

ภาพรวมงานวิจัยจุลินทรีย์ในชุดโครงการทองผาภูมิตะวันตก

วันเชษฐ โปธาเจริญ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี

wanchern@biotec.or.th

Abstract: Microbial Research in Western Thong Pha Phum Project (Wanchern Potacharoen National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Thailand) Western Thong Pha Phum is one of the area-based research program of Biodiversity Research and Training (BRT) starting in 2001. The microbial research in this area includes 1) the study of microbial diversity focusing on acetic acid bacteria 2) the utilization microbial resources as biocontrol focusing on insect pathogenic fungi and 3) local knowledge and bioresource management using termite mushroom as a tool for investigation. The research team on acetic acid bacteria reported that 139 isolates from this area can be grouped into 3 genera and 4 species. At least 7 isolates are expected to be new species. The fungal research showed interesting results that total isolates of fungi (114 isolates) from infected mites were identified as *Hirsutella thompsonii* Fisher. The crude filtrate of most isolates contained toxic metabolites which inducing abnormal development of cutworm larvae (*Spodoptera litura*). Some isolates caused mortality in the larval stage, incomplete pupation, incomplete adult emergence and abnormal adults. These isolates of bacteria and fungi were preserved at BIOTEC Culture Collection for further investigation. The use of termite mushroom (*Termitomyces*) as a tool for investigation of the local knowledge and bioresources management revealed that this mushroom has the economic important to the local people in this area. The net value of the utilization of this mushroom yields almost 700 thousand Baht during March to May. The collecting of this mushroom must be carefully done by hand not by any sharpening tools which would affect the future appearance of *Termitomyces*. The village representatives for data collection include Thai, Karen, and Burmese.

Key words: acetic acid bacteria, insect pathogenic fungi, bioresources utilization

บทนำ

ในต้นปี พ.ศ. 2544 โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) ได้ริเริ่มให้การสนับสนุนงานวิจัยเชิงพื้นที่ และได้มุ่งเป้าไปที่อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี โดยร่วมกับบริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) ให้ชื่อว่า ชุดโครงการทองผาภูมิตะวันตก (area-based research)

ภายใต้ชุดโครงการมีงานวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ 3 โครงการ คือ (1) งานวิจัยความหลากหลายของแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู (2) งานวิจัยการใช้ประโยชน์จากเชื้อราในการควบคุมแมลงศัตรูพืช และ (3) งานวิจัยสังคมภูมิปัญญา โดยใช้เห็ดโคน (รา) เป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์ความรู้และภูมิปัญญาของชุมชนเผ่าต่างๆ ในพื้นที่ ซึ่งจะนำผลการศึกษาจากทั้ง 3 โครงการมาสรุปเพื่อรวบรวมเป็นองค์ความรู้ที่สามารถ

นำไปศึกษาต่อยอด หรือการพัฒนาสู่ธุรกิจอุตสาหกรรมต่อไป

งานวิจัยด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์

โครงการศึกษาความหลากหลายของ “แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู” (Acetic acid bacteria) ในประเทศไทย โดยเฉพาะในพื้นที่อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ โดยวันเชษฐ โปธาเจริญ และคณะ (2546)

แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ประโยชน์ที่ชัดเจนของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือเป็นผู้ผลิตน้ำส้มสายชูที่ใช้ในการปรุงอาหารในครัวเรือน ใช้ในการถนอมอาหาร ใช้เป็นส่วนผสมของยารักษาโรค นอกจากนี้ยังใช้ทำเครื่องดื่มสุขภาพที่ครั้งหนึ่งเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายที่เรียกว่า “เห็ดรสเชี่ย” ซึ่งมีจุลินทรีย์ 2 ชนิดอยู่ร่วมกันคือ ยีสต์และแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู มีรายงานว่าเครื่องดื่มสุขภาพนี้มี

ประโยชน์ต่อร่างกาย ช่วยล้างสารพิษในตับ ทำให้ร่างกายแข็งแรง มีกำลังวังชามากขึ้น และช่วยกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันโรค

นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่มนี้ยังมีความสำคัญในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพอีกหลายด้าน เช่น การผลิตเซลล์โลส ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางเภสัชกรรมหลายชนิด ในขณะที่เดียวกันแบคทีเรียกลุ่มนี้ก่อให้เกิดความเสียหายได้เช่นกัน เช่น ทำให้เป็ียร์ หรือไวน์ มีรสเปรี้ยว ทำให้ผลไม้เน่าเสีย เป็นต้น

แบคทีเรียกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นท่อนขนาดเล็ก เจลียความยาว x ความกว้าง ประมาณ 0.6×2.5 ไมครอน (1 ไมครอน = $1/10^6$ เมตร) เมื่อย้อมสีจะติดสีแดง พบทั่วไปในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เป็ียร์ น้ำส้มสายชู ผลไม้ ดอกไม้ ความสนใจศึกษาแบคทีเรียกลุ่มนี้เริ่มมีในต้นปี 2523 โดยมุ่งด้านการจัดจำแนกเป็นส่วนใหญ่ มีการรวบรวมข้อมูลด้านรูปร่างลักษณะคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อประกอบเป็นคู่มือการจำแนก (Gillis and De Ley, 1980; Yamada and Kondo, 1984) ต่อมาผู้ศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของแบคทีเรียกลุ่มนี้ และพบโคเอนไซม์ คิว (Coenzyme Q) หลายชนิด ที่สำคัญคือ Q-9 และ Q-10 จึงได้ทำเป็นคู่มือการจำแนกร่วมกับลักษณะทางชีวเคมี (Yamada and Kondo, 1984) ปัจจุบันได้นำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียซึ่งให้ผลรวดเร็วและแม่นยำขึ้น เทคนิคเฉพาะที่นำมาใช้ คือ 16S rRNA/rDNA sequences (Yamada et al., 1997) ขณะรายงานมีผู้จำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ 10 สกุล และ 42 สปีชีส์

โครงการฯ มีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมและเก็บรักษาแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในประเทศไทย และเพื่อพัฒนานักจัดจำแนกแบคทีเรียของไทย

ลักษณะงานวิจัย เริ่มจากการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ซึ่งส่วนมากจะเป็นดอกไม้ ผลไม้ ดิน และวัสดุอื่น ๆ เช่น เห็ด น้ำเสีย เป็นต้น การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายจะใช้อาหารสูตรเฉพาะที่ประกอบด้วยน้ำตาลและแอลกอฮอล์ ปรับความเป็นกรดต่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในระดับ 3.5 เลือกแบคทีเรียเป้าหมายมาจำแนกซึ่งการจำแนกในขั้นตอนแรกจะใช้เทคนิคทางโมเลกุลคือการหาลำดับ DNA เพื่อจัดกลุ่มและจำแนก พบว่าจำนวนแบคทีเรียจากอำเภอทองผาภูมิ

มี 139 ไอโซเลท (จากทั้งหมดกว่า 300 ไอโซเลท) จัดกลุ่มได้ 3 สกุล 4 ชนิด และคาดว่าในจำนวนนี้จะมีสกุลใหม่ และชนิดใหม่ของโลกด้วยซึ่งต้องใช้เวลาในการพิสูจน์ต่อไป

องค์ความรู้ที่ได้จากผลงานโครงการฯ

1) สามารถคัดแยกแบคทีเรียในทองผาภูมิได้ 139 ไอโซเลท จัดกลุ่มได้เป็น 3 สกุล คือ *Acetobacter*, *Asaia* และ *Gluconobacter* และ 4 ชนิด คือ *Acetobacter lovaniensis*, *Asaia krungthepensis*, *Gluconobacter frataurii* และ *Gluconobacter oxydans* ยังมีแบคทีเรียที่ยังมิได้จำแนกถึงระดับสปีชีส์อีก 135 ไอโซเลท คือ *Acetobacter* sp. (13 ไอโซเลท) *Asaia* sp. (71 ไอโซเลท) และ *Gluconobacter* sp. (51 ไอโซเลท) ซึ่งคาดว่าจะมีชนิดใหม่ด้วย เพราะจากการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบัน พบว่ายังไม่สามารถจำแนกได้ถึงระดับชนิด แสดงว่ายังไม่มีรายงานชนิดใหม่นอกจากที่รายงานไปแล้ว ดังนั้นจึงต้องศึกษาต่อไป ถึงแม้โครงการจะสิ้นสุดแล้ว

2) แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู มีการเก็บรักษาไว้ที่ BIOTEC Culture Collection (BCC) จำนวน 450 สายพันธุ์ ซึ่งรวมสายพันธุ์ต้นแบบที่นำเข้ามาจากต่างประเทศเพื่อใช้ในงานจัดจำแนกด้วย

3) ได้พัฒนานักจัดจำแนกแบคทีเรีย 1 คน ที่เชี่ยวชาญและสามารถให้บริการจำแนกแบคทีเรียด้วยเทคนิคที่ทันสมัย รวดเร็ว และแม่นยำ

4) มีเครือข่ายความร่วมมือด้านการศึกษาแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูในประเทศไทย ระหว่างไบโอเทคและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และต่างประเทศ ระหว่างไบโอเทค (BCC) และสถาบันเก็บรักษาทรัพยากรชีวภาพ ประเทศญี่ปุ่น (NITE Biological Resources Center)

