การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรในการลดปริมาณเชื้อและการเกิดโรคเน่าเละของผักกาดเขียวปลีในดินติดเชื้อและวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ของสมุนไพรที่ให้ผลดีที่สุด

Utilization of Herbal Extract for Reducing the Bacterial Population and Disease incidence of Chinese Cabbage Soft Rot in the Infested Soil and Analysis of Bioactive Substances from the Best Herbal Extract

วัชรา สุวรรณ์อาศน์,[1] ศศิธร วุฒิวณิชย์ [2]และชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[2]*

Watchara Suwanart,[1*] Sasitorn Vudhivanich [2] and Chainarong Rattanakreetakul[2]

ABSTRACT

The utilization of ethanolic herbal extracts for reducing the population of *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* (*Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora*), the causal agent of Chinese cabbage soft rot, in the infested soil was studied. Twenty kinds of herbal crude extracts were tested for their bioactivities against bacterial soft rot agent by paper disc agar diffusion on double layer nutrient glucose agar (NGA). Eight crude extracts including clove fruit, nut gall fruit, beleric myrobalan fruit, cheburic myrobalan fruit, pomegranate fruit peel, mangosteen fruit rind, betal leaf and guava leaf could inhibit the growth of bacteria and show typical inhibition zones. However, the first 3 extracts showing the widest inhibition zones including beleric myrobalan fruit (0.41 cm), nut gall fruit (0.33 cm) and pomegranate fruit peel (0.25 cm) were selected for further studied. Each herbal crude extract at the concentration of 10,000 and 20,000 ppm were mixed with the artificial infested soil in greenhouse condition. Fourty days old Chinese cabbages were transplanted in the treated soil. The bacterial population was determined by soil serial dilution and viable plate count on Endo agar at 5-day interval for 30 days. This experiment revealed that beleric myrobalan fruit crude extract at 20,000 ppm could reduce bacterial population from 3.2 X 10^7cfu/g to 2.5 X 10^5cfu/g within 30 days while that in the control plot was 9.87 X 10^5cfu/g. The application time of the beleric myrobalan fruit crude extract was studied. It showed that soil drench with 20,000 ppm beleric myrobalan fruit crude extract for 3 applications at 10-day interval could reduce bacterial population to 5.55 X 10^6cfu/g and the disease incidence was 17.5% while in the control treatment, the bacterial population was still as high as 1.96 X 10^7cfu/g and the disease incidence was 82.5%. Furthermore, the bioactive substance in beleric myrobalan fruit crude extract was separated by Quick column chromatography and partially purified by Thin layer chromatography. Five interesting fractions, FS1 to FS5, were observed. The inhibition test

[1*]กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Department of Agricultural Extension, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.

[2]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Plant Pathology, FacultyofAgriculture at Kamphaengsaen, Kasetsart University,Kamphaengsaen Campus, Nakorn Pathom 73140, Thailand.

[*]Corresponding author: E-mail address: agrstv@ku.ac.th

showed that FS2 fraction could inhibit the growth bacteria and showed the widest inhibition zone of 0.85 cm. The FS2 fraction was separated by Quick column chromatography and retested. Sub fraction FS2-5 provided the widest inhibition zone of 0.85 cm. Sub fraction FS2-5 was purified by Preparative thin layer chromatography and produced 1 band that R_f values of 0.50 showed yellow sediment characteristic.The structural elucidation of FS2-5 compound was determined by nuclear magnetic resonance (NMR). It was found that the ^{1}H NMR spectrum showed several proton at 2.5 ppm for hydroxyl protons; 3.7 ppm for methoxy protons and 7.0 ppm for aromatic proton. This proton pattern is similar to methyl gallate. It may be concluded that the bioactive compound against *P. carotovorum* sub sp. *carotovorum*, the Chinese cabbage soft rot agent, of beleric myrobalan fruit extract is a kind of methyl gallate.

Key words: bacterial soft rot, *Pectobacterium carotovorum, Erwinia carotovora,* beleric myrobalan, methyl gallate

บทคัดย่อ

สารสกัดหยาบจากเอทานอลของพืชสมุนไพร 20 ชนิด ถูกนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* (*Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora*) สาเหตุโรคเน่าเละของผัก โดยวิธี paper disc agar diffusion บนอาหาร double layer nutrient glucose agar ในห้องปฏิบัติการ พบสารสกัดหยาบจากพืช 8 ชนิด ได้แก่ ผลสมอพิเภก ผลเบญกานี เปลือกผลทับทิม ผลกานพลู ผลสมอไทย เปลือกผลมังคุด ใบฝรั่งและใบพลูที่สามารถก่อให้เกิดบริเวณยับยั้งได้ชัดเจน โดย 3 ลำดับแรกที่ให้ผลดีที่สุดได้แก่ สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก ผลเบญกานี และเปลือกผลทับทิม ค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งที่ 1,000 ppm เท่ากับ 0.41, 0.33 และ 0.25 ซม. ตามลำดับ จึงนำสารสกัดหยาบจากพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ ที่ความเข้มข้น 10,000 และ 20,000 ppm มาคลุกลงในดินจำลองการติดเชื้อ จากนั้นย้ายผักกาดเขียวปลีอายุ 40 วันลงปลูก สุ่มเก็บดินเพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อทุก 5 วันเป็นเวลา 30 วันโดยวิธี soil serial dilution และ viable plate count บนอาหาร Endo agar พบว่าสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก 20,000 ppm สามารถลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคในดินได้ดีที่สุด โดยปริมาณเชื้อลดลงจาก 3.20 x 10^7 cfu/gในวันแรก เหลือ 2.50 x 10^5 cfu/g ในวันที่ 30 เมื่อเทียบกับ control ในช่วงเวลาเดียวกันปริมาณเชื้อยังคงสูงอยู่ที่ 9.87 x 10^5 cfu/g จึงนำสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกมาศึกษาวิธีการใช้เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดพบว่าการใช้สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก 20,000 ppm ราดลงดิน ทุกๆ 10 วัน 3 ครั้งติดต่อกัน มีผลทำให้ปริมาณเชื้อลดลงจาก 3.20 x 10^7 cfu/gในวันแรก เหลือ 5.55 x10^6 cfu/g ในวันที่ 30 และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 17.50 % เมื่อเปรียบเทียบกับ control ปริมาณเชื้อในวันที่ 30 ยังคงสูง 1.96 x 10^7 cfu/g และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 82.50 % นำสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกมาแยกสารออกฤทธิ์โดยวิธี Quick Column Chromatography ได้สาร 5 fraction นำแต่ละ fraction มาทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยวิธี paper disc agar diffusion พบว่าสารสกัด fraction FS2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีขนาดของบริเวณยับยั้ง 0.85 ซม. จึงนำสารสกัด FS2 มาแยกด้วย Quick Column Chromatography อีกครั้งได้สาร 15 fraction นำแต่ละ fraction ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยวิธีการเดียวกัน พบว่าสารสกัด fraction FS2-5 ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด นำสารสกัด FS2-5 มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย Preparative thin layer chromatographyได้สาร 1 แถบ TLC plate sheet มีค่า R_f= 0.50 ลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองใส เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของสารโดยนิวเคลียร์แมกเนติกรีโซแนนซ์ (NMR) พบว่าสเปกตรัมของ^{1}H NMR แสดงสัญญาณ 2.5 ppm ซึ่งแสดงลักษณะของ hydroxyl protons ; 3.7 ppm แสดงลักษณะของ methoxy protons และ 7.0 ppm แสดงลักษณะของ aromatic protons จากองค์ประกอบของโปรตีน สรุปได้ว่าสาร FS2-5

