

ประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. จากดินจอมปลวกในการต้านรา *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุของโรคผลเน่าในฝรั่ง

Efficiency of *Bacillus* spp. from ant-hill soils against *Pestalotiopsis* sp. causing fruit rot disease in guava

Received: October 25, 2018

Revised: April 26, 2019

Accepted: April 29, 2019

ศิริพร ทิพย์สิงห์ (Siriporn Tipsing)^{*}

สถิตย์ พันวิไล (Sathit Panvilai)^{**}

จรัญ ประจันบาล (Jaran Prajanban)^{***}

รัชณู เมยดง (Ratchanu Meidong)^{****}

บทคัดย่อ

โรคผลเน่าของฝรั่งจัดเป็นปัญหาที่พบมากในฝรั่งหลังการเก็บเกี่ยว โรคนี้มีสาเหตุที่สำคัญมาจากราก่อโรค ในการศึกษานี้ได้แยกเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคผลเน่าในฝรั่งและจัดจำแนกในระดับสกุลพบว่าเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ในการศึกษานี้ได้แยกแบคทีเรียปฏิปักษ์มาจากดินจอมปลวกจำนวน 7 ตัวอย่าง จากการศึกษพบว่าแบคทีเรียจำนวน 18 ไอโซเลตจากทั้งหมด 39 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคผลเน่าที่ร้อยละของการยับยั้งอยู่ระหว่าง 8.69 ถึง 72.38 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. สูงที่สุดคือไอโซเลต SP20 ที่ร้อยละการยับยั้งที่ 72.4 การจำแนกแบคทีเรียบนพื้นฐานของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์และลำดับ 16S rDNA ของไอโซเลต SP20 และความสัมพันธ์ใน phylogenetic tree พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* ที่ความเหมือนร้อยละ 99.93 โดยจากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าเชื้อ *B. subtilis* SP20 มีศักยภาพที่จะพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารชีวภาพในการยับยั้งราก่อโรคในผลเน่าในฝรั่งหลังการเก็บเกี่ยวต่อไป

คำสำคัญ : บาซิลลัส ราก่อโรค ฝรั่ง

^{*} อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Lecturer in Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University,

Tuu_zal16@hotmail.com

^{**} อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Lecturer in Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University,

scsathit@bsru.ac.th

^{***} ประจำคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Assistant Professor, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University,

jaran.pr@bsru.ac.th, 085-0984588

^{****} ประจำคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Assistant Professor, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University,

jaran.pr@bsru.ac.th, 085-0984588

Abstract

Fruit rot disease is the main problem of post-harvest guava. This disease has importantly caused by pathogenic fungi. In this study, fungi causing fruit rot disease in guava were isolated and identified as *Pestalotiopsis* sp. In this study, antagonistic bacterial strains were isolated from seven samples of termite hill soil. It was found that a total of 18 isolates out of 39 isolates showed inhibitory activity against *Pestalotiopsis* sp. The percent inhibition of fungal growth was 8.69%-72.38%. Among these isolates, SP20 showed the highest inhibitory activity against *Pestalotiopsis* sp. at 72.38%. Bacterial identification based on cell morphology and 16S rDNA sequence and relative with phylogenetic tree revealed that the isolate SP20 was closely related to *Bacillus subtilis* at 99.93% similarity. From these results, it can be concluded that *B. subtilis* SP20 had the potential to be developed for using as a biological agent for inhibition of fruit rot disease in post-harvest guava.

Keywords: *Bacillus*, Pathogenic fungi, *Psidium guajava*

บทนำ

ฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก เจริญเติบโตในสภาพภูมิอากาศทั่วไปบริเวณเขตร้อนและกึ่งร้อน ในประเทศไทยสามารถปลูกได้ทุกภาคโดยปลูกมากในจังหวัดนครปฐมและราชบุรี ให้ผลผลิตทั้งปีเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง อุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งวิตามินซีซึ่งพบในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังพบว่ามีการต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูงอีกด้วย จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Jimenez-Escrig et al., 2001) และเนื่องจากเป็นผลไม้ที่ราคาไม่แพงจึงเป็นที่นิยมรับประทานและเป็นสินค้าทางการเกษตรที่สำคัญของประเทศไทย

ปัญหาหนึ่งที่พบในระหว่างการปลูกและกระบวนการหลังเก็บเกี่ยว คือโรคผลเน่าที่มีสาเหตุมาจากราก่อโรค ซึ่งถือว่าเป็นโรคที่ก่อความเสียหายอย่างมาก (Keith et al., 2006) เนื่องจากฝรั่งมีโครงสร้างของเปลือกผลบอบบางจึงเกิดการบอบช้ำและทำให้ราก่อโรคเข้ามาทำความเสียหายได้ง่าย ราชที่ทำให้เกิดโรคผลเน่าของฝรั่งในระยะหลังเก็บเกี่ยวมีหลายชนิดได้แก่ *Botryodiplodia theobromae*, *Colletotrichum* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. เป็นต้น (Keith et al., 2006; Hashem & Alamer, 2009) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Pestalotiopsis* sp. นั้นมีหลายสายพันธุ์และพบเป็นสาเหตุโรคพืชทั่วไปในเขตร้อน สามารถเข้าทำลายพืชได้ทั้งบริเวณใบ ดอก และผล ทั้งนี้มีรายงานถึงการการก่อโรคในผลไม้หลายชนิด เช่น ฝรั่ง มังคุด เงาะ ลำไย ลองกอง ชมพู และ ทับทิม (Keith et al., 2006; Maharachchikumbura et al., 2014)

