การยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดแยกจากดิน

Inhibition of *Aspergillus* sp. by antagonistic bacteria isolated from soil

วาสนา เนียมแสวง* จริยา อินสว่าง และสุวนันท์ สถาปิตานนท์

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
**wasana@npru.ac.th*

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียในดินที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา Aspergillus sp. และศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรีย โดยเก็บตัวอย่างดิน จำนวน 5 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณผิวดินในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี 1 แหล่ง จังหวัดนครปฐม 3 แหล่ง และจังหวัดกาญจนบุรี 1 แหล่ง สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด จำนวน 56 ไอโซเลท และจากการคัดแยกเชื้อราจากเมล็ดถั่วลิสงขึ้นรา พบว่า เป็นเชื้อรากลุ่ม Aspergillus sp. ที่มีลักษณะเส้นใยสีขาว สปอร์มีสีเขียว และสร้างโคนิเดีย เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา Aspergillus sp. ซึ่งแยกได้จากเมล็ดถั่วลิสงขึ้นรา ด้วยวิธี dual culture technique โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า มีแบคทีเรียเพียง 8 ไอโซเลท ได้แก่ S12 S19 S35 S42 S51 S52 S54 และ S55 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา Aspergillus sp. ได้ จากนั้นนำมาระบุสายพันธุ์ พบว่า แบคทีเรียทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ Klebsiella sp.

คำสำคัญ: แบคทีเรียปฏิปักษ์ เชื้อรา *Aspergillus* sp. เทคนิค dual culture

Abstract

The aims of this study were to 1) isolate bacteria from soils and 2) study an antagonistic activity against fungi isolated from peanuts. Soil samples were collected from 5 areas as followed: Suphanburi (1 areas), Nakhon Patom (3 areas) and Kanchanaburi (1 areas). Total 56 bacterial isolates were separated from all the samples. Fungal strain isolated from peanut was determined as Aspergillus sp. with the white hyphae and green conidia spores. The study by dual culture technique found that 8 bacterial isolates S12, S19, S35, S42, S51, S52, S54 and S55, which all identified as Klebsiella sp., had antagonistic activities against the Aspergillus sp.

Keywords: antagonistic bacteria, *Aspergillus* sp., dual culture technique

1. บทนำ

เชื้อรา *Aspergillus* sp. พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ อีกทั้งเป็นสาเหตุในการทำลายผลผลิตทางการเกษตรทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต นอกจากนี้ ยังมีการสร้างสารพิษกลุ่มอะฟลาทอกซิน (aflatoxins) ปนเปื้อนอยู่ในผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะในเมล็ดธัญพืชและพืชน้ำมันชนิดต่าง ๆ เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด พริก ข้าวฟ่าง เครื่องเทศ สมุนไพรต่าง ๆ และมะพร้าว เป็นต้น อะฟลาทอกซินสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ ทั้งทางตรงโดยการบริโภคผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่ปนเปื้อนสารพิษดังกล่าว และทางอ้อมโดยการบริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน โดยสัตว์เหล่านั้นจะได้รับอะฟลาทอกซิน จากอาหารสัตว์ที่มีส่วนผสมของผลผลิตทางการเกษตรที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้ว บางส่วนจะถูกขับออกในรูปเดิม บางส่วนจะถูกกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของสัตว์เปลี่ยนแปลงเป็นสารเคมีหลายตัว ได้แก่ อะฟลาทอกซิคอล (aflatoxicol) อะฟลาทอกซิน 8, 9-อีปอกไซด์ (aflatoxin 8,-9 epoxide) ทั้งที่มีพิษมากขึ้นและน้อยลง โดยอะฟลาทอกซิคอล และอะฟลาทอกซิน 8, 9-อีปอกไซด์ บางส่วนจะสะสมในเซลล์ตับ และบางส่วนถูกขับออกทางปัสสาวะ อุจจาระ และทางน้ำนม ดังนั้นหากเราบริโภคตับหรือน้ำนมของสัตว์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่ปนเปื้อน ก็จะทำให้ได้รับสารพิษไปด้วย ซึ่งสารพิษนี้จัดว่าเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ (วิษณุ ศรีลา, 2556) มีการใช้สารเคมีในการยับยั้ง *Aspergillus* sp. ซึ่งใช้ได้ผลดีในระยะแรก ๆ ต่อมาเชื้อรามีการปรับตัว สารเคมีสามารถยับยั้งเชื้อราได้น้อยลง อีกทั้งสารเคมียังอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีนักวิจัยหลากหลายกลุ่มทำการศึกษาวิธียับยั้ง *Aspergillus* sp. โดยไม่ใช้สารเคมี เช่น การใช้สารสกัดสมุนไพร และใช้แบคทีเรียทดแทนการใช้สารเคมี ซึ่งแบคทีเรียในดินมีจำนวนมากและมีหลากหลายชนิด สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ซึ่งจากการศึกษารวบรวมข้อมูล พบว่าแบคทีเรียดินหลายชนิดที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. เช่น *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli* และ *Bacillus* sp. เป็นต้น

