
- Babitha S, Soccol C, Pandey A. (2007). Solid-state fermentation for the production of
Monascus pigments from jackfruit seed. Bioresour. Technol. 98 : 1554 –1560.
- Bell G. (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells. Sci. 200 : 618-627.
- Binns A, Thomashow M. (1988). Cell biology of *Agrobacterium* infection and
transformation of plants. Annu. Rev. Microbiol. 42 : 575-606.
- Bradley D. (1972). Shortening of the *Pseudomonas aeruginosa* pili after RNA-phage
adsorption. J. Gen. Microbiol. 72 : 303-19.
- Brunings A, Gabriel D. (2003). *Xanthomonas citri* : breaking de surface. Mol. Plant
Pathol. 4 : 141-157.
- Cangelosi G, Hung L, Puvanesarajah V, Stacey G, Ozga D. (1987). Common loci for
Agrobacterium tumefaciens and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis
and their roles in plant interactions. J. Bacterial. 169 : 2086-91.

- Carvalho J, Bruno O, Adenise L, Ashok P, Babitha S, Carlos R. (2007). Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-state fermentation and pigment extraction using different solvents. *Indian J. Biotech.* nol. 6 : 194-199.
- Carvalho J, Pandey A, Oishi B, Brand D, Rodriguez-Leon J, Soccol C. (2006). Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation *Biochemical Engineering Journal.* 29 : 262-269.
- Cheng M, Wu M, Su Y, Yuan G, Chen Y, Chen I. (2012a). Secondary metabolites from the fungus *Monascus kaoliang* and inhibition of nitric oxide production in lipo polysaccharide-activated macrophages. *Phytochem. Lett.* 5 : 262–266.
- Cheng M, Wu M, Yuan G, Su Y, Yanai H. (2012b). Secondary metabolites produced by the fungus *Monascus pilosus* and their anti-inflammatory activity. *Phytochem. Lett.* 5 : 567 – 571.
- Chen M, Johns M. (1994). Effect of carbon source on ethanol and pigment production by *Monascus purpureus*. *Enzyme Microb. Technol.* 16 : 584–59.
- Cuppels D, Vidaver A, van Etten J. (1979). Resistance to bacteriophage by *Pseudomonas phaseolicola*. *J. Gen. Virol.* 44 : 493-504.
- Daniels M, Dow J, Osbourn A. (1988). Molecular genetics of pathogenicity in phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26 : 285-312.
- Deasey M, Matthysse A. (1984). Interactions of wild-type and cellulose-minus mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco mesophyll and tobacco tissue culture cells. *Phytopathol.* 74 : 991-94.
- Denny T. (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: *Plant-Associated Bacteria* (Gnanamanickam, S.S., ed.), pp. 573–644. Dordrecht: Springer Publishing.
- Dixon R, Lamb C. (1990). Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41 : 339-67.
- Douglas C, Staneloni R, Rubin R, Nester E. (1985). Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.* 161 : 850-60.
- Elphinstone J. (2005). The current bacterial wilt situation: a global overview. In : *Bacterial Wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex* (Allen, C., Prior, P. and Hayward, A.C., eds), pp. 9–28. St Paul, MN: APS Press.

- Genin S. (2010). Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol.* 187 : 920–928.
- Gottig N, Garavaglia B, Garofalo C, Zimaro T, Sgro G, Ficarra F, Dunger G, Daurelio L, Thomas L, Gehring C, Orellano E, Ottado J. (2010). Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. *Current Res., Technol. Educ. Topics Appl. Microbiol. Microbial Biotechnol.* 196-204.
- Graham J, Gottwald T, Cubero J, Achor D. (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* : factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathol.* 5 : 1-15.
- Haahtela K, Laakso T, Korhonen T. (1986). Associative nitrogen fixation by *Klebsiella* spp. : adhesion sites and inoculation effects on grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 : 1074-79.
- Haahtela K, Tarkka E, Korhonen T. (1985). Type-I fimbriae-mediated adhesion of enteric bacteria to grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 : 1182-85.
- Hajjaj H, Blanc P, Groussac E, Uribe Larrea J, Goma G, Loubiere P. (2000a). Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme Microb. Technol.* 27 : 619–625.
- Hajjaj H, François JM, Goma G, Blanc P. (2012). Effect of amino acids on red pigments and citrinin production in *Monascus ruber*. *J. Food Sci.* 77 : 156 – 159.
- Hajjaj H, Klaébé A, Goma G, Blanc P, Barbier E, Franceois J. (2000b). Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 1120–1125.
- Hajjaj H, Klaébé A, Loret M, Goma G, Blanc P and Francosis J. (1999). Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 311-314.
- Hu Z, Zhang X, Wu Z, Qi H, Wang Z. (2012). Perstraction of intracellular pigments by submerged cultivation of *Monascus* in nonionic surfactant micelle aqueous solution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94 : 81–89.
- Jann K, Jann B. (1990). Bacterial adhesins. *Curro Topics Microbiol. Immunol.* 151. Berlin/Heidelberg : Springer Verlag. 209 pp.