ที่แยกสกัดได้จากผลสมอพิเภกและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ มีลักษณะสัญญาณคล้ายสาร methyl gallate

คำสำคัญ: โรคเน่าเละ การควบคุมโรค สมอพิเภก เมทิลกัลเลท สารสกัดจากพืช

คำนำ

โรคเน่าเละของผักที่เกิดจากแบคทีเรีย *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* (ชื่อเดิม *Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora*) เป็นโรคที่สำคัญของพืชผักโดยเฉพาะอย่างยิ่งในวงศ์กะหล่ำ ลักษณะอาการเกิดรอยช้ำฉ่ำน้ำที่ขยายตัวออกอย่างรวดเร็วทั้งในแนวกว้างและแนวลึก เนื้อเยื่อเน่าเละ มีเมือกเยิ้มและมีกลิ่นเหม็นเฉพาะตัว เชื้อสาเหตุโรคมีชีวิตอยู่ในเศษซากพืชในดินได้นานและแพร่กระจายได้ดีโดยน้ำ นอกจากทำให้ผักในแปลงเน่าเละแล้ว เชื้อที่ติดมากับผลผลิตทำให้ผักเน่าเสียในระหว่างการขนส่งและจำหน่าย (ศักดิ์, 2537; ศศิธร, 2545) การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี ก่อให้เกิดพิษต่อสภาพแวดล้อม เกษตรกรและผู้บริโภค และเป็นข้อจำกัดในการค้าระหว่างประเทศ เพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีในแปลงปลูกผักลง จึงได้มีการศึกษาหาวิธีการอื่นในการควบคุมโรค เช่น ศศิธร (2546) ศึกษาการจัดการดินเพื่อลดปริมาณเชื้อ *E. carotovora* sub sp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดเขียวปลีในสภาพโรงเรือน โดยใช้น้ำสกัดหยาบและกากของพืช 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกผลทับทิม ใบพลู เปลือกส้มเขียวหวาน ต้นลูกใต้ใบและเปลือกผลมังคุด พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถลดปริมาณเชื้อได้ โดยปริมาณเชื้อในดินในแต่ละสัปดาห์ลดลงในอัตราที่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้น้ำสกัดหยาบและกากของใบพลูและเปลือกผลทับทิมคลุกลงในดินที่มีการติดเชื้อ สามารถชลอการพัฒนาของโรคได้ ศศิธร (2547) ทดสอบสารสกัดหยาบจากพืช 19 ชนิด ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* sub sp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผัก โดยวิธี paper disc agar diffusion บนอาหาร double layer NGA พบสารสกัด 5 ชนิดให้ผลดี ได้แก่สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมและผลเบญกานี ยับยั้งเชื้อที่ 1,000 ppm ขึ้นไป สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกและผลสมอไทยยับยั้งเชื้อที่ 5,000 ppm ขึ้นไป และสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งยับยั้งเชื้อที่ 50,000 ppm ขึ้นไป ศศิธรและสุพจน์ (2548) ทดสอบสารสกัดหยาบจากพืช 89 ชนิด ซึ่งสกัดด้วยเอทานอล 95% โดยวิธี paper disc agar diffusion บนอาหาร double layer NGA พบสารสกัด 19 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ได้ โดย 2 ลำดับแรกที่ให้ผลดีที่สุดคือ สารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมและผลสมอพิเภก ศศิธรและสุพจน์ (2549) นำสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมและผลสมอพิเภกมาแยกสกัดอย่างละเอียดโดย Quick Column Chromatography แยกสารได้ 31 fraction นำแต่ละ fraction มาทดสอบและศึกษากลุ่มสารธรรมชาติเบื้องต้นโดยวิธี Phytochemical method พบว่าสารสำคัญที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์และแทนนิน ชนิดา (2553) ศึกษาสารออกฤทธิ์ของใบพลูในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของขิง โดยการนำสารสกัดหยาบจากใบพลูมาแยกด้วย Quick Column Chromatography และวิเคราะห์โครงสร้างของสารโดยนิวเคลียร์แมกเนติก (NMR) พบสเปคตรัมของสาร ^{1}H NMR แสดงสัญญาณของ aromatic proton (δ 6.45, 1H, d, J = 8.00 Hz), (δ 6.60, 1H, s) และ (δ 6.70, 1H, d, J = 8.02 Hz), olefinic proton(δ 5.90, 1H, m, -CH2-CH=CH2) และ (δ 5.00, 2H, m, -CH2-CH=CH2) และ methylene proton(δ 3.20, 2H, d, J = 6.66 Hz,-CH2-CH=CH2) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับสาร 4-allyl resorcinol ที่พบในรากพลู

การใช้สารสกัดหยาบจากพืชคลุกหรือราดดินเพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในดินติดเชื้อทดแทนการใช้สารเคมี เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเน่าเละของผัก

ในรุ่นต่อไปและลดต้นทุนการผลิต งานวิจัยนี้ได้นำพืชสมุนไพร 20 ชนิดที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย มาสกัดสารและทดสอบในห้องปฏิบัติการ เพื่อคัดเลือกสารสกัดจากพืชที่ให้ผลดีที่สุด ศึกษาวิธีการใช้ลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคในดินจำลองการติดเชื้อ จากนั้นนำสารสกัดจากพืชที่ให้ผลดีที่สุด มาแยกส่วนและทำให้บริสุทธิ์ด้วย Quick Column Chromatography และPreparative thin layer chromatography ทดสอบและวิเคราะห์โครงสร้างของสารออกฤทธิ์โดยนิวเคลียร์แมกเนติกรีโซแนนซ์ (NMR) เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรียต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์และทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ

เชื้อบริสุทธิ์ *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* ที่ใช้ในการทดลองแยกจากผักกาดเขียวปลีที่เป็นโรคเน่าเละโดยวิธี cross streak บนอาหาร Endo agar เลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีแดงเข้ม กลมนูน เยิ้ม ผิวเรียบเป็นมันและเหลือบแสง (metallic sheen) นำไปเพิ่มปริมาณบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) และปลูกเชื้อที่ค่าความขุ่นของเซลล์ O.D.$_{\lambda 590}$= 0.2 (ประมาณ 10^8 cfu/ml) ลงบนผักที่อ่อนแอต่อโรคได้แก่ ผักกาดขาวปลี มันฝรั่ง แครอท หอมหัวใหญ่ และกะหล่ำปลี เพื่อพิสูจน์โรคและทดสอบความรุนแรงของเชื้อ คัดเลือกเชื้อไอโซเลทที่รุนแรงที่สุดมาใช้ในการทดลอง นำเชื้อบริสุทธิ์ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี เปรียบเทียบกับคุณสมบัติของเชื้อชนิดนี้ตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9 th edition (Holt *et al.,* 1994) เก็บรักษาเชื้อใน slant NGA ปิดทับด้วย paraffin oil เก็บที่อุณหภูมิ 5 °C