2. วัตถุประสงค์ในการวิจัย

2.1 เพื่อคัดแยกแบคทีเรียในดิน
2.2 เพื่อศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียในดินที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp.

3. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Aspergillus sp. เป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องการออกซิเจน (oxygen) สูง โดยทั่วไปเจริญเป็นเส้นใยราบนผิวของอาหารที่มีคาร์บอน (carbon) มาก เช่น กลูโคส (glucose) และอะไมโลส (amylose) เป็นต้น สามารถพบปนเปื้อนในอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ เช่น ขนมปัง มันฝรั่ง และเจริญบนต้นไม้ เป็นต้น *Aspergillus* sp. มีทั้งประโยชน์และโทษ ประโยชน์ ได้แก่ การนำไปใช้ในการหมักอาหาร เช่น การหมักเต้าเจี้ยว และซีอิ้ว เป็นต้น ส่วนโทษ ได้แก่ ก่อโรคในพืช มนุษย์ สัตว์ และอาหารเน่าเสีย *Aspergillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ (enzyme) ได้หลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ย่อยโมเลกุลของแป้งให้เป็นน้ำตาล เอนไซม์โปรตีเอส (protease) ย่อยโมเลกุลของโปรตีน (protein) ให้เป็นกรดอะมิโน (amino acid) เอนไซม์เพกทิเนส (pecinase) ย่อยสลายเพกทิน (pectin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช และบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ (mycotoxin) เช่น aflatoxin และ ochratoxin ซึ่งเป็นอันตรายในอาหาร (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2553) การยับยั้ง *Aspergillus* sp. มีหลายวิธี ได้แก่ การใช้สารสกัดสมุนไพร การใช้จุลินทรีย์ และการใช้สารเคมี เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดของสมุนไพร ชนิดของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของสารสกัด และสารเคมี เป็นต้น

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ส่วนใหญ่มีเซลล์เดียว เป็นเซลล์โพรคาริโอต (prokaryote cell) แบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ กลม (cocci) แบบท่อน (bacilli หรือ rod) และแบบเกลียว (spiral) เป็นต้น สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ และอากาศ แบคทีเรียในดินเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุด ซึ่งแบคทีเรียในดินทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ และปล่อยธาตุอาหารต่าง ๆ ออกมาเป็นประโยชน์ต่อพืช นอกจากนี้ แบคทีเรียในดินบางชนิดสามารถยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในพืชได้ *Aspergillus* sp. เป็นเชื้อราก่อโรคพืชชนิดหนึ่ง ซึ่งมีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Aspergillus* sp. ได้แก่ *E. coli*, *Bacillus fortis*, *B. faragiris*, *Pseudomonas fluorescence* และ *P. malophilia* ซึ่งแยกจากดิน (Mushtaq et al. 2010: 966-969) นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรีย *Klebsiella* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่แยกจากดินทะเลสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้ (Das et al., 2015: 191-193) เป็นต้น

การยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดแยกจากดิน มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

สุรีย์ นานาสมบัติ และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและยีสต์ในถั่วลิสง และผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสงชนิดละ 10 ตัวอย่าง โดยนำถั่วลิสงดิบและถั่วลิสงทอดทั้งเมล็ดมาวิเคราะห์โดย direct plating ถั่วลิสงคั่วบดและถั่วลิสงตัดวิเคราะห์โดยวิธี dilution plating พบว่า ถั่วลิสงดิบมีการปนเปื้อนของเชื้อราสูง (ร้อยละ 86.2) ซึ่งมากกว่าการปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลิสงทอด (ร้อยละ 76.2) ส่วนถั่วลิสงคั่วบด และถั่วลิสงตัด พบเชื้อราและยีสต์ค่อนข้างน้อย เชื้อราที่พบมากที่สุดในถั่วลิสง คือ *Aspergillus* spp. รองลงมาเป็น *Rhizopus* spp. และ *Penicillium* spp. จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันกระวาน น้ำมันกานพลู และน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *A. ochraceus* TISTR 3557, *A. parasiticus* TISTR 3276, *A. terreus* TISTR 3109, *A. versicolor* TISTR 3460, *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Penicillium citrinum* TISTR3437 และ *A. flavus* PN-09 ที่แยกได้จากถั่วลิสงดิบ เชื้อราส่วนใหญ่ที่ทดสอบมีความไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันกานพลูมากที่สุด