- Jasalavich C. (1987). Attachment of the epiphytic bacteria *Pseudomonas syringae* pathovar *achrymans* and pathovar *glycinea* to host and nonhost leaf surfaces. PhD thesis. Univ. Wisconsin-Madison. 247 pp.
- Joshi V, Attri D, Bala A, Bhushan S. (2003). Microbial pigments. Indian J. Biotechnol. 2 : 362–369.
- Jozlová P, Martínková L, Lozinski J, Machek F. (1994). Ethanol as substrate for pigment production by the fungus *Monascus purpureus*. Enz. Microb. Technol. 16 : 996-1001.
- Kim C, Jung H, Kim J, Shin C. (2006a). Effect of *Monascus* pigment derivatives on the electrophoretic mobility of bacteria, and the cell adsorption and antibacterial activities of pigments. Colloid. Surf. B. 47 : 153–159.
- Kim C, Jung H, Kim Y, Shin C. (2006b). Antimicrobial activities of amino acid derivatives of *Monascus* pigments. FEMS Microbiol. Lett. 264 : 117–124.
- Korhonen T, Haahte K, Romantscuk M, Bamford D. (1986). Role of fimbriae and pili in the attachment of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas* to plant surfaces. In Recognition in Microbe-plant Symbiotic and Pathogenic Interactions, ed. B. Lugtenberg, pp. 229-41 . Berlin/Heidelberg : Springer Verlag. 449 pp.
- Korhonen T, Kalkkinen N, Haahtela K, Old D. (1987). Characterization of type I and mannose-resistant fimbriae of *Erwinia* spp. J. Bacteriol. 69 : 2281-83.
- Lai Y, Wang L, Qing L, Chen F. (2011). Effects of cyclic AMP on development and secondary metabolites of *Monascus ruber* M-7. Lett. Appl. Microbiol. 52 : 420–426.
- Lee B, Piao H, Chung W. (2002). Production of red pigments by *Monascus purpureus* in solid-state culture. Biotechnol. Bioprocess Eng. 7 : 21–25.
- Leksomboon C, Thaveechai, Kositratana W. (2001). Potential of Plant Extracts for Controlling Citrus Canker of Lime. Kasetsart J. (Nat. Sci.). 35 : 392-396.
- Lin T, Demain A. (1991). Effect of nutrition of *Monascus* spp. on formation of red pigments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 70-75.
- Lin Y, Wang T, Lee M, Su N. (2008). Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice : a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77(5) : 965-973.
- Lippincott J, Lippincott B. (1984). Concepts and experimental approaches in host-microbe recognition. In Plant-Microbe Interactions, Molecular and Genetic