งานวิจัยด้านการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์

โครงการศึกษาเชื้อราทำลายศัตรูพืช โดยศาสตราจารย์ ดร. อังศุมาลย์ จันทราปัติย์ จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ชื่อ โครงการ “*Hirsutella thompsonii* Fisher จากป่าเขตอำเภอทองผาภูมิ และผลของสารเมตาโบไลต์ของเชื้อราที่มีต่อหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius)” (2007)

จากข้อมูลที่มีผู้ศึกษามาก่อนพบว่าสารเมตา

โบลท์ที่สร้างขึ้นมีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งการเจริญของแมลง ซึ่งเป็นที่มาของการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีในการสำรวจพื้นที่ทองผาภูมิ พบว่าพืชหลายชนิดมีไรลงทำลาย และพบซากไรถูกทำลายอีกต่อหนึ่ง เชื่อร่านี้คือ *Hirsutella thompsonii* ซึ่งเป็นศัตรูธรรมชาติที่สำคัญของไรศัตรูพืชหลายชนิด ราชชนิดนี้มีสารพิษที่ทำให้แมลงและไรเจริญเติบโตผิดปกติ ปัจจุบันการใช้สารเคมีในพืชผักกำลังถูกต่อต้านจากผู้บริโภค ดังนั้นการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีจึงได้รับความสนใจนำมาใช้กำจัดศัตรูพืช

วัตถุประสงค์ของโครงการคือ 1) เพื่อเก็บรวบรวมเชื้อร่าที่ทำลายไรศัตรูพืชตามหมู่บ้านต่างๆ และพื้นที่ป่าในเขตอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี 2) เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต สันฐานวิทยาของเชื้อร่า และ 3) เพื่อศึกษาผลของสารเมตาโบลท์ของเชื้อร่าที่มีต่อหนอนกระทู้ผัก เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกเชื้อร่าสำหรับพัฒนาเป็นสารกำจัดศัตรูพืชต่อไปในอนาคต

ลักษณะงานวิจัย กำหนดการเดินทางเข้าพื้นที่ เก็บตัวอย่างเชื้อร่าที่ทำลายไรศัตรูพืชในอำเภอทองผาภูมิ เดือนละ 1 ครั้ง ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2544 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2545 โดยแบ่งพื้นที่สำรวจออกเป็นเขตป่าบริเวณภูเขา หมู่บ้านที่อยู่ติดภูเขา และเขตที่อยู่อาศัยในหมู่บ้านต่างๆ นำโรมาตรวจหาเชื้อร่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และแยกเชื้อร่าสาเหตุที่ทำให้ไรตายในห้องปฏิบัติการ และเก็บไว้เพื่อใช้ศึกษาต่อไป การศึกษาขั้นต่อมาคือดูลักษณะโครงสร้างของเชื้อร่าทั้งเส้นใยและโคนเดี่ยว และผลของสารเมตาโบลท์ที่สร้างขึ้นต่อหนอนกระทู้ผัก

องค์ความรู้ที่ได้จากผลงานโครงการ

1) ตัวอย่างไรศัตรูพืชที่ถูกทำลายประกอบด้วย ไรสีขา (209 ตัวอย่าง) และไรแมงมุม (5 ตัวอย่าง) พบว่าไรสีขาถูกทำลายมากกว่าไรแมงมุม สันนิษฐานว่ามาจากโครงสร้างทางร่างกายของไรทั้ง 2 ชนิด ซึ่งโครงสร้างของไรสีขาจะมีโอกาสสัมผัสกับโคนเดี่ยวของรามากกว่าไรแมงมุม

2) พบไรถูกทำลายมากที่สุดในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนมีนาคม

3) แยกร่าที่ทำลายไรได้ 114 ไอโซเลท จำแนกเป็น *Hirsutella thompsonii* Fisher ชนิดเดียวกัน

4) โคนเดี่ยวของร่าเป็นส่วนสำคัญในการทำลายไร เชื่อร่าที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็วและมีแนวโน้มที่จะสร้างโคนเดี่ยวได้มาก จะถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการก่อโรคกับไรศัตรูพืช

5) สารเมตาโบลท์ที่เชื้อร่า *H. thompsonii* สร้างขึ้น มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนอน โดยทำให้หนอนเจริญเติบโตผิดปกติ ไม่กินอาหาร หนอนบางตัวตายในระยะหัดตัวก่อนเข้าดักแด่ หนอนที่รอดจากการตายบางตัวเข้าดักแด่ไม่สมบูรณ์ ส่วนหนอนที่เข้าดักแด่สมบูรณ์ อาจไม่สามารถลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยได้ หรือเป็นตัวเต็มวัยที่มีลักษณะรูปร่างผิดปกติ เช่น ปีกหัก ปีกหลุดสั้น บินไม่ได้