เมื่อราก่อโรคเข้าทำลายผลผลิตส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตลดลง ดังนั้นการแก้ไข้ปัญหาของผลผลิตหลังระยะเก็บเกี่ยวในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นความสนใจไปในการใช้สารชีวภาพมาควบคุมโรคจากราแทนการใช้สารเคมีเนื่องจากคำนึงถึงสุขภาพของผู้บริโภคและลดปัญหาการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย โดยมีรายงานการใช้จุลินทรีย์เพื่อควบคุมโรคจากราในพืชหลายชนิด เช่นการใช้ยีสต์ในการควบคุมโรคจากรา

Bot. theobromae หลังการเก็บเกี่ยวผลฝรั่ง (Hashem & Alamr, 2009) และการใช้ *B. subtilis* ในการควบคุมราในมะม่วง (Okigbo & Osuinde, 2014) และในงานของ Lin et al (2011) รายงานการใช้ *B. subtilis* ในการประยุกต์ใช้ในการเคลือบผิวผลแอปเปิ้ลเพื่อควบคุมรา *Pestalotiopsis eugeniae* อีกทั้งมีการศึกษาการใช้สารสกัดจากกระเทียมในการต้านราบนผิวมะม่วงน้ำดอกไม้เป็นต้น (Khamklieng et al., 2018) รวมถึงการใช้สารสกัดจาก *Bacillus* spp. ในการควบคุมการเจริญของ *Rhizoctonia bataticola* และ *R. solani* (Mnif et al., 2016) จากงานวิจัยทั้งหมดนี้จะเห็นได้ว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ มีประสิทธิภาพในการควบคุมราก่อโรค อีกทั้งมีงานวิจัยที่รายงานผลการแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าจากหลากหลายแหล่งตัวอย่างเช่น *B. subtilis* BN1 ที่แยกมาจากดินรอบรากต้นสนที่สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรครากเน่าชนิด *Macrophomina phaseolina* (Singh et al. (2008) และ *Bacillus* spp. ที่แยกมาจากปุ๋ยหมักที่สามารถยับยั้ง *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* (Lin et al. (2014) อีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจคือดินบริเวณจอมปลวก เนื่องจากมีรายการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้จากดินบริเวณจอมปลวก อีกทั้งมีรายงานการศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ในปลวกโดยพบ *Bacillus* sp. ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Taechapoempol et al., 2011) ดังนั้นดินจอมปลวกจึงเป็นอีกแหล่งที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำมาแยกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคผลเน่าในฝรั่ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้ทางผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและจำแนกรากที่เป็นสาเหตุโรคผลเน่าในฝรั่งและศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินจอมปลวกในการควบคุมราสาเหตุโรคผลเน่าในฝรั่งเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันการเกิดโรคผลเน่าในฝรั่งต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การแยกราสาเหตุโรคผลเน่าในฝรั่ง

นำผลฝรั่งที่เป็นโรคผลเน่าที่เก็บมาจากอำเภอสามพราณ จังหวัดนครปฐม จำนวน 5 ตัวอย่าง มาแยกราสาเหตุจากส่วนที่เป็นโรคด้วยวิธี tissue transplant technique โดยตัดเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นโรคขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อบริเวณผิวโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ย้ายเนื้อเยื่อไปวางบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA, Himedia, India) และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำมาทำหีบบริสุทธิด้วยวิธี single spore technique จากนั้นใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงบนสไลด์ (slide culture) เพื่อศึกษาลักษณะของราสาเหตุโรครากเน่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์และจัดจำแนกลักษณะของราในระดับสกุล (Keith et al., 2006)

การพิสูจน์โรค

การพิสูจน์โรคด้วยวิธี Koch's postulation เป็นการพิสูจน์โรคจากรากที่แยกมา โดยเริ่มจากนำผลฝรั่งที่ปราศจากโรคมาทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 จากนั้นใช้คัตเตอร์ที่ปลอดเชื้อกรีดให้เป็นรอยแผล และเจาะบริเวณปลายเส้นใยราที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปวางบนรอยแผลที่กรีดไว้ บ่มผลฝรั่งในกล่องพลาสติกที่ให้ความชื้นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำชิ้นวุ้นออกแล้วบ่มต่อเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำบริเวณที่มีลักษณะเน่ามาแยก

เชื้อกลับอีกครั้งบนอาหาร PDA และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อบ่งชี้ว่าเป็นราสายพันธุ์เดียวกับที่แยกมา และเป็นสาเหตุของการก่อโรคผลเน่าจริง เมื่อทำการจำแนกราสาเหตุโรคเน่าในฝรั่งพบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาตรงกับรา *Pestalotiopsis* sp.

การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

ตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียคือดินบริเวณจอมปลวกในอำเภอร่องทอง จังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 7 ตัวอย่าง โดยนำดินมา 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เมื่อทำการเจือจางเสร็จแล้ว นำความเจือจางที่ 10^{-4} ถึง 10^{-6} ไปแยกเชื้อด้วยวิธี plate count technique บนอาหาร Nutrient agar (NA) และบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Chen et al., 2016) เลือกเก็บโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีและรูปร่างต่างกันแล้วนำไปทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยการ cross streak บนอาหาร NA จากนั้นเก็บเชื้อไว้ในกลีเซอรอลร้อยละ 20 ก่อนที่จะนำเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลตที่คัดแยกได้ไปศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคผลเน่า

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราสาเหตุโรคผลเน่า

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิบััษที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคผลเน่า โดยเฉพาะเลี้ยงราทดสอบบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ส่วนแบคทีเรียปฏิบััษเลี้ยงในจานอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราโรคพืชโดยวิธี dual culture technique (Kumar et al., 2012) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะรูบนบริเวณปลายเส้นใยของราที่เจริญบนอาหาร PDA วางบนอาหาร PDA จานใหม่ โดยวางให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร หลังจากนั้นใช้หวงเขี่ยเชื้อที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยว ๆ ของแบคทีเรียที่เตรียมไว้ (อายุ 24 ชั่วโมง) ชิดเป็นเส้นตรงด้านตรงข้ามกับขึ้นราที่วางไว้ก่อนในแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง ห่างจากขึ้นรา 5 เซนติเมตร ตรวจสอบผลโดยการเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่วางเฉพาะราสาเหตุโรคเน่า จากนั้นบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดของรัศมีของโคโลนีราสาเหตุโรคเน่าในชุดควบคุมและชุดทดสอบแล้วนำมาคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG) โดยสูตรคำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญคือ $PIRG = [(R1 - R2)/R1 \times 100]$ เมื่อ R1 คือความยาวรัศมีของโคโลนีของราสาเหตุในจานชุดควบคุม (มิลลิเมตร); R2 คือความยาวรัศมีของโคโลนีของราสาเหตุในจานชุดทดสอบ (มิลลิเมตร)

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิบััษโดยใช้วิธีทางอนุพันธุศาสตร์

นำแบคทีเรียปฏิบััษที่มีความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุโรคเน่าได้สูงที่สุด มาทำการจำแนกโดยใช้วิธีการทางอนุพันธุศาสตร์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ร่วมกับการจำแนกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA โดยเพิ่มจำนวนยีนด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ E8Fb (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ซึ่งออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ตามการรายงานของ Youssef et al. (2009) และ Ser1603R (5'-TTCCSMTACGGYTACCTTG-3') ออกแบบโดยใช้โปรแกรม SnapGenViewer v.2.4 (Prajnban et al., 2016) โดยผลิตภัณท์ PCR ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) และนำผลิตภัณท์ PCR ของยีน 16S rDNA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับเบสโดยการส่งวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยลำดับ 16S rDNA ที่ได้ถูกนำไปเทียบกับลำดับนิวคลีโอ

โอไทด์ในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และ EzTaxon server และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0.

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น ($p < 0.005$)

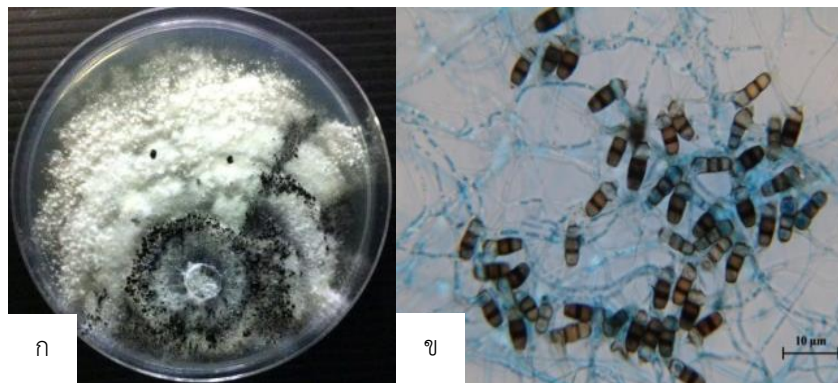
ผลการวิจัย

การแยก การพิสูจน์โรค และจำแนกสาเหตุโรคเน่าในฝรั่ง

จากตัวอย่างผลฝรั่งที่เป็นโรคเน่าทั้ง 5 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกราที่เป็นสาเหตุโรคเน่า สามารถแยกได้ราที่มีลักษณะโคโลนีบน PDA และลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยพบว่ามีลักษณะเดียวกันหมด (ไอโซเลต PG1, PG2, PG3, PG4 และ PG5) เมื่อนำรา 5 ไอโซเลตไปศึกษาการก่อโรคในผลฝรั่ง พบว่าไอโซเลต PG1 ก่อโรคในผลฝรั่งที่ใช้ทดสอบได้เร็วและมีขนาดแผลใหญ่ที่สุดเมื่อเทียบกับไอโซเลตอื่นๆ จึงเลือกไอโซเลต PG1 ไปทำการศึกษาค้นคว้าเนื่องจากเป็นไอโซเลตที่มีความรุนแรงในการก่อโรคที่สุด จากนั้นจำแนกสาเหตุโรคเน่าในผลฝรั่ง โดยเลี้ยงไอโซเลต PG1 บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบเส้นใยสีขาวนวลถึงน้ำตาลอ่อนเจริญหนาแน่น เส้นใยหยาบ พูเล็กน้อย และพบกลุ่มโคนิเดีย (conidia) สีดำกระจายอยู่ทั่วบนเส้นใยสีขาว (ภาพที่ 1ก) และเมื่อนำไปศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400x (Olympus CX23; Olympus, Tokyo, Japan) พบลักษณะของ conidia ดังภาพที่ 1ข มีลักษณะเป็นรูปกระสวยและมีหลายเซลล์ โดยมีลักษณะตรงกลางมีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนเซลล์บริเวณหัวและท้ายใสไม่มีสี เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะที่ได้จากการจำแนกในงานวิจัยของ Keith et al (2006) และ Maharachchikumbura et al (2014) ได้ผลการจำแนกสาเหตุโรคเน่าในฝรั่งพบว่าใกล้เคียงกับเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งสาเหตุโรคเน่านี้ได้ถูกนำไปศึกษาต่อในการทดลองถัดไป