- Perspectives, ed. T. Kosuge, E. W. Nester, 1 : 195-214. NewYork : Macmillan. 443 pp.
- Liu F, Tachibana S, Taira T, Ishihara M, Yasuda M. (2004). Purification and characterization of a new type of serine carboxypeptidase from *Monascus purpureus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31(1) : 23-28.
- López J, Perez J, Sevilla J, Fernández F, Grima E, Chisti Y. (2003). Production of lovastatin by *Aspergillus terreus* : effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. Enzyme and MicroTech. 33 : 270-277.
- Louhelainen J, Haahtela K, Lin D, Nurmiaho-Lassila E, Korhonen T. (1990). Adhesion of *Erwinia rhapontici* to plant surfaces. Abstr. Int. Symp. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact. 5th. Interlaken, Switzerland.
- Manchand P, Whalley W. (1973). Isolation and structure of ankaflavin : a new pigment from *Monascus anka*. Phytochem. 12 : 2531-2532.
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyaanm M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer S, Machado M, Toch I, Salmond G, Foster G. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Mol. plant pathol. 1-14.
- Martínková L, Ju Z, Veselý D. (1995). Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. J. Appl. Micro-biol. 79 : 609-616.
- Martínková L, Patáková Ju Z, Krent V, Kucerová Z, Havlíček V, Olšovský P, Hovorka O, Ríhová B, Veselý D, Veselá D, Ulrichová J, Prikrylová V. (1999). Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. Food Addit. Contam. 16 : 15-24.
- Martin M, Pfaller M, Massanari R, Wenzel R. (1989). Use of cellular hydrophobicity, slime production and species identification markers for the clinical significance of coagulase negative staphylococcal isolates. Am. J. Infect Control. 17 : 130-135.
- Mills D, Mukhopadhyay P, Zhao Y, Romantschuk, M. (1991). Organization and function of pathogenicity genes of *Pseudomonas syringae* pathovars *phasolicola* and *syringae*. In Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants, ed. S. S. Patil, S. Ouchi, D. Mills, C. Vance. pp. 69-81. New York: Springer-Verlag. 268 pp.
- Mukherjee G, Singh S. (2011). Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. Process Biochem. 46 : 188-192.

- Murchison H, Larrimore S, Curtiss R. (1981). Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* defective in adherence and aggregation. Infect. Immun. 34 : 1044–1055.
- Novotny C, Fives T. (1974). Retraction of F-pili. J. Bacteriol. 117 : 1306-11.
- Nurmiaho-Lassila E, Rantala E, Romantschuk M. (1991). Pilus-mediated adsorption of *Pseudomonas syringae* to the surface of bean leaves. Micron. Microsc. Acta. 22 : 71-72.
- Ottow J. (1975). Ecology, physiology and genetics of fimbriae and pili. Annu. Rev. Microbiol. 29 : 79-108.
- Palo M, Vidal A, Maceda L. (1960). Study on angkak and its production. Philipp. J. Sci. Soc. 89: 1-22.
- Pattanagul P. (2002). Using of vegetable oil, angkak, soy protein isolate and tapioca starch to improve the quality of sausages, Master's thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhol A, Leksawasdi N. (2007). Review of angkak production (*Monascus purpureus*). Chiang Mai J. Sci. 34 : 319–328.
- Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhol A, Tharatha S.(2008). Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. Int. J. Food Microbiol. 126 : 20-23.
- Pichyangkura S. (1979). Effects of nutrition on amylase production by *Monascus purpureus*, J. Sci. Soc. Thailand. 5 : 175-184.
- Polek M, Vidalakis G and Godfrey K. (n.d.). Citrus bacterial canker disease and Huanglongbing (citrus greening). Retrieved August 20, 2014 from website : <http://anrcatalog.ucdavis.edu/>.
- Qian J, Wu Q. (2010). Improving water solubility of *Monascus* pigment. J. Chin. Cereal Oil Assoc. 25 : 77–79/92.
- Romantschuk M, Bamford D. (1986). The causal agent of halo blight in bean, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, attaches to stomata via its pili. Microb. Pathog. 1 : 139-148.
- Romantschuk M, Nurmiaho-Lassila E, Rantala E. (1991). Pilus mediated adsorption of *Pseudomonas syringae* to bean leaves (Abstr.). Phytopathol. 81 : 1245.