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชในการยับยั้งเชื้อโดยวิธี paper disc agar diffusion

พืชทดสอบ พืชสมุนไพร 20 ชนิดได้แก่ กานพลู (clove : *Eugenia caryophyllus*) กล้วย (banana : *Musa sapientum* L.) ขมิ้นชัน (tumeric : *Curcuma longa* L.) ชะเอมเทศ(Spanish licorice : *Glycyrrhiza glabra* L.) ดอกเข็มสีแดง (West Indian jaxmine : *Ixora coccinea*) ทับทิม (pomegranate : *Punica granatum*) เบญกานี (nut gall : *Quercus infectoria* Olivier.) ฝรั่ง (guava: *Psidium guajava*) พริกหอม (bird chilli : *Capsicum frutescens*) พลู (betel vine : *Piper betel* L.) ฟ้าทะลายโจร (creat : *Andrographis paniculata* Nees.) มะขาม (tamarind : *Tamarindus indica*) แมงลัก (hairy basil : *Ocimum americanum* L.) มังคุด (mangosteen : *Garcinia mangostana*) สมอพิเภก (beleric myrobalan : *Terminalia bellirica*) สมอไทย (chebulic myrobalan : *Terminalia chebula* Retz.) สะระแหน่ (kitchen mint : *Metha cordifolia* Opiz.) หมาก (areca nut : *Areca catechu* L.) หูปลาช่อน (floras paint brush : *Emilia sonchifolia*) และหนุมานประสานกาย (*Schefflera venulosa* Harms.)

การเตรียมสารสกัดหยาบจากพืช บดตัวอย่างพืชอบแห้งให้ละเอียด ใส่ลงในขวดแก้วเติมเอทานอล 95 % ในอัตรา พืช : ตัวทำละลาย = 1 : 2 โดยปริมาตร นำไปเข้าเครื่องเขย่า (gyratory shaker)ที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน กรองเศษพืชออก นำส่วนที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยระบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รวบรวมสารสกัดหยาบและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อไป (ศศิธร, 2546)

การเตรียมอาหาร double layer nutrient agar (NGA) เทอาหาร NGA ลงในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 10 ml เป็นอาหารรองพื้น (basal

medium) ส่วนอาหารชั้นบน (top layer) เตรียมโดยนำ virulent colony ของเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว NGB อายุ 24 ชม. (O.D. λ_{590} = 0.2) เติมลงในอาหาร NGA ที่อุณหภูมิ 55°C ในอัตราเชื้อ 1 ml ต่ออาหาร 9 ml เททับลงบน basal medium รอให้อาหารแข็งตัวแล้วรีบนำไปใช้ทันที

การทดสอบโดยวิธี paper disc agar diffusion ใช้ไมโครปิเปตต์ ขนาด 10 μ หยดสารสกัดหยาบจากพืชแต่ละชนิด ความเข้มข้น 1,000 5,000 10,000 50,000 และ 100,000 ppm ลงบนแผ่นกระดาษกลม (paper disc) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำซ้ำ 2 ครั้ง รอให้แห้งหมาดๆ ก่อนย้ายมาวางบนอาหาร double layer NGA ตามตำแหน่งที่กำหนด โดยมีชุดควบคุม (control) ซึ่งหยดน้ำนึ่งแทนสารสกัดวางไว้ตรงกลาง ทำ 4 ซ้ำต่อ 1 ชนิดพืช บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. ตรวจและบันทึกผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) โดยใช้สูตรความกว้างของบริเวณยับยั้ง(ซม.)=(เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง – เส้นผ่านศูนย์กลางของกระดาษกรอง) /2

การทดลองที่ 3 การลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละในดินจำลองการติดเชื้อโดยใช้สารสกัดหยาบจากพืช

การเตรียมดินจำลองการติดเชื้อ เตรียมดินอบฆ่าเชื้อบรรจุในถุงพลาสติกขนาดใหญ่ นำ suspension เชื้อบริสุทธิ์ *P. carotovorum* sub sp. *carotovorum* อายุ 24 ชม. O.D. λ_{590} = 0.2 คลุกดินในอัตรา เชื้อ 500 ml ต่อดินอบฆ่าเชื้อ 5 kg เขย่าถุงเพื่อคลุกเคล้าให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการลดปริมาณเชื้อ นำสารสกัดหยาบจากพืช ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด 3 อันดับแรกซึ่งได้แก่ สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก เปลือกผลทับทิม และผลเบญกานี ความเข้มข้น 10,000 และ 20,000 ppm คลุกลงในดินที่คลุกเชื้อแล้ว ในอัตราสารสกัด 500 ml ต่อดินคลุกเชื้อ 5 kg ส่วนชุดควบคุม (Control) ใช้น้ำนึ่งแทนสารสกัด จากนั้นนำดินในแต่ละกรรมวิธีมาบรรจุลงในกระบะพลาสติก ย้ายผักกาดเขียวปลี อายุ 40 วัน ลงปลูกกระบะละ 10 ต้น สุ่มเก็บตัวอย่างดินทุก 5 วัน ตั้งแต่วันที่ 1 (เชื้อเริ่มต้น) ถึงวันที่ 30 รวม 7 ครั้ง นำตัวอย่างดินมาทำ soil serial dilution และ viable plate count บน Endo agar ตรวจนับโคโลนี หาค่าเฉลี่ยและคำนวณหาปริมาณเชื้อในดินแต่ละกรรมวิธี เปรียบเทียบกับชุดควบคุม(control)ซึ่งคลุกเชื้อแต่ไม่ได้คลุกสารสกัดจากพืช วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและประเมินความรุนแรงของโรคจากระดับ 0 ถึง 4 (ศศิธร, 2547)

การศึกษาวิธีการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดปริมาณเชื้อในดินและการเกิดโรค

นำสารสกัดจากพืชที่ให้ผลดีที่สุดในการลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคในดินจากการทดลองข้างต้น ซึ่งได้แก่ สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก ความเข้มข้น 20,000 ppm มาศึกษาความถี่ของการใช้ วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ นำดินที่คลุกเชื้อแล้ว มาคลุกและราดสารสกัดจากพืช โดยจัดเป็น 5 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 คลุกสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกลงดิน ครั้งเดียวก่อนย้ายปลูก

กรรมวิธีที่ 2 ราดสารสกัดซ้ำทุกๆ 10 วัน (รวม 3 ครั้ง)

กรรมวิธีที่ 3 ราดสารสกัดซ้ำทุกๆ 5 วัน (รวม 6 ครั้ง)

กรรมวิธีที่ 4 ราดสารสกัดซ้ำทุกๆ 3 วัน (รวม 10 ครั้ง)

ชุดควบคุม (control) ใช้น้ำแทนสารสกัดจากพืช

สุ่มดินมาตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทุกๆ 5 วัน ตั้งแต่วันที่ 1-30 โดยวิธี soil serial dilution และ viable plate count บน Endo agar คำนวณหาปริมาณเชื้อในดินแต่ละกรรมวิธี เปรียบเทียบกับ control สังเกตอาการของโรค บันทึกจำนวนต้นที่เป็นโรคและประเมินความรุนแรงของโรค

การทดลองที่ 4 การแยกส่วนของสารสกัดด้วย Quick Column Chromatography **และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ**

นำสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกมาแยกสกัดอย่างละเอียดโดยวิธี Quick Column Chromatography โดยนำ silica gel (Kieselgel 60 ขนาด 35-70 mesh ของบริษัท Merck, Germany) ผสมกับ chloroform คนไล่ฟองอากาศให้หมด จากนั้นเทลงในคอลัมน์ขนาด 2 x 30 cm โดยให้ silica gel มีน้ำหนักเป็น 25 เท่าของสารสกัดเริ่มต้น เติม chloroform ให้เต็มคอลัมน์ แล้วปล่อยให้ไหลออก จนเหลือ silica gel ประมาณ 1 cm เติมสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกลงไป ชะสารด้วย chloroform และmethanol ครั้งละ100ml ตามลำดับดังนี้ chloroform 100%, chloroform-methanol (9.5:0.5), chloroform-methanol (9 : 1), chloroform-methanol (8.5:1.5) และ methanol 100% ตามลำดับ เก็บสารที่ชะได้ส่วน (fraction) ละ 100 ml นำสารแต่ละ fraction ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ *P. carotovorum* sub sp. *carotovorum* โดยวิธี paper disc agar diffusion เลือก fraction ที่ให้ผลดีที่สุด มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel ผสมกับ chloroform บรรจุในคอลัมน์ขนาด 1x30 cm ให้ silica gel มีน้ำหนักเป็น 10 เท่าของสารสกัด เริ่มต้นชะด้วย chloroform-methanol (8.5 : 1.5) ครั้งละ 50 ml นำแต่ละ fraction มาทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยวิธีเดียวกันอีกครั้ง นำ fraction ที่ยับยั้งเชื้อได้ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Preparative Thin Layer Chromatography(PTLC) และนำไปวิเคราะห์โครงสร้างโดย nuclear magnetic resonance (NMR)

การทดลองที่5 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

นำสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ fraction FS2-5 มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค TLC plate โดยใช้ระบบ $CHCl_3$: MeOH (9:1) มีค่า Rf = 0.50 เตรียมสารบริสุทธิ์โนสารละลาย Acetone-d6 แล้วนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง 300 MHZ Nuclear Magnetic Resonance (NMR)ได้แก่ ^1H ที่ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผลและวิจารณ์

เชื้อบริสุทธิ์และทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ

จากการนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากผักที่เป็นโรคเน่าเละ มาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในผักทดลอง พบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถก่อให้เกิดอาการเน่าเละบนผักชนิดต่างๆได้ แต่มีพัฒนาอาการของโรคที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบอาการหลังจากบ่มเชื้อนาน 48 ชม. พบว่าเชื้อไอโซเลท ECC19 มีความรุนแรงมากที่สุด โดยทำให้พืชทดลองทั้ง 5 ชนิด แสดงอาการเน่าเละ มีเมือกเยิ้มแฉะ แผลขยายลุกลามอย่างรวดเร็ว และมีกลิ่นเฉพาะตัว จึงเลือกใช้เชื้อไอโซเลท ECC19 เป็นตัวแทนในการทดลอง เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edition พบว่าเป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อนสั้น แกรมลบ เซลล์ย้อมติดสีแดงของ safranin-O เมื่อทำปฏิกิริยากับ 3% KOH เกิดลักษณะเมือกเหนียวหนืดยืดเป็นสาย สร้างกรดจากน้ำตาล manitol, raffinose และ lactose แต่ไม่เกิด phosphatase activity ไม่ใช้น้ำตาล sucrose ไม่สร้าง indole ซึ่งตรงตามคุณสมบัติของเชื้อ *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* (*Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora*) (Holt *et al*., 1994)

Table 1 Morphological and biochemical characteristics of ECC19 compared to *E. carotovora.*

Characteristic	*E. carotovora*	
	ECC19	*E. carotovora*[1/]
Gram stain reaction	Gram negative	Gram negative
Oxygen relationship	+	+
Shape	short rod	short rod
KOH test	+	+
Acid produced from :		
sorbitol	-	-
manitol	+	+
sucrose	-	-
raffinose	+	+
arabitol	-	-
lactose	+	+

[1/] Cited in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition

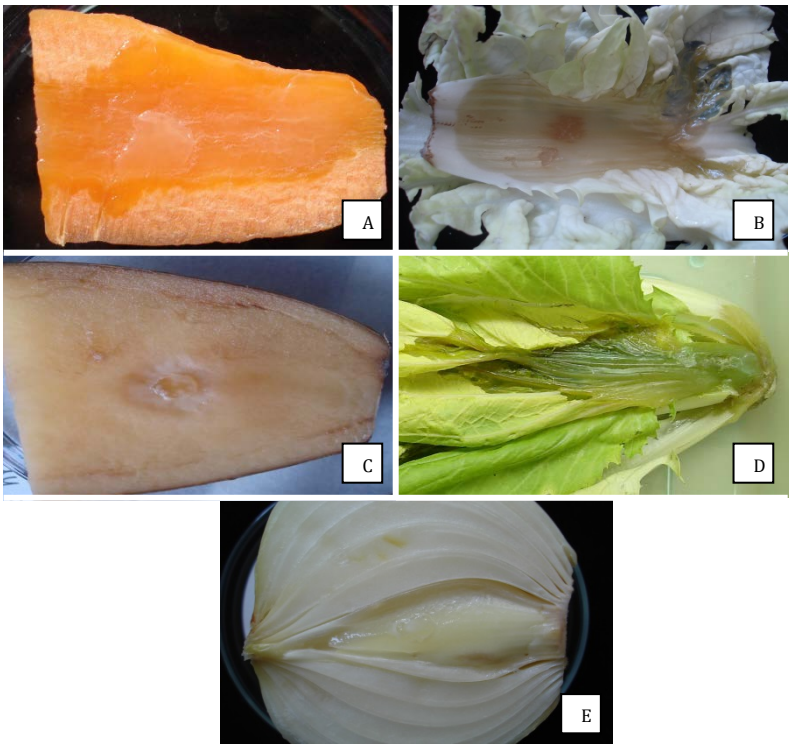

Figure 1 Soft rot symptom in various test plants after 48 hours inoculation with *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum,* isolates ECC19 showing watery decay, enlarge rapidly and has putrid odor.

A. Carrot B. Cabbage C. Potato D. Chinese-cabbage E. Onion

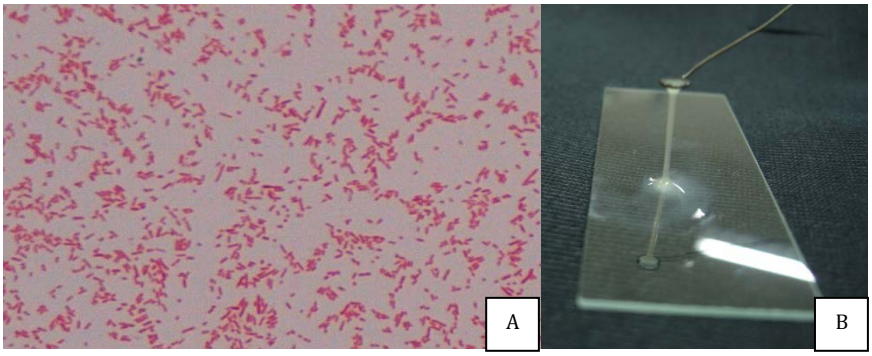

Figure 2 *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* (ECC19) was tested by Gram stain and 3% KOH.