ผลการแยกแบคทีเรียปฏิชีวนะจากตัวอย่างดิน

จากการแยกแบคทีเรียจากดินจอมปลวกเพื่อควบคุมราที่เป็นสาเหตุโรคผลเน่าในฝรั่ง จากตัวอย่างดินในบริเวณจอมปลวก จำนวน 7 ตัวอย่าง ในอำเภออุ้มทอง จังหวัดสุพรรณบุรี สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีสีและรูปร่างต่างกันได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 1 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ 18 ไอโซเลต และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 21 ไอโซเลต ทุกไอโซเลตที่แยกได้ถูกนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคผลเน่าต่อไป



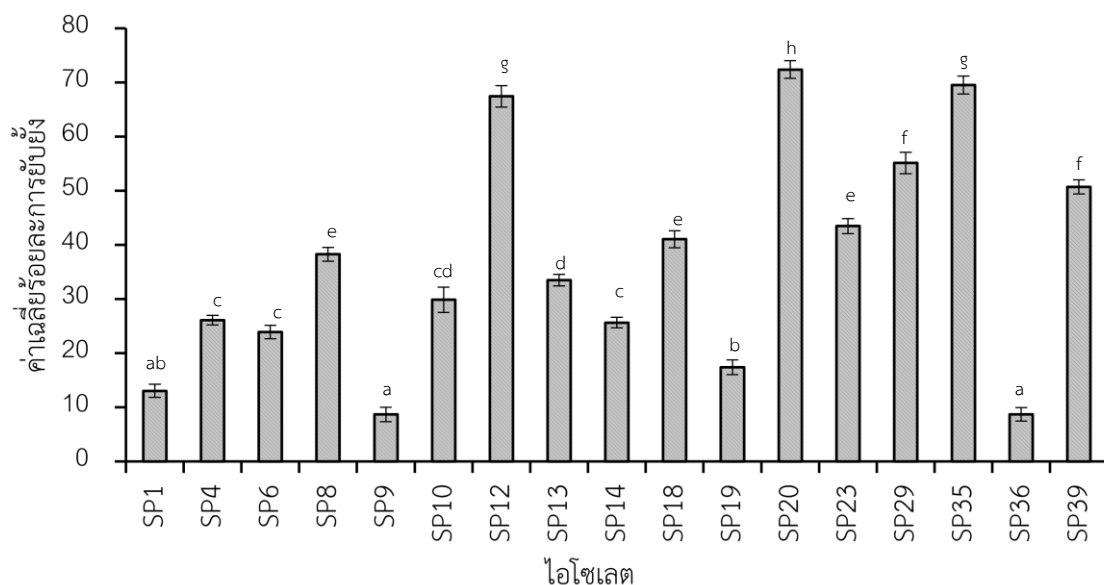
ภาพที่ 1 ลักษณะของเส้นใยของ *Pestalotiopsis* sp. บนอาหาร PDA (ก); ลักษณะของโคนินเดีย (ข)

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน

รหัสเชื้อ	แกรม	รหัสเชื้อ	แกรม	รหัสเชื้อ	แกรม
SP1	บวก	SP14	บวก	SP27	ลบ
SP2	ลบ	SP15	ลบ	SP28	ลบ
SP3	ลบ	SP16	ลบ	SP29	บวก
SP4	ลบ	SP17	บวก	SP30	บวก
SP5	บวก	SP18	ลบ	SP31	ลบ
SP6	บวก	SP19	ลบ	SP32	บวก
SP7	บวก	SP20	บวก	SP33	ลบ
SP8	บวก	SP21	บวก	SP34	ลบ
SP9	ลบ	SP22	บวก	SP35	บวก
SP10	ลบ	SP23	บวก	SP36	ลบ
SP11	ลบ	SP24	บวก	SP37	ลบ
SP12	บวก	SP25	บวก	SP38	บวก
SP13	บวก	SP26	ลบ	SP39	บวก

ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้ในการยับยั้งราสาเหตุโรคผลเน่า

ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของ *Pestalotiopsis* sp. GP1 ในระดับห้องปฏิบัติการพบว่าแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลต คือ SP1, SP4, SP6, SP8, SP9, SP10, SP12, SP13, SP14, SP18, SP19, SP20, SP23, SP29, SP35, SP36 และ SP39 ที่มีประสิทธิภาพเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคผลเน่าของฝรั่งที่เกิดจาก *Pestalotiopsis* sp. PG1 จากการศึกษพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถเข้าครอบครองพื้นที่ในการเจริญได้เร็วกว่าและเจริญเต็มพื้นที่ของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จนทำให้ *Pestalotiopsis* sp. PG1 ไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งประสิทธิภาพของแต่ละไอโซเลตในการยับยั้งราสาเหตุโรคผลเน่าดังแสดงในภาพที่ 2 หลังทดสอบพบว่าแบคทีเรียที่นำมาศึกษามีร้อยละของการยับยั้งที่ 8.69-72.38 โดยไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. PG1 คือไอโซเลต SP20 โดยมีร้อยละการยับยั้งที่ 72.38 รองลงมาคือไอโซเลต SP35 และไอโซเลต SP12 โดยมีร้อยละของการยับยั้งที่ 69.52 และ 67.43 ตามลำดับ และในภาพที่ 3 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคผลเน่าในจานอาหารด้วยวิธี dual culture assay จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกไอโซเลต SP20 ไปทำการศึกษาด้านการจำแนกและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย



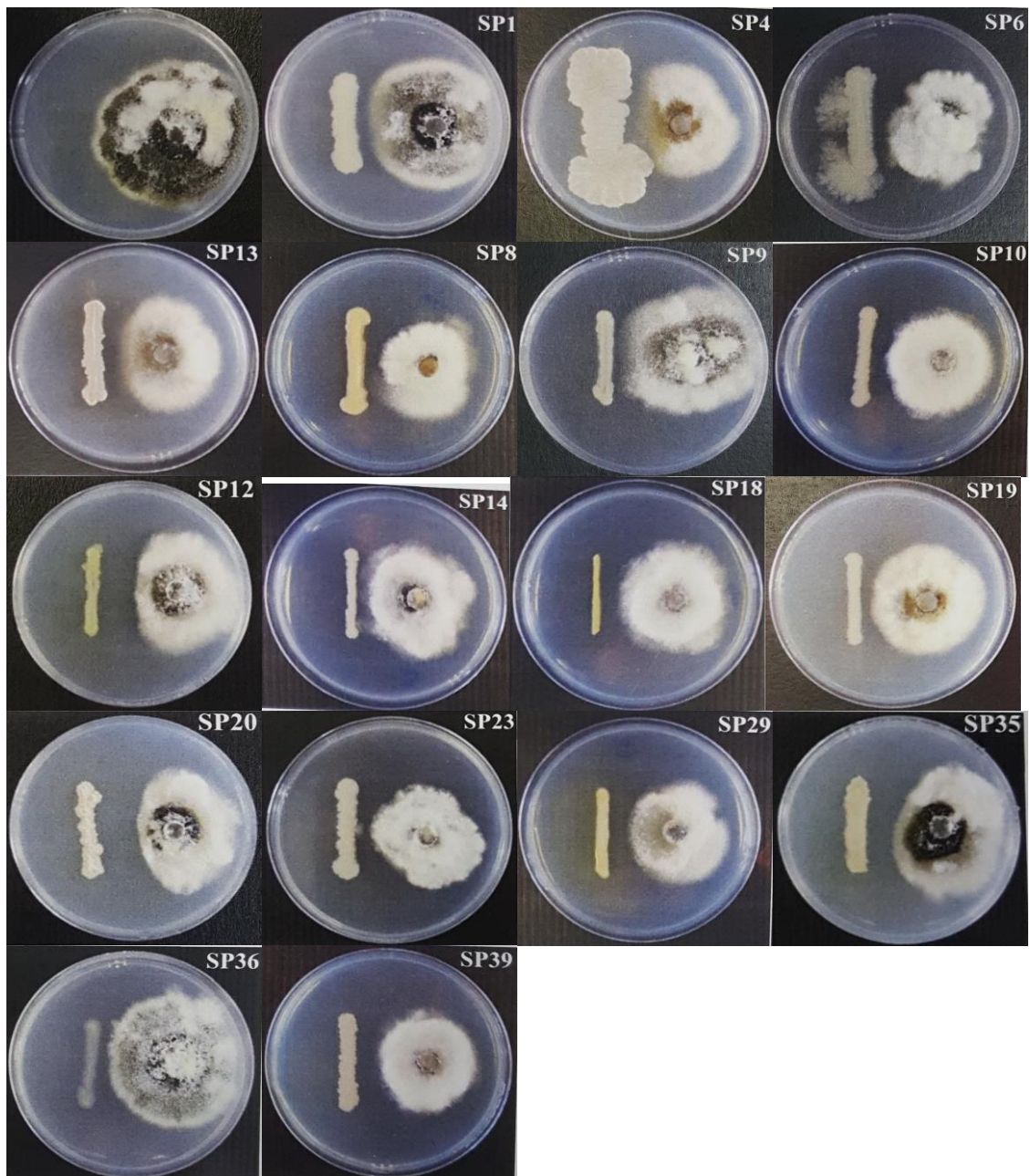
ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลตต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของ *Pestalotiopsis* sp. PG1 (ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.005$))