- Segal R, Pisanty S, Wormser R, Azaz E and Sela M. (1985). Anticariogenic activity of licorice and glycerrhizine I: inhibition of in vitro plaque formation by *Streptococcus mutans*. J. Pharm. Sci. 74 : 79–81.
- Silveira S, Daroit D, Sant Anna V, Brandelli A. (2013). Stability modeling of red pigments produced by *Monascus purpureus* in submerged cultivations with sugarcane bagasse. Food Bioprocess Technol. doi:10.1007/s11947-011-0710-8 : 1–8.
- Srianta I, Hendrawan B, Kusumawati N, Blanc P. (2012). Study on durian seed as a new substrate for angkak production. International Food Res. J. 19(3) : 941-945.
- Sroykesorn K, Wanleeluk A, and Kongruang S. (2011). Food Borne Pathogen Inhibition by Citrinin from *Monascus purpureus*. International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. Singapore.
- Stemmer W, Sequeira L. (1987). Fimbriae of phytopathogenic and sym-biotic bacteria. Phytopathol. 77 : 1633-39.
- Sun J, Seong J, Geon W, Jin K, Nam D, Heeyong J, Jungae J, Seung H, Seung H, Chul S, Jong W. (2012). Inhibition of hepatitis C virus replication by *Monascus* pigment derivatives that interfere with viral RNA polymerase activity and the mevalonate biosynthesis pathway. J. Antimicrob. Chemother. 67 : 49–58.
- Su N, Lin Y, Lee M, Ho C. (2005). Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. J. Agric. Food Chem. 53 : 1949–1954.
- Su Y, Huang J. (1980). Fermentative production of anka-pigments (*Monascus* pigments). Proc. Nat. Sci. Coun. Roc. 4 : 201-215.
- Tseng K, Fang T, Chiang S, Liu C, Wu C, Pan T. (2012). Immunomodulatory activities and antioxidant properties of polysaccharides from *Monascus*-fermented products *in vitro*. J. Sci. Food Agric. 92(7) : 1483–1489.
- Turner W. (1971). Fungal metabolites. Academic Press, London England. 15 : 445–476.
- Ungureanu C, Ferdes M. (n.d.). Antibacterial and antifungal activity of red rice obtained from *Monascus purpureus*.
- van Doorn, Boonekamp P, Oudega B. (1991). Characterization of fimbriae, expressed by the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pathovar *hyacinthi* (Abstr.). In FEMS Symp. Mol. Recog. Host-plant Interact, Porvoo, Finland.

- Vidyalakshmi R, Paranthaman R, Muruges S, Singaravadivel K. (2009a). Microbial bioconversion of rice broken to food grade pigments. Glob. J. Biotechnol. Biochem. 4 : 84–87.
- Wong H, Koehler P. (1981). Production and Isolation of an Antibiotic from *Monascus purpureus* and its Relationship to Pigment Production. J. Food Sci. 46(2) : 589-592.
- Wong H, Lin Y, Koehler P. (1981). Regulation of growth and pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentrations. Mycologia. 73 : 649-654.
- Yasukawa K, Akihisa T, Oinuma H, Kaminaga T, Kanno H, Kasahara Y, Tamura T, Kumaki K, Yamanouchi S, Takido M. (1996). Inhibitory effect of taraxastane-type triterpenes on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. Oncology. 53 : 341–344.
- Yasukawa K, Takahashi M, Natori S, Kawai K, Yamazaki M, Takeuchi M, Takido M. (1994). Azaphilones inhibit tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in 2-stage carcinogenesis in Mice. Oncology. 51 : 108–112.
- Yongsmith B, Kitprechavanich V, Chitradon L, Chaisrisook C, Budda N. (2000). Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. J. Mol. Catal. 10 : 263-272.
- Young D, Sequeira L. (1986). Binding of *Pseudomonas solanacearum* fimbriae to tobacco leaf cell walls and its inhibition by bacterial extracellular polysaccharides. Physiol. Mol. Plant. Path. 28 : 393-402.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช NGA (nutrient glucose agar)

Peptone	5.0 กรัม
Glucose	10.0 กรัม
Beef extract	3.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร Tetrazolium chloride medium (TTC) สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. solanacearum*

ส่วนที่ 1 (basal medium)

Peptone	10.0 กรัม
Glucose	5.0 กรัม
Casein hydrolysate	1.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำ แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 200 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 15 นาที

ส่วนที่ 2 (aqueous solution tetrazolium)

2,3,5 – triphenyl tetrazolium chloride	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน นำไปผ่านการฆ่าเชื้อโดยการกรอง (filtration) หลอมอาหารจากส่วนที่ 1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วเติมส่วนที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนเทลงจานเลี้ยงเชื้อ

3. อาหาร SM-1 ใช้สำหรับการคัดเลือก (selective media) เฉพาะเชื้อ *R. solanacearum*

ส่วนที่ 1 (basal medium) ใช้อาหาร TZC

ส่วนที่ 2 (aqueous solution) ของสารต่าง ๆ คือ

Crystal violet**	50	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Thimerosal*	5	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Polymycin sulfate*	100	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Tyrothricin*	20	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Chloromycetin*	5	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Cycloheximide*	50	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือ
Chlotothalonil*	80	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ทำการฆ่าเชื้อโดยละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร นาน 30 นาที แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น หนึ่งฆ่าเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