A. The Gram stain showed Gram negative, rod-shaped bacteria stained with safranin-O.

B. 3% KOH solution test showed vidcid slime.

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชในการยับยั้งเชื้อโดยวิธี paper disc agar diffusion

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากพืช 20 ชนิด ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยวิธี paper disc agar diffusion พบสารสกัดจากพืช 8 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ ได้แก่ ผลกานพลู ผลเบญกานี ผลสมอพิเภก ผลสมอไทย เปลือกผลทับทิม เปลือกผลมังคุด ใบพลู และใบฝรั่ง โดย 3 ลำดับแรกที่ให้ผลดีที่สุดได้แก่ สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก เปลือกผลทับทิม และผลเบญกานี ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งที่ 1,000 ppm ขนาด 0.41 ,0.33 และ 0.25 cm ตามลำดับ (Figure 3) สอดคล้องกับรายงานของศศิธรและสุพจน์ (2548) พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกผลทับทิมและผลสมอพิเภกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ได้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1,000 ppm ขึ้นไป

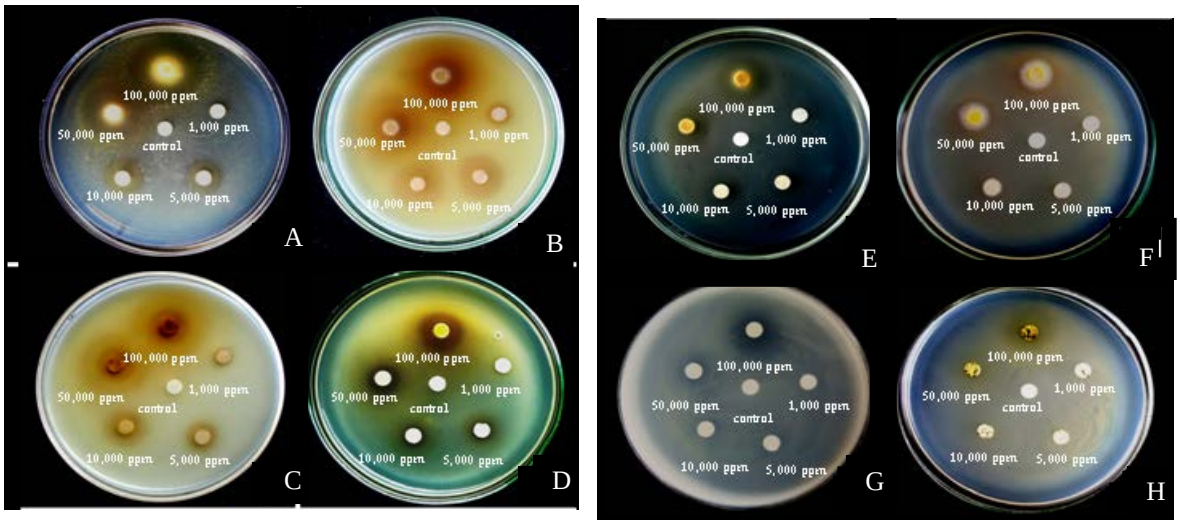

Figure 3 Inhibition zone produced by plant crude extracts of 1,000 5,000 10,000 50,000 and 100,000 ppm against *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* by paper disc agar diffusion on double layer NGA.

A. Pomegranate B. Nut Gall C. Clove D. Chebulic myrobalan

E. Beleric myrobalan F. Mangosteen G. Betal pepper H. Guava

การทดลองที่ 3 การลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละในดินจำลองการติดเชื้อโดยใช้สารสกัดหยาบจากพืช

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการลดปริมาณเชื้อ จากการนำสารสกัด 3 อับดับแรกที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลองที่ 1 ได้แก่ สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก เปลือกผลทับทิม และผลเบญกานี ความเข้มข้น 10,000 และ 20,000 ppm คลุกในดินจำลองการติดเชื้อ สุ่มตรวจนับปริมาณของเชื้อทุก 5 วันตั้งแต่วันที่ 1(เริ่มต้น) ถึงวันที่ 30 รวม 7 ครั้ง พบว่าสารสกัดจากผลสมอพิเภก 20,000 ppm สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในดินได้ดีที่สุด โดยปริมาณของเชื้อในดินวันที่ 30 ของกรรมวิธีนี้ลดลงเหลือ 2.50 x 10^5 cfu/g และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำสุด 17.5 % เมื่อเทียบกับ control ในช่วงเวลาเดียวกันปริมาณเชื้อยังคงอยู่ที่ 9.87 x 10^5 cfu/g และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงสุด 97.5 % กรรมวิธีที่ให้ผลดีรองลงมาได้แก่กรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกและผลเบญกานี 10,000 ppm ปริมาณเชื้อในวันที่ 30 ใกล้เคียงกันอยู่ที่ 3.82 x 10^5 cfu/g และ 3.80 x 10^5 cfu/g มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 32.5 %และ 37.5 % ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในดินของทุกกรรมวิธียังคงอยู่ในระดับสูงพอที่จะทำให้ผักกาดเขียวปลีแสดงอาการโรคเน่าเละได้ (Table 2)

Table 2 Bacterial population in the treated soil with plant crude extracts at 5-day interval for 30 days after treatment and percent of diseased plants.

Plant Crude Extract	ppm	Population of *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* (cfu/g)							% Disease
		Day 1	Day 5	Day 10	Day 15	Day 20	Day 25	Day 30	
Pomegranate	10,000	3.20x10^7u[1/]	6.02x10^5c-h	4.40x10^5a-f	9.20x10^5i-l	6.60x10^5d-i	3.25x10^5abc	5.65x10^5b-g	65.0
	20,000	3.20x10^7u	6.50x10^5d-h	1.29x10^6nop	1.75x10^6qr	6.80x10^5f-j	3.10x10^5ab	7.72x10^5g-k	82.5
Nut gall	10,000	3.20x10^7u	1.96x10^6rs	1.05x10^6k-n	9.40x10^5jkl	9.00x10^5i-l	4.70x10^5a-f	3.80x10^5a-e	37.5
	20,000	3.20x10^7u	1.60x10^6pq	2.03x10^6s	2.09x10^6s	5.40x10^5b-g	5.37x10^5b-g	6.72x10^5f-j	70.0
Beleric myrobalan	10,000	3.20x10^7u	1.62x10^6q	3.20x10^6t	1.61x10^6q	8.60x10^5h-l	2.30x10^5a	3.82x10^5a-d	32.5
	20,000	3.20x10^7u	2.11x10^6s	1.07x10^6k-m	6.60x10^5e-j	1.06x10^6lmn	2.20x10^5a	2.50x10^5a	17.5
Control	0	3.20x10^7u	3.01x10^6t	1.22x10^6mn	1.52x10^6opq	1.12x10^6lmn	1.26x10^6mno	9.87x10^5klm	97.5

[1] Means within a column followed by the same letter are not significantly different according to LSD Test (P=0.05)

การศึกษาวิธีการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดปริมาณเชื้อในดินและการเกิดโรค จากการนำสารสกัดหยาบจากสมอพิเภกความเข้มข้น 20,000 ppm ซึ่งให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P.carotovorum* sub sp.*carotovorum* ในดินติดเชื้อจากการทดลองข้างต้น มาศึกษาความถี่ของการใช้เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด โดยจัดเป็น 5 กรรมวิธี ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดิน เพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในดินทุกๆ 5 วัน ตั้งแต่วันที่ 1

(เชื้อเริ่มต้น) ถึงวันที่ 30 โดยการนำตัวอย่างดินมาทำ soil serial dilution และ viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Endo agar คำนวณหาปริมาณเชื้อในดินแต่ละกรรมวิธี เปรียบเทียบกับcontrol พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถลดปริมาณเชื้อในดินลงได้ โดยทำให้ปริมาณเชื้อในดินแต่ละสัปดาห์ลดลงต่ำกว่า control และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่า control ที่ไม่ได้คลุกสารสกัด กรรมวิธีที่ 2 ที่คลุกสารสกัดทุกๆ 10 วัน รวม 3 ครั้ง ปริมาณเชื้อในวันที่ 30 ลดลงเหลือ $5.55x10^6$cfu/g ในขณะที่ control ในช่วงเวลาเดียวกันยังคงสูงอยู่ที่$1.96x10^7$ cfu/g และในด้านการเกิดโรค กรรมวิธีที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุด 17.50% ในขณะที่ control เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงที่สุด 82.50% (Table 3) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของศศิธร (2546) ศึกษาการจัดการดินเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดเขียวปลีในสภาพโรงเรือน โดยใช้น้ำสกัดหยาบและกากของพืช 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกทับทิม ใบพลู เปลือกส้มเขียวหวาน ต้นลูกใต้ใบและเปลือกผลมังคุด คลุกลงในดินพบว่าทุกกรรมวิธีสามารถลดปริมาณเชื้อในดินลงได้ โดยทำให้ปริมาณเชื้อในดินในแต่ละสัปดาห์ลดลงในอัตราที่สูงกว่า control ในสัปดาห์ที่ 5 ปริมาณเชื้อในดินทุกกรรมวิธีที่คลุกด้วยน้ำสกัดหยาบและกากของพืช ลดลงเหลือ 0.23 - $0.47x10^3$ cfu/g ในขณะที่ปริมาณเชื้อในดินที่เป็น control ยังคงอยู่ที่ $0.15x10^4$ cfu/g

จะเห็นได้ว่าการใช้สารสกัดหยาบจากพืชคลุกหรือราดดินในแปลงที่เคยมีโรคระบาดมาก่อนสามารถลดปริมาณประชากรของเชื้อแบคทีเรียลงลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและลดความรุนแรงของโรคในพืชที่ปลูกรุ่นใหม่ได้ ถ้ามีการศึกษาเพิ่มเติมถึงวิธีการนำไปใช้ในสภาพแปลงให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดหรือใช้ร่วมกับวิธีการอื่นเช่น การกำจัดเศษซากพืชที่เป็นโรค การไถพลิกกลับดินตากแดด การปลูกพืชหมุนเวียน จะเกิดประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรและผู้บริโภค และเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีที่เป็นพิษและลดต้นทุนการผลิตลงได้

Table 3 Bacterial population in the treated soil with beleric myrobalan crude extract of 20,000 ppm in various application times compared with control and percent of diseased plant.

Beleric Myrobalan 20,000 ppm	Population of *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* (cfu /g)							% Disease
	Day 1	Day 5	Day 10	Day 15	Day 20	Day 25	Day 30	
T1 (1 time)	$3.20x10^7$ o[1/]	$4.25x10^6$ abc	$4.00x10^6$ abc	$4.27x10^6$ abc	$4.22x10^6$ a-d	$4.25x10^6$ abc	$1.11x10^6$ ij	22.00
T2 (3 times)	$3.20x10^7$ o	$6.47x10^6$ d-g	$6.47x10^6$ d-g	$3.87x10^6$ abc	$4.95x10^6$ a-e	$8.27x10^6$ hg	$5.55x10^6$ b-f	17.50
T3 (6 times)	$3.20x10^7$ o	$5.67x10^6$ c-f	$1.33x10^7$ jk	$3.45x10^6$ ab	$4.60x10^6$ a-d	$7.30x10^6$ fg	$7.57x10^6$ fg	37.50
T4 (10 times)	$3.20x10^7$ o	$6.87x10^6$ c-f	$7.25x10^6$ fg	$3.45x10^6$ abc	$3.32x10^6$ a	$4.90x10^6$ a-e	$6.80x10^6$ efg	40.00
Control	$3.20x10^7$ o	$10.22x10^6$ efg	$1.66x10^7$ m	$1.59x10^7$ ml	$1.41x10^7$ lk	$1.78x10^7$ m-n	$1.96x10^7$ n	82.50

[1] Means within a column followed by the same letter are not significantly different according to LSD Test (P=0.05)

การทดลองที่ 4 การแยกส่วนของสารสกัดด้วย Quick Column Chromatography **และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ**

จากการนำสารสกัดหยาบของผลสมอพิเภกไปแยกส่วนด้วย Quick Column Chromatography ได้สาร 33 fraction (Figure 4) นำสารแต่ละ fraction ไปตรวจสอบด้วย TLC แล้วรวม fraction ที่คล้ายกันจัดใหม่เป็น 5 fraction นำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อ โดยวิธี paper disc agar diffusion อีกครั้ง พบว่า fraction ที่ FS2 (F11-F16) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยเกิดบริเวณยับยั้งกว้าง 0.85 cm รองลงมาได้แก่ FS3 (F17-F20) และ FS4 (F21-F25) เกิดบริเวณยับยั้ง 0.75 และ 0.32 cm ตามลำดับ ส่วน FS1 (F1-F10) และ FS5(F26-F33) ไม่สามารถก่อให้เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อ (Table 4)

Table 4 Quantity and characteristic of beleric myrobalan fine extract after the Quick Colum Chromatography and average sizes of their inhibition zone.

Fraction	Quantity(mg)	characteristic	average sizes of inhibition zones (cm)
FS1 (F1-F10)	957	Dark green sediment	0.00 d[1/]
FS2 (F11-F16)	1,145	Brown sediment	0.85 a
FS3 (F17-F20)	2,413	Dark brown sediment	0.75 b
FS4 (F21-F25)	825	Green - brown sediment	0.32 c
FS5 (F26-F33)	264	Yellow - brown sediment	0.00 d

[1]Means within a column followed by the same letter are not significantly different according to LSD Test (P=0.05).