Praphat et al. (2013: 220-229) ได้ทำการศึกษาการควบคุมโรคพืชโดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ กลไกการทำงานของจุลินทรีย์ในการควบคุมโรคพืช ได้แก่ การเป็นปรสิต การผลิตสารปฏิชีวนะ การแก่งแย่งพื้นที่ การแก่งแย่งอาหาร การชักนำให้พืชสร้างความต้านทาน และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

Das et al. (2015: 191-193) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคพืช โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้จากดินชายทะเล จำนวน 8 ไอโซเลท นำมาทดสอบด้วย dual culture technique พบว่า มี 2 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารต้านเชื้อรา ได้แก่ ไอโซเลท *Klebsiella* sp. AF4 และ *Pseudomonas* sp. AF7 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. niger*, *A. flavus* และ *F. oxysporum* ได้

Mushtaq et al. (2010: 966-969) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในดิน ซึ่งได้แก่ *E. coli*, *Bacillus fortis*, *B. faragiris*, *P. fluorescence* และ *P. malophilia* ยับยั้งเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ได้แก่ *A. flavas*, *A. niger*, *P. ltalicum* และ *P. simplicissmum* ด้วย dual culture technique พบว่า แบคทีเรียทั้งหมด 5 สายพันธุ์ *E. coli* สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด

Sivanantham et al. (2013: 1-4) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในดินต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช ทำการคัดแยกแบคทีเรียในดินได้ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli, Klebsiella ozaenae, Pseudomonas maltophila, Bacillus circulans, Bacillus sphaericus, Bacillus coagulans, Serratia marcescens* และ *Streptococcus* spp. นำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Alternaria porri, Fusarium oxysporum, Sclerotium rolfsii* และ *Botryodiplodia theobromae* ด้วย agar disc assay และ slide culture techniques พบว่า *P. maltophila* และ *B. circulans* สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชทั้ง 4 สายพันธุ์ได้

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างดินและคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างดิน โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 5 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณผิวดินในพื้นที่ตำบลศรีสำราญ อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี 1 แหล่ง ดินตำบลนครปฐม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 2 แหล่ง ดินตำบลบัวปากท่า อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม 1 แหล่ง และดินตำบลท่าเสา อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี 1 แหล่ง โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณผิวหน้าดินที่มีความลึกประมาณ 1-2 เซนติเมตร ตักตัวอย่างดินลงในถุงพลาสติก นำดิน 0.5 กรัม มาทำ dilutions และ pour plate บนอาหาร LB agar นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกแบคทีเรีย ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน นำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Streak plate ลงอาหาร LB agar แล้วนำมาเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.2 การคัดแยกและการจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา

แยกเชื้อราจากเมล็ดถั่วลิสงขึ้นรา โดยนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นำมาทำให้บริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะเพื่อจำแนกสายพันธุ์ตามวิธีของ Klich (Klich, 2002: 116) แล้วนำมาเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียในดินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราบนอาหาร PDA ด้วยวิธี dual culture technique (Mushtaq et al., 2010: 966-969) โดยขีดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราคู่กัน ซึ่งแบคทีเรีย กับเชื้อราจะมีระยะห่างกัน 1.5 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดยมี *Aspergillus* sp. เป็นชุดควบคุม

4.4 การทดสอบสายพันธุ์แบคทีเรีย

นำแบคทีเรียมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อระบุสายพันธุ์แบคทีเรียตามวิธีของ bergey (John et al., 1994: 754)

5. ผลการวิจัย

5.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในดินและการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp.