** ฆ่าเชื้อโดยการกรอง หรือนำไปหนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

สำหรับอาหาร mSM-1 ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ใช้อาหาร TZC เป็น basal medium เติม crystal violet 50 ppm และ polymyxin B sulfate 50 ppm ผสมให้เข้ากัน ก่อนเทอาหารลงจานเลี้ยงเชื้อ

เปรียบเทียบกิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการ และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลที่ได้รับ	หมายเหตุ
1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสีสีแดงที่ผลิตได้ในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่เป็นสาเหตุโรคพืช	1.1 การผลิตสารสีสีแดงจาก <i>Monascus purpureus</i> โดยใช้ข้าวหอมมะลิเป็นวัตถุดิบ	1. ได้ข้อมูลชนิดและปริมาณสารสีสีแดง (เหลือง ส้ม แดง)	ทำให้ทราบประสิทธิภาพของสารสีสีแดงที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วต่อแบคทีเรีย	บรรลุตามแผน
	1.2 การสกัดหยาบข้าวแดงและทำบริสุทธิ์สารสีสีแดง	2. ได้ทราบอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวชะสำหรับทำ Column chromatography 3. ได้สารสีสีแดงที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น 4. ได้ทราบประสิทธิภาพของสารสีสีแดงในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช	สาเหตุโรคพืชเพื่อที่จะศึกษากลไกของสารสีสีแดงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	บรรลุตามแผน
	1.3 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสีสีแดงที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายสำคัญที่เป็นสาเหตุโรคพืช	5. ทราบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้		บรรลุตามแผน
2. ศึกษากลไกของสารสีแดงในระดับความเข้มข้นที่กำหนดต่อเซลล์แบคทีเรีย <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	2.1 ผลของสารสีสีแดงต่อ ค่า hydrophobic ความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวและการเกาะกลุ่มของเซลล์	1. ทราบผลของสารสีสีแดงต่อเซลล์แบคทีเรีย 2. ทราบฤทธิ์ของสารสีสีแดง ว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ	ได้ทราบว่าสารสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ) โดยการไปเพิ่มค่า hydrophobicity ทำให้เซลล์เกิดการเกาะกลุ่มเพิ่มมากขึ้น ส่งผลต่อการถ่ายเทออกซิเจนเข้าสู่เซลล์	บรรลุตามแผน
	2.2 ผลของสารสีสีแดงต่อการเกาะกลุ่มของเซลล์และควมมีชีวิตของเซลล์ โดยการย้อมด้วยสี methylene blue			บรรลุตามแผน

3. ศึกษาผลของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมการเกิดโรคแคงเกอร์ (canker) และโรคเหี่ยว (ralstonia wilt) ภายในเรือนทดลอง	3.1 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของต้นมะนาวเป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ โดยสังเกตใบที่เกิดโรค และระดับความรุนแรงของโรค 3.2 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบข้าวแดงในการควบคุมโรคเหี่ยวเป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ โดยสังเกตจำนวนต้นที่เหี่ยวและระดับความรุนแรงของโรค พร้อมทั้งนับปริมาณเชื้อในดิน	ทราบผลของสารสกัดหยาบในการยับยั้งโรคพืช ในเรือนทดลอง	สามารถประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบในการควบคุมโรคแคงเกอร์และโรคเหี่ยว ในพืชทดแทนการใช้สารเคมีได้	บรรลุตามแผน
--	---	--	--	--------------------

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่น ๆ ต่อ สกว.

.....

.....

ลงนาม..... ทพ.นง ภิรมย์

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

วันที่..... 22 ธันวาคม 2557

เปรียบเทียบ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และที่ได้จริง

Output		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ทำนาระบุสาเหตุ และการแก้ไขที่ท่าน ดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ	ผลสำเร็จ (%)	
1. ศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดของ สารสีแดงที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย เป้าหมายสำคัญที่เป็นสาเหตุโรคพืช	100 %	
2. ศึกษากลไกของสารสีแดงต่อเซลล์ แบคทีเรีย <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	100%	
3. ศึกษาผลของสารสีแดงในการ ควบคุมการเกิดโรคแคงเกอร์ (canker) และโรคเหี่ยวภายในเรือน ทดลอง	100%	

ลงนาม. ทพ.นรภัฏ ภิรมย์วงศ์ (หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)
(.....นายจาตุรนต์ ทิพย์วงศ์.....)
วันที่.....22 ธันวาคม 2557.....