6) สารเมตาโบลท์ของเชื้อร่าไอโซเลท 2444 (BCC 13005) มีประสิทธิภาพในการทำให้หนอนกระทู้ผักเจริญเติบโตผิดปกติ 100% ไอโซเลท 2301 (BCC 13928) ทำให้หนอนตายมากที่สุด 50% รองลงมาคือไอโซเลท 2480 (BCC 13018) ซึ่งทำให้หนอนตาย 40%

7) เชื้อร่าที่ผ่านการศึกษาร่วมข้อมูลเหล่านี้ถูกเก็บรักษาไว้ ณ ศูนย์ไบโอเทค หรือ BIOTEC Culture Collection

งานวิจัยด้านสังคมและภูมิปัญญา โดยใช้จุลินทรีย์เป็นเครื่องมือในการศึกษา

โครงการ "Local knowledge in each ethnics on termite mushroom conservation of Huai Khayeng, Kanchanaburi, Thailand" (2007) โดย จิรพันธ์ ธีระกุลพิศุทธิ์ และคณะ เป็นงานวิจัยด้านความรู้พื้นบ้าน หรือภูมิปัญญาของชนเผ่าต่างๆ ในตำบลห้วยเขย่ง พื้นที่โครงการทองผาภูมิตะวันตก โดยใช้เรื่องการเพาะปลูก การเก็บเห็ดโคน การนำไปขาย การบริโภค และการถ่ายทอดความรู้สู่ลูกหลานเป็นข้อเปรียบเทียบระหว่างชุมชนแต่ละเผ่า

ลักษณะงานวิจัย ประกอบด้วยการหาข้อมูล โดยการส่งแบบสอบถามไปยังกลุ่มเป้าหมาย 3 หมู่บ้าน คือ บ้านท่ามะเดื่อ บ้านไร่ป่า และบ้านไร่ในตำบลห้วยเขย่ง แต่ละหมู่บ้านจะมี คนไทย กะเหรี่ยง และพม่า นำ

ข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีการ
สัมภาษณ์ เพื่อเก็บข้อมูลเพิ่มเติม

องค์ความรู้ที่ได้จากผลงานโครงการ

1) การประกอบอาชีพของชุมชนแต่ละเผ่า
มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน คือ ชุมชนไทย
ส่วนใหญ่ จะประกอบอาชีพเกษตรกรรม และบ้างก็มี
อาชีพเป็นข้าราชการ ส่วนชุมชนกะเหรี่ยงจะมีอาชีพหา
ของป่า และรับจ้างบริการ ส่วนชุมชนพม่านั้นส่วนมาก
จะทำงานเป็นลูกจ้าง

2) เรื่องการเก็บเห็ดโคน คนโบราณบอก
ว่า ให้ใช้มือดึงดอกเห็ดขึ้นมา ห้ามใช้ของมีคม หรือมีด
ขูดเจาะ เพราะหากทำเช่นนั้นแล้ว จะไม่มีเห็ดให้เก็บอีก
ในปีถัดมา

3) ชุมชนทุกเผ่ามีความเชื่อว่าปลวกได้มี
พัฒนาการที่จะอยู่ร่วมกับราแบบพิเศษคือการอาศัยซึ่ง
กันและกัน ปลวกจะทำฟาร์มรา และภายในรังปลวกจะมี
ก้อนคล้ายสมองคน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหลาย
เซนติเมตร

4) เห็ดโคนมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ
โดยสร้างรายได้ให้ชุมชนในห้วยเขย่ง คิดเป็นมูลค่า
เกือบ 7 แสนบาทต่อปี

เอกสารอ้างอิง

- อังศุมาลย์ จันทราปต์ย์. 2007. *Hirsutella thompsonii* Fisher
จากป่าเขตอำเภอทองผาภูมิ และผลของสารเมตาโบไลต์
ของเชื้อราที่มีต่อหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura*
(Fabricius). BRT Newsletter, 2007.
- Gillis, M. and J. De Ley. 1980. Intra- and intergeneric
similarities of the ribosomal ribonucleic acid
cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *Int. J.*
Syst. Bacteriol. 30: 7-27.
- Terakunpisut, J., N. Gajasen, C. Hongprayoon. 2007.
Local knowledge in each ethnics on termite
mushroom conservation of Huai Khayeng,
Kanchanaburi, Thailand. BRT Newsletter, 2007.
- Wanchern, P., Y. Pattaraporn, M. Taweesak and Y.
Yamada. 2003. Isolation and identification of
acetic acid bacteria from sources collected in
Thailand focusing at Thong Pha Phum district.
BRT Final Report.
- Yamada, Y. and K. Kondo. 1984. *Gluconacetobacter*, a
new subgenus comprising the acetate-oxidising
acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the
genus *Acetobacter*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30:
297-303.
- Yamada, Y., K.I. Hoshino and T. Ishikawa. 1997. The
phylogeny of acetic acid bacteria based on the
partial sequences of 16S ribosomal RNA: The
elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to
the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61:
1244-1251.