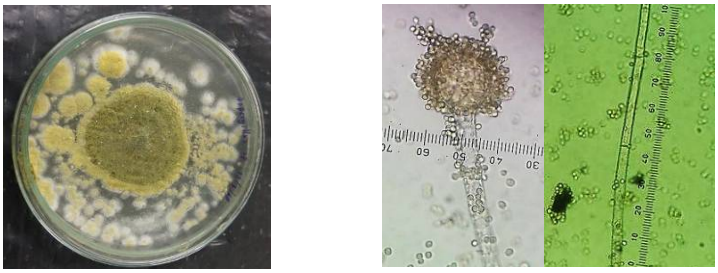
การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน 5 แหล่ง โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณผิวดินในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี 1 แหล่ง จังหวัดนครปฐม 3 แหล่ง และจังหวัดกาญจนบุรี 1 แหล่ง สามารถคัดแยกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันได้จำนวน 56 ไอโซเลท ได้แก่ 16 10 10 10 และ10 ไอโซเลท ตามลำดับ และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. พบว่า มีแบคทีเรียเพียง 8 ไอโซเลท ได้แก่ S12 S19 S35 S42 S51 S52 S54 และ S55 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ดังภาพที่ 1

(ก) (ข)

ภาพที่ 1 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ด้วย dual culture technique ของไอโซเลท S12
(ก) การยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. A หมายถึง ไอโซเลทแบคทีเรีย, B หมายถึง เชื้อรา *Aspergillus* sp.
(ข) control

5.2 ผลการคัดแยกเชื้อรา *Aspergillus* sp. จากเมล็ดถั่วลิสงขึ้นรา

สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Aspergillus* sp. โคโลนีของเชื้อรามีสีขาว สีเหลือง เหลืองอมเขียว บางชนิดอาจมีสีน้ำตาลจนถึงสีดำ โคนิเดีย (conidia) มีรูปร่างกลม สร้างโคนิเดียต่อกันเป็นสายยาว เส้นใยไม่มีสีและมีผนังกั้น ส่วนปลายของก้านชูโคนิเดียจะเจริญโป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vesicle) ซึ่งมีรูปร่างกลม ดังภาพที่ 2



(ก) (ข)

ภาพที่ 2 เชื้อรา *Aspergillus* sp.
(ก) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus* sp. บนอาหาร PDA
(ข) ลักษณะโคนิเดีย และลักษณะเส้นใยมีผนังกั้น

5.3 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

แบคทีเรียในดินจำนวน 8 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้แก่ S12 S19 S35 S42 S51 S52 S54 และ S55 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรีย

รหัสไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างของเซลล์	การจัดเรียงตัวของเซลล์	ผลการย้อมสีแบบแกรม
S12	กลม นูน ขนาดใหญ่ เยิ้ม สีครีม	ท่อนสั้น	เซลล์เดี่ยว	แกรมลบ
S19	กลม นูน ขนาดใหญ่ เยิ้ม สีครีม	ท่อนสั้น	เซลล์เดี่ยว	แกรมลบ
S35	กลม นูน ขนาดใหญ่ เยิ้ม สีครีม	ท่อนสั้น	เซลล์เดี่ยว	แกรมลบ
S42	กลม นูน ขนาดใหญ่ เยิ้ม สีครีม	ท่อนสั้น	เซลล์เดี่ยว	แกรมลบ
S51	กลม นูน ขนาดใหญ่ เยิ้ม สีครีม	ท่อนสั้น	เซลล์เดี่ยว	แกรมลบ
S52	กลม นูน ขนาดใหญ่ เยิ้ม สีครีม	ท่อนสั้น	เซลล์เดี่ยว	แกรมลบ
S54	กลม นูน ขนาดใหญ่ เยิ้ม สีครีม	ท่อนสั้น	เซลล์เดี่ยว	แกรมลบ
S55	กลม นูน ขนาดใหญ่ เยิ้ม สีครีม	ท่อนสั้น	เซลล์เดี่ยว	แกรมลบ

5.4 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียเพื่อระบุสายพันธุ์

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp . ได้ ดังตารางที่ 2 และเมื่อนำมาทดสอบความต้องการออกซิเจนในการเจริญ พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดนี้เป็นพวก facultative anaerobe จากผลการทดสอบดังกล่าว ทำให้ระบุสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Klebsiella*