ผลการจำแนกแบคทีเรียปฏิชีวนะไอโซเลต SP20

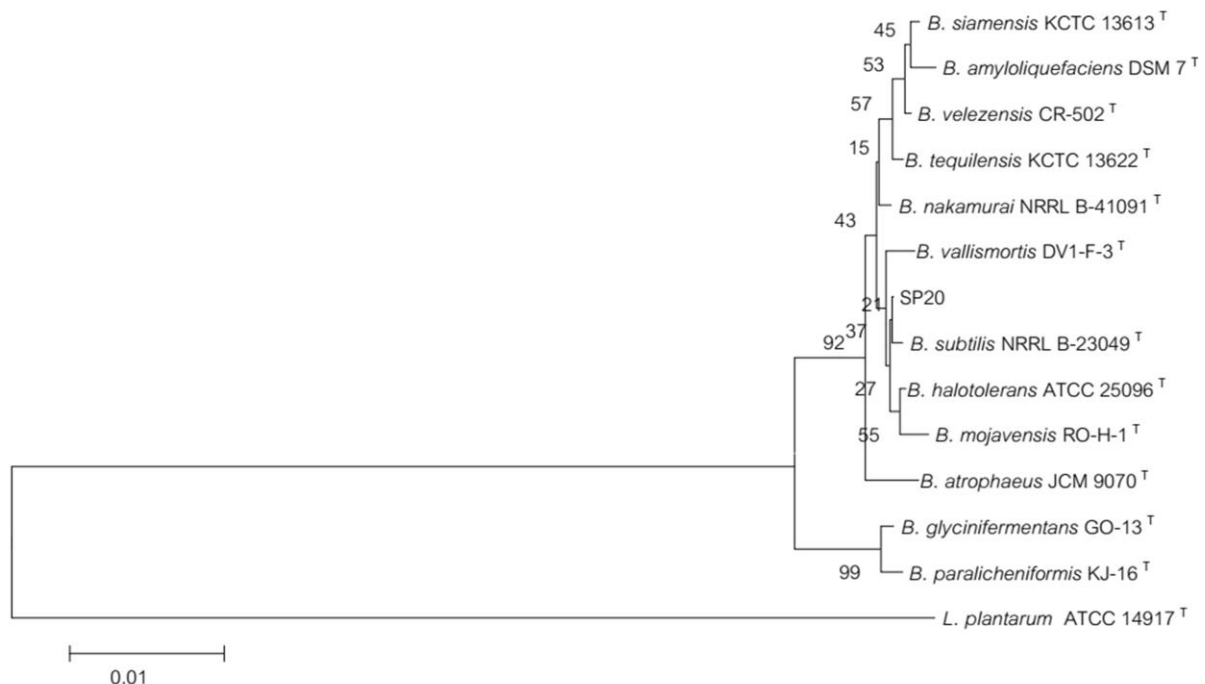
ไอโซเลต SP20 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน สร้างสปอร์และเอนไซม์อะไมเลส รวมถึงเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนซึ่งเป็นคุณลักษณะของเชื้อในกลุ่มบาซิลลัส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA (1463 bp) และความสัมพันธ์ใน phylogenetic tree ดังแสดงในภาพที่ 4 พบว่าไอโซเลต SP20 มีความใกล้เคียงกับ *B. subtilis* ที่สุดและจากการเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI และ EzTaxon server พบว่าไอโซเลต SP20 มีความเหมือน *B. subtilis* ที่ร้อยละ 99.93

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการที่ผู้บริโภคในปัจจุบันมีความตระหนักถึงคุณภาพชีวิตและความปลอดภัยจากการบริโภคอาหารและยา ปัจจุบันนักวิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาสารจากธรรมชาติจากหลากหลายแหล่งเพื่อมาใช้ทดแทนการใช้สารเคมีที่มีรายงานว่าส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์ตัวอย่างในงานวิจัยของ Thongsriphan & Kongchareonsuntor (2018) ได้รายงานผลการศึกษาว่าสารสกัดจากมะไฟจีนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้เทียบเท่ากับการใช้ยาปฏิชีวนะ ข้อมูลนี้เป็นประโยชน์กับทางการแพทย์เป็นเนื่องจากอาจช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาคนและหันมาใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่ไม่ตกค้างทดแทน อีกรายงานการวิจัยคือการเสริมโพรไบโอติกส์ในการเลี้ยงลูกสุกร โดยผู้วิจัยพบว่าสามารถเพิ่มความสูงของวิลลัสและพื้นที่ผิวของวิลลัสของคูโอติ้นม เจอูนม และไอเลียม รวมถึงลดแบคทีเรียก่อโรคในลูกสุกรได้ ซึ่งเป็นการส่งเสริมการเจริญของลูกสุกรแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงนั่นเอง (Nopparatmaitree et al., 2018) ทั้งสองงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นล้วนเป็นงานวิจัยที่คำนึงถึงสุขภาพของผู้บริโภคทั้งสิ้น โดยในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาการใช้วิธีทางชีวภาพจากแบคทีเรียในการควบคุมโรคแทนการใช้สารเคมี เนื่องจากในการปลูกพืชและการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตรพบว่าส่วนหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรเสียหายมักเกิดจากการเข้าทำลายของราและแบคทีเรียก่อโรค ดังนั้นเกษตรกรผู้เพาะปลูกพืชนั้นๆ จำเป็นต้องหาทางป้องกันไม่ให้ผลผลิตเสียหาย ทั้งในระหว่างการปลูกหรือแม้กระทั่งระยะหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต (Pérez-García et al., 2011) ในปัจจุบันมีความสนใจในการใช้สารออกฤทธิ์ชีวภาพมาใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคทางการเกษตรแทนการใช้สารเคมี เนื่องจากคำนึงถึงสุขภาพของผู้บริโภคเป็นหลักอีกทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มาจากแบคทีเรีย เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย เจริญได้เร็ว จึงเหมาะแก่การนำไปพัฒนาได้ง่าย ทั้งนี้มีรายงานผลการวิจัยมากมายถึงการใช้จุลินทรีย์เพื่อควบคุมโรคจากราในพืชหลายชนิด เช่นการใช้ยีสต์ในการควบคุมโรคจากรา *Bot. theobromae* หลังการเก็บผลฝรั่ง (Hashem & Alamri, 2009) และการใช้ *B. subtilis* ในการควบคุมราในมะม่วงในงานของ Okigbo & Osuinde, (2003) และในงานของ Lin et al (2011) รายงานการใช้ *B. subtilis* ในการประยุกต์ใช้ในการเคลือบผิวผล แอปเปิ้ลเพื่อควบคุมรา *P. eugeniae* อีกทั้งมีการศึกษาการใช้สารสกัดจากกระเทียมในการยับยั้งการเจริญของราบนผิวมะม่วงน้ำดอกไม้เป็นต้น (Khamklieng et al., 2018)



ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคผลเน่าในฝรั่ง
Pestalotiopsis sp. PG1



ภาพที่ 4 Phylogenetic tree ของไอโซเลต SP20 เมื่อเทียบกับเชื้อกลุ่ม *Bacillus* spp.

ในงานวิจัยฉบับนี้มีวัตถุประสงค์แรกคือการแยกและจำแนกราสาเหตุโรคผลเน่าในฝรั่ง พบว่าทุกตัวอย่างสามารถแยกได้ราที่มีลักษณะเดียวกันคือมีลักษณะเป็นเส้นใยฟูสีขาว และมีการกระจายของโคนิเดียสีดำบนเส้นใย พบโคนิเดียลักษณะเป็นรูปกระสวย โดยมีลักษณะตรงกลางมีสีเข้มและตรงส่วนหัวท้ายใส เมื่อนำไปจำแนกพบว่าตรงกับ *Pestalotiopsis* sp. ดังนั้นจึงถือว่ารานี้เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในฝรั่ง ซึ่งสอดคล้องกับผลการรายงานของ Keith et al, (2006) ที่พบว่ารา *Pestalotiopsis* sp. เป็นสาเหตุโรคในผลฝรั่ง ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงใช้รา *Pestalotiopsis* sp. PG1 เนื่องจากมีความรุนแรงในการก่อโรครุนแรงที่สุดไปใช้ในการศึกษาต่อไป

ในการทดลองต่อมาคณะผู้วิจัยแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคเน่าในฝรั่งจากตัวอย่างดิน โดยในงานนี้มุ่งเน้นไปที่ดินจอมปลวก เนื่องจากมีการศึกษาว่าในจอมปลวกนั้นมีสิ่งมีชีวิตที่หลากหลายจึงเป็นไปได้ว่าจะสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติที่ดีที่ต้องการได้ โดยในงานนี้ผู้วิจัยสามารถแยกแบคทีเรียจากดินจอมปลวกทั้ง 7 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบรวมทั้งหมดจำนวน 39 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อนำไปศึกษาความสามารถในการยับยั้งราด้วยวิธี dual culture assay พบว่ามีแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 17 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ โดยในงานนี้พบว่าไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือไอโซเลต SP20 โดยมีร้อยละของการยับยั้งที่ 78.38 เมื่อสังเกตลักษณะการเจริญบนอาหาร PDA พบว่า ไอโซเลต SP20 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Pestalotiopsis* sp. และเห็นโซนที่แสดงการยับยั้งได้ชัดเจน อีกทั้ง เมื่อนำไอโซเลต SP20 ไปทำการจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน และเมื่อจัดจำแนกโดยใช้ลำดับ 16S rDNA พบว่า ใกล้เคียงกับเชื้อ *B. subtilis* (ร้อยละ 99.93) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็น

เห็นว่าเชื้อ *B. subtilis* SP20 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกมายับยั้งรา *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในฝรั่งได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับงานของ Okigbo & Osuinde (2003) ที่รายงานผลการใช้ *B. subtilis* ในการควบคุมรา *P. mangiferae*, *Bot. theobromae* และ *Macrophoma mangiferae* ที่เป็นสาเหตุโรคในมะม่วง อีกทั้งในงานของ Ashwini & Srividya, (2014) พบว่า *B. subtilis* ที่แยกมาจากดินที่มีการปลูกพริกสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* OCC1 เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี dual culture assay โดยทำการตรวจสอบและพบว่าการที่ *B. subtilis* สามารถยับยั้งรานี้ได้เนื่องจากสร้างเอนไซม์ chitinase, glucanase และ cellulase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายสารที่เป็นองค์ประกอบในเส้นใยจึงทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของราได้นั่นเอง ทั้งนี้ในงานของ Cao et al. (2011) รายงานการใช้ *B. subtilis* SQR9 ในการยับยั้งรา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวในพืชหลายชนิด โดย *B. subtilis* SQR9 สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* ได้ผลดีทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับเรือนทดลอง อีกทั้งยังพบการรอดชีวิตของ *B. subtilis* SQR9 ในดินรอบรอบๆ รากพืชได้อีกด้วย ซึ่งจากผลการทดลองที่กล่าวมานี้แสดงให้เห็น *Bacillus* sp. หลาย ๆ สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งโรคพืชได้ดีในระดับห้องปฏิบัติการเป็นพื้นฐานการศึกษาที่สำคัญที่จะทำให้ได้เชื้อที่มีศักยภาพไปใช้งานจริงต่อไป