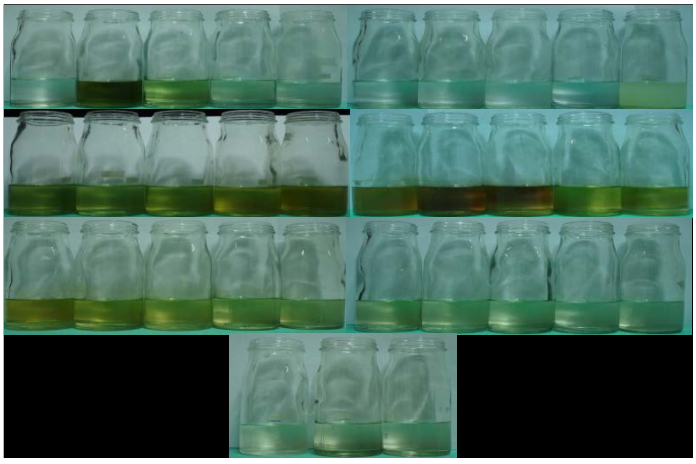

Figure 4 Physical characteristic of 33 fractions (F1 - F33) extracted by Quick column chromatography

จากการนำสารสกัดหยาบ FS2 (F11-F16) มาแยกด้วย Quick Column Chromatography ที่ทำการชะด้วยตัวทำละลายเรียงลำดับจาก hexane, chloroform, methanol และน้ำ ซ้ำอีกครั้ง เก็บสารที่ได้ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 20 ml ได้สาร 15 fraction ตั้งแต่ FS2-1 ถึง FS2-15 (Figure 5) นำสารแต่ละfraction มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. carotovorum sub sp. carotovorum* โดยวิธี paper disc agar diffusion พบว่าสาร FS2-

5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด (Table 5)

Table 5 Quantity and characteristic of beleric myrobalan fruit extract fraction FS2-1 to FS2-15 and average sizes of their inhibition zones.

Fraction	Characteristic	average sizes of inhibition zone (cm)
FS2-1	Hyaline	0.00 f[1/]
FS2-2	Hyaline	0.00 f
FS2-3	Green- yellow turbid	0.21 e
FS2-4	Green- yellow clear	0.49 c
FS2-5	Yellow clear	0.85 a
FS2-6	Pale yellow clear	0.62 b
FS2-7	Pale yellow clear	0.25 d
FS2-8	Hyaline	0.03 f
FS2-9	Hyaline	0.03 f
FS2-10 to FS2-15	Hyaline	0.00 f

[1]Means within a column followed by the same letter are not significantly different according to LSD Test (P=0.05).

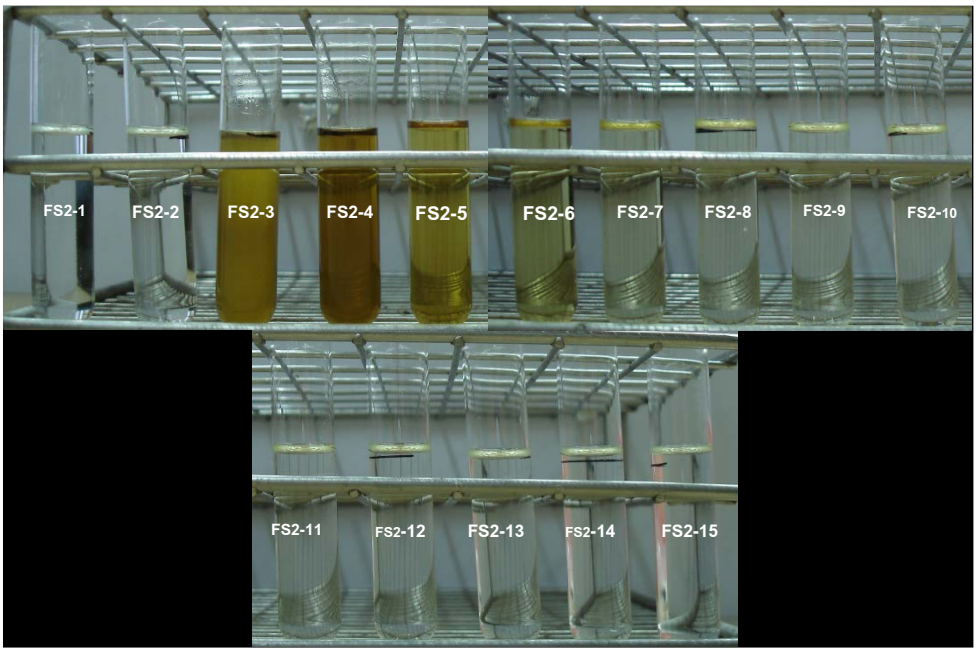

Figure 5 Physical characteristic of 15 fractions (FS2-1 to FS2-15) extracted by Quick column chromatography of beleric myrobalan fruit extract.

การทดลองที่ 5 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

การศึกษาชนิดของสารบริสุทธิ์ (สารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย isolate ECC19) โดยการนำสาร FS2-5 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยเครื่อง 300 MHZ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) เพื่อตรวจวัด ^{1}H ผลของการวิเคราะห์โครงสร้างสาร ดังแสดงในภาพที่ 7B โดยพบสัญญาณ 1H NMR ที่ 2.5 ppm ซึ่งแสดงลักษณะของ hydroxyl protons ; 3.7 ppm แสดงลักษณะของ methoxy protons และ 7.0 ppm แสดงลักษณะของ aromatic protons จากองค์ประกอบของโปรตีนที่ได้ สรุปได้ว่าสาร FS2-5 ที่แยกได้จากผลสมอพิเภกและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ มีลักษณะสัญญาณคล้ายสาร methyl gallate (Kane,1988) (Figure 6) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chung และคณะ (1998) พบว่า tannic acid, proply gallate และ methyl gallate ที่ความเข้มข้น 100 – 1,000 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ได้ถึง 8 ชนิด และรายงานของ Choi และคณะ (2009) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสาร methyl gallate ที่สกัดได้จากต้น Galla (*Galla rhois)* พบว่า methyl gallate ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 250 ppm ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae, Salmonella minesota* และ *Escherichia coli* ได้

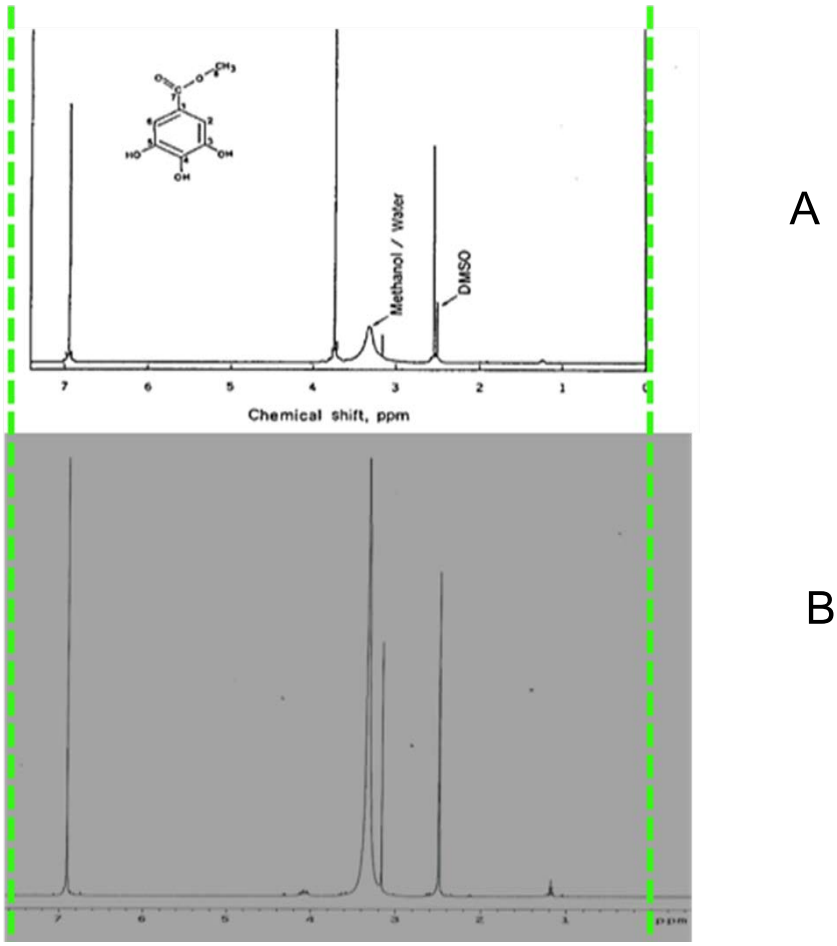

Figure 6 Comparison of ^{1}H NMR signal of FS2-5 extracted and purified from beleric myrobalan fruit with that of methyl gallate