ตารางที่ 2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบทางชีวเคมี	รหัสไอโซเลท							
	S12	S19	S35	S42	S51	S52	S54	S55
catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	–	–	–	–	–	–	–	–
Motility test	–	–	–	–	–	–	–	–
O-F test	–	–	–	–	–	–	–	–
MR test	–	–	–	–	–	–	–	–
VP Test	–	–	–	–	–	–	–	–
Indole test	–	–	–	–	–	–	–	–
Simmons Citrate test	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	–	–	–	–	–	–	–	–
Lactose	–	–	–	–	–	–	–	–
Sucrose	–	–	–	–	–	–	–	–
Mannitol	–	–	–	–	–	–	–	–
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	–	–	–	–	–	–	–	–
Fructose	–	–	–	–	–	–	–	–

หมายเหตุ : + หมายถึง มีการเปลี่ยนแปลง, - หมายถึง ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

6. สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียในดินจำนวน 5 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณผิวดินในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี 1 แหล่ง จังหวัดนครปฐม 3 แหล่ง และจังหวัดกาญจนบุรี 1 แหล่ง สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมดจำนวน 56 ไอโซเลท ได้แก่ 16 10 10 10 และ10 ไอโซเลท ตามลำดับ จากการคัดแยกเชื้อราจากเมล็ดถั่วลิสงขึ้นรา พบว่า ได้เชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยสีขาว สปอร์มีสีเขียว และสร้าง โคนิเดีย เมื่อนำมาจำแนกสายพันธุ์เป็นเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* sp. นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. พบว่า มีแบคทีเรียเพียง 8 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้แก่ S12 S19 S35 S42 S51 S52 S54 และ S55 และเมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดมาจำแนกสายพันธุ์ พบว่า เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Klebsiella*

7. อภิปรายผลการวิจัย

7.1 การคัดแยกแบคทีเรียในดิน

จากผลการคัดแยกแบคทีเรียในดิน สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hassan et al. (2014: 217-219) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียในดินเพื่อนำมาศึกษากิจกรรมการเป็นยาต้านจุลชีพ พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียในดินได้ 22 ไอโซเลท จำแนกเป็น *Bacillus* sp. 14 ไอโซเลท *Pseudomonas* sp. 5 ไอโซเลท และ *Escherichia coli*. 3 ไอโซเลท และการที่ดินจากแต่ละแหล่งมีจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จำนวนใกล้เคียงกัน เนื่องจากสภาพของดินที่มีลักษณะคล้ายกัน คือ เป็นดินร่วนและดินทรายที่มีผิวหน้าดินแห้ง ยกเว้นดินในตำบลศรีสำราญ อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี ที่คัดแยกไอโซเลทของแบคทีเรียได้มากที่สุด เนื่องจากเป็นดินเหนียวที่มีเนื้อดินละเอียดและมีความสามารถในการอุ้มน้ำ จึงมีปริมาณของแบคทีเรียที่พบมากกว่าดินทราย ทั้งนี้ในดินมีปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ได้แก่ ธาตุอาหารและปริมาณสารอินทรีย์ ความชื้น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง การถ่ายเทของอากาศ และความลึกของดิน เป็นต้น

7.2 การคัดแยกเชื้อราจากถั่วลิสง

จากผลการคัดแยกเชื้อราจากถั่วลิสง พบว่า เป็นเชื้อราที่มีโคโลนีสีเขียว เส้นใยสีขาว มีสปอร์สีเขียว และสร้างโคนิเดีย เมื่อนำมาทดสอบสายพันธุ์ พบว่าเป็น *Aspergillus* sp. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สุรีย์ นานาสมบัติ และคณะ (2559: 43-45) ได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลิสงและการควบคุมโดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ พบว่าเชื้อราที่พบมากในถั่วลิสง คือ *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp. และ *Penicillium* spp. ซึ่งเชื้อราทั้ง 3 ชนิด จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน แต่จะพบเชื้อรา *Aspergillus* spp. มากที่สุด เนื่องจาก *Aspergillus* spp. สามารถย่อยโปรตีนและแป้งในถั่วได้ (ยุวศรี ต่ายคำ, 2555)

7.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ของแบคทีเรียในดิน

จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ของแบคทีเรียในดิน พบว่า เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Klebsiella* sp. สามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Das et al. (2015: 191-193) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช พบว่า *Pseudomonas* sp. และ *Klebsiella* sp. สามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้ ทั้งนี้เมื่อนำแบคทีเรีย และเชื้อรามาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี dual culture technique พบว่า เกิดวงใสจากการยับยั้งเชื้อราด้วยแบคทีเรีย

8. ข้อแสนอแนะ

8.1 ควรผลิตสารทุติยภูมิจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

8.2 หาแนวทางในการประยุกต์ใช้สารทุติยภูมิในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus* sp.