จากการทดลองพบว่าราสาเหตุโรคเน่าในผลฝรั่งที่ทางผู้วิจัยแยกและจำแนกได้คือสายพันธุ์ *Pestalotiopsis* sp. ทั้งนี้ทางผู้วิจัยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการควบคุมราก่อโรคเน่าในฝรั่งได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ *B. subtilis* SP20 และในงานวิจัยต่อไปทางผู้วิจัยจะทำการศึกษากลไกของ *B. subtilis* SP20 ต่อการทำลาย *Pestalotiopsis* sp. รวมถึงพัฒนาการนำ *B. subtilis* SP20 ในรูปแบบชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพไปใช้ในการควบคุมโรคจากราในระดับเรือนทดลอง เพื่อนำไปสู่การควบคุมโรคอย่างยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จได้เนื่องจากได้รับการสนับสนุนอุปกรณ์และสารเคมี จากสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

References

- Ashwini, N., & Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3Biotech*, 4(2), 127–136.
- Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N., Yuan, Y., Zheng, X., Shen, B. & Shen, Q. (2011). *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils*, 47(5), 495–506.
- Chen, X., Zhang, Y., Fu, X., Li, Y., & Wang, Q. (2016). Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Harvest Biology and Technology*, 115, 113-121.
- Hashem, M., & Alamri, S. (2009). The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. *Postharvest Biology Technology*, 53(3), 123–130.
- Jimenez-Escrig, A., Rinco, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F.(2001).Guava fruit(*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5489-5493.
- Keith, L.M., Velasquez, M.E., & Zee, F.T. (2006). Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. *Plant Disease*, 90(1), 16-23.
- Khamklieng, U., Koonjaturut, A., Bundidpiboon, H., & Poomtien, J. (2018). Biofilm coating from garlic extracts plus biosurfactant against fungal pathogens on mangoes (Nam Dok Mai). *Huachiew Chalermprakiet Science and Technology Journal*, 4(1), 113-123. [in Thai]
- Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K., Srivastava, R.C. (2012). Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. *Indian Journal of Microbiology*, 52(2), 137–144.
- Lin, H.F., Chen, T.H., & Liu, S.D. (2011). The antifungal mechanism of *Bacillus subtilis* against *Pestalotiopsis eugeniae* and its development for commercial applications against wax apple infection. *African Journal Microbiology Researcher*, 5(14), 1723–1728.

- Lin, Y., Du, D., Si, C., Zhao, Q., Li, Z., & Li, P. (2014). Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. *Biological Control*, 71, 7–15.
- Maharachchikumbura, S.S.N., Hyde, K.D., Groenewald, J.Z., Xu, J., & Crous, P.W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79(1), 121–186.
- Mnif, I., Grau-Campistany, A., Coronel-León, J., Hammami, I., Triki, M. A., Manresa, A., & Ghribi, D. (2016). Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(7), 6690–6699.
- Nopparatmaitree, M., Banglarp, N., Thongprasong, T., Siribut, T., Jieoyee, S., Phuekngern, I., Sri-Onlerd, J. & Kitpipit, W. (2018). Effect of multi-probiotics supplementation in diets on apparent nutrient digestibility, intestinal microbiota and histomorphology of weaned pigs. *Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University*, 5(3), 120–138.
- Okigbo, R.N., & Osuinde, M.I. (2003). Fungal leaf spot diseases of mango (*Mangifera indica* L.) in southeastern Nigeria and biological control with *Bacillus subtilis*. *Plant Protection Science*, 39(2), 70–77.
- Pérez-García, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 187–193.
- Prajanban, J., Panvilai, S. & Sawangarom, W. (2016). Restraining of seedling blight disease in Jasmine rice 105 using biological control. *Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning*, 7, 1–13.
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R.C. & Maheshwari, D.K. (2008). Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1669–1679.
- Taechapoempol, K., Sreethawong, T., Rangsunvigit, P., NamprohmBandhit, W., Thamprajamchit, B., Rengpipat, S., Chavade, S., Cellulase-Producing Bacteria from Thai Higher Termites, *Microcerotermes* sp.: Enzymatic Activities and Ionic Liquid Tolerance. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(2), 204–219.

- Thongsriphan, P. & Kongchareonsuntorn, W. (2018). Synergistic effect of *Clausena lansium* (Lour.) skeels extract with ampicillin and tetracycline against opportunistic gram negative bacteria. *Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University*, 5 (1), 57-71.
- Youssef, N., Sheik, C. S., Krumholz, L. R., Najar, F. Z., Roe, B. A. & Elshahed, M. S. (2009). Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5227-5236.