A. Signal of ^{1}H NMR from methyl gallate (Kane,1988)

B. Signal of ^{1}H NMR from FS2-5 purified from beleric myrobalan fruit extract

สรุป

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียที่แยกได้จากผักที่เป็นโรคเน่าเละ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทสามารถก่อให้เกิดโรคบนพืชทดลองได้ โดยเชื้อไอโซเลท ECC19 ก่อให้เกิดอาการของโรครุนแรงมากที่สุด เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐาน สรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ เปรียบเทียบกับข้อมูลใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition (Holt *et al.*, 1994) พบว่าคุณสมบัติของเชื้อไอโซเลท ECC19 สอดคล้องกับคุณสมบัติของเชื้อ *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum* (*Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora*) จึงใช้เชื้อไอโซเลทนี้เป็นตัวแทนในการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยวิธี paper disc agar diffusion พบสารสกัดจากพืช 8 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ได้แก่ สารสกัดหยาบจากผลกานพลู ผลเบญกานี ผลสมอพิเภก ผลสมอไทย เปลือกผลทับทิม เปลือกผลมังคุด ใบพลู และใบฝรั่ง สารสกัดหยาบที่ให้ผลยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก เปลือกผลทับทิม และผล

เบญกานี ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งที่ความเข้มข้น 1,000 ppm เท่ากับ 0.41, 0.33 และ 0.25 cm ตามลำดับ

การนำสารสกัดหยาบจากพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ ความเข้มข้น 10,000 และ 20,000 ppm มาคลุกลงในดินจำลองการติดเชื้อ ในอัตราสารสกัด 500 ml ต่อดินคลุกเชื้อ 5 kg จากนั้นย้ายผักกาดเขียวปลีอายุ 40 วันลงปลูก สุ่มเก็บดินเพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อทุก 5 วันเป็นเวลา 30 วันโดยวิธี soil serial dilution และ viable plate count บนอาหาร Endo agar พบว่าสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก 20,000 ppm สามารถลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคในดินได้ดีที่สุด โดยปริมาณเชื้อลดลงจาก 3.20 x10^7 cfu/g ในวันแรก เหลือ 2.50x10^5 cfu/gในวันที่ 30 เมื่อเทียบกับ control ในช่วงเวลาเดียวกัน ปริมาณเชื้อในวันที่ 30 ยังคงอยู่ที่ 9.87 x10^5 cfu/g

การนำสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกมาศึกษาวิธีการใช้เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด พบว่าการใช้สารสกัดจากผลสมอพิเภก 20,000 ppm ราดลงดิน ทุกๆ 10 วัน 3 ครั้งติดต่อกัน มีผลทำให้ปริมาณเชื้อลดลงจาก 3.20 x10^7 cfu/g ในวันแรก เหลือ 5.55 x10^6 cfu/gในวันที่ 30 และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำ 17.50 % เมื่อเปรียบเทียบกับ control ปริมาณเชื้อในวันที่ 30 ยังคงสูง 1.96 x10^7 cfu/g และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูง 82.50%

การนำสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกซึ่งให้ผลดีที่สุด มาแยกสารออกฤทธิ์โดยวิธี Quick Column Chromatography ได้สาร 5 fraction นำแต่ละ fraction มาทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยวิธี paper disc agar diffusion พบว่าสารสกัด fraction FS2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด ขนาดของบริเวณยับยั้ง 0.85 cm จึงนำสารสกัด FS2 มาแยกด้วย Quick Column Chromatography อีกครั้ง ได้สาร 15 fraction นำแต่ละ fraction ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยวิธีการเดียวกัน พบสาร fraction FS2-5 ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด นำสาร FS2-5 มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย Preparative Thin Layer Chromatographyได้สาร 1 แถบ TLC plate sheet มีค่า R_f= 0.50 ลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองใส เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างโดย Nuclear Magnetic Resonance (NMR) พบว่าสเปกตรัมของ ^{1}H NMR แสดงสัญญาณ 2.5 ppm ซึ่งแสดงลักษณะของ hydroxyl protons ; 3.7 ppm แสดงลักษณะของ methoxy protons และ 7.0 ppm แสดงลักษณะของ aromatic protons จากองค์ประกอบของโปรตีนที่ได้ สรุปได้ว่าสาร FS2-5 ที่แยกได้จากผลสมอพิเภกและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ มีลักษณะสัญญาณคล้ายสาร methyl gallate

เอกสารอ้างอิง

ชนิดา แสนโคตร. 2553. การศึกษากลุ่มสารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ*Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของขิง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2545. โรคของผักและการควบคุมโรค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 173 น.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2546. การจัดการดินโดยใช้น้ำสกัดหยาบและกากของพืชเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดเขียวปลี. วิทยาสารกำแพงแสน 1 (1):10 -18.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2547. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *Erwinia*

carotovora subsp. *carotovora* เชื้อสาเหตุโรคเน่าเละของผัก. วิทยาสารกำแพงแสน 2 (2):72-81.

ศศิธร วุฒิวณิชย์ และ สุพจน์ ศุภนันธร. 2548. การสกัดและการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. วิทยาสารกำแพงแสน 3(2):11-26.

ศศิธร วุฒิวณิชย์ และ สุพจน์ ศุภนันธร. 2549. การแยกส่วนสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมและผลสมอพิเภกและทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ.วิทยาสารกำแพงแสน 4(1):15-26.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์.2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด.ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Chung K.-T., Z. Lu and M.W. Chou. 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. Food and Chemical Toxicology, 36(12), 1053-1060.

Kane, Cynthia J. M., Jay H. Menna and Yun-Chi Yen. 1988. Methyl Gallate, methyl-3,4,5-trihydroxy-benzoate, is a potent and highly specific inhibitor of Herpes simplex virus in vitro. I. Purification and characterization of methyl gallate from *Sapium sebiferum*. Bioscience Report. Vol. 8, No. 1, 1998.

Holt, J. G., N.R. Krieg, P. H. A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. The Williams and Wilkins Co.,Baltimore. 787 pp.

Choi, Jang -Gi, Ok-Hwa Kang, Young-Seob Lee, You-Chang Oh, Hee-Sung Chae, Hye-Jin Jang, Dong-Won Shin and Dong-Yeul Kwon. 2009. Antibacterial activity of methyl gallate isolated from *Galla rhois* or carvacrol combined with nalidixic acid against nalidixic acid resistant bacteria. Molecules, 14(5), 1773-1780.

Received 22 August 2013

Accepted 14 January 2014