9. เอกสารอ้างอิง

บุษราคัม อุดมศักดิ์, สุรีย์พร บัวอาจ, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และอมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. (2555). การคัดเลือกและทดสอบสายพันธุ์ Bacillus ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora parasitica.* ใน **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.** 885-898.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. (2553). ***Aspergillus flavus***. ค้นเมื่อ 12 มีนาคม 2560. จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0568/aspergillus-flavus

ยุวศรี ต่ายคำ. (2555). **ผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากจุลินทรีย์**. ค้นเมื่อ 12 มีนาคม 2560. จาก http://biology.ipst.ac.th/?p=94

วรรณนิภา มธุรส, พัฒน ทวีโภค, จุฬาภรณ์ กำเนิดเพชร, อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช และรัตนนุช จันทร์เพ็ญ. (2555). การใช้สารทุติยภูมิของเชื้อ *Bacillus subtilis* B01 เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Curvularia eragrostidis* สาเหตุโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้. ใน **การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9 วันที่ 6–7 ธันวาคม 2555.** 1144-1150.

วิมลวรรณ ชัยทอง, วีระชัย ตีรอรุณศิริ และสุภัค มหัทธนพรรค. (2557). การควบคุมเชื้อรา *Bipolaris turcica* (Pass.) สาเหตุโรคใบไหม้ในข้าวโพดโดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. ใน **การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต ครั้งที่ 3 วันที่ 17-18 ธันวาคม 2557: การบูรณาการงานวิจัยไทยเชื่อมโยงกับเครือข่ายสังคมอาเซียน.** 80-81.

วิษณุ ศรีลา. (2556). **Mycotoxin**s. ค้นเมื่อ 12 มีนาคม 2560. จาก http://www.ift.org/Knowledge-Center/Read-IFT-Publications/Science-Reports/Scientific-Status-Summaries/Editorial/Understanding-Mycotoxins.aspx

สุรีย์ นานาสมบัติ, นพพร กิตติศุภมงคล, นุชนาฏ หมั่นพลศรี และปณิธาณ กัณหา. (2559). การปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลิสงและการควบคุมโดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ. **วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.** 44 (1), 43-55.

Adedayo Omowumi, O and Temitope Samuel, O. (2014). Antifungal activities of *Bacillus subtilis* isolated from some condiments and soil. **African journal of microbiology research**. 8 (18), 1841-1849.

Avasthi, S., Gautam, A.K. and Bhadauria, R. (2010). Antifungal activity of plant products against *Aspergillus niger*: a potential application in the control of a spoilage fungus. **Biological Forum-An Internatioal Journal.** 2 (1), 53-55.

Das, M.P., Devi P.V. and Yasmine, Y. (2015). A study on antagonistic potential of bacteria against phytopathogenic fungi. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.** 34 (1)**,** 191-193.

Hassan, S. A., Hanif, E. and Zohra, R. R. (2014). Isolation and screening of soil bacteria for potential antimicrobial activity. **Fuuast J. Biol**. 4 (2), 217-219.

Klich, M.A. (2002). **Identification of Common Aspergilus species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 116.

Mushtaq, S., Ali, A., Khokhar, I. and Mukhtar, I. (2010). Antagonisitic potential of soil bacteria against food borne fungi. **World Applied Sciences Journal**. 11 (8), 966-969.

Mckeen, C.D., C.C. Reilly and Pusey, P.L. (1986) Production and partial characterization of antifungal sustances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. **Ecology and Epidermiology** 76, 136-139.

Praphat, K. and Aphidech, S. (2013) Plant disease control using antagonistic microorganisms. **J Sci Technol MSU.** 32 (2), 220-229.

John, G. H., Noel, R.K., Peter, H.A.S., James, T.S. & Stanley, T.W. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. (9 th Ed). United States of America: Lippincott William & Wilkins. 754.

Sivanantham, T., Rasaiyah, V., Satkunanathan, N., Thavaranjit, A.C. (2013). In vitro screening of antagonistic effect of soil borne bacteria on some selected phytopathogenic fungi. **Archives of Applied Science Research.** 5 (1), 1-4.