การคัดกรองฤทธิ์ต้านเชื้อราของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดแยกจากดินสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี

Screening of Antifungal Activity of Antagonistic Bacteria Isolated from Orchard Soil in Chanthaburi Province

จิรภัทร จันทมาลี[1*] อิสรัศมิ์ แสงน้อย[1] นภัสกร นาคสกุล[1] นิภาพร ทองพูล[1] และวิญญู ภักดี[1]

Jirapat Chanthamalee[1*] Issaras Sangnoi[1] Napassakorn Naksakul[1] Nipaporn Tongpune[1] and Winyoo Puckdee[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* และ *Penicillium* sp. ของแบคทีเรียจำนวน 169 ไอโซเลทที่คัดแยกจากดินสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี ด้วยวิธี Dual culture บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ผลการทดลองพบแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 5 ไอโซเลท (MaB01-6, MaB01-12, KaB02-2, NaB01-7, SoB02-3) ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุด จึงคัดเลือกไว้สำหรับทดลองในขั้นต่อไป เริ่มจากทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตและสารกรองที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ซึ่งพบเฉพาะส่วนเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้นที่แสดงผลยับยั้งการเจริญของเส้นใย เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร Carboxy Methyl Cellulose (CMC) พบกิจกรรมการสร้างเซลลูเลสของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท NaB01-7 และ MaB01-12 โดยมีโซนใส 27.20 และ 20.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: สวนผลไม้ แบคทีเรียปฏิปักษ์ ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

Abstract

This research aimed at screening antifungal activity against *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* and *Penicillium* sp. of 169 bacterial isolates from orchard soil in Chanthaburi province by dual culture technique on Potato Dextrose Agar (PDA). The result showed the strong antifungal activity of five isolates (MaB01-6, MaB01-12, KaB02-2, NaB01-7 ,SoB02-3) which were selected for further study. The potential of viable cell and cell-free supernatant to inhibit the growth of fungi had been tested. Only viable cell culture were able to suppress the mycelial growth. The five isolates were then screened for ability of cellulase production on Carboxy Methyl Cellulose (CMC) agar. The result showed cellulase activity of NaB01-7 and MaB01-12 with clear zone 27.20 and 20.00 mm, respectively.

Keywords : Orchard Soil, Antagonistic Bacteria, Antifungal activity

---

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

[1]Biology Department, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University

*Corresponding author; Tel: 083-7861113: E-mail address: jirapat.c@rbru.ac.th

คำนำ

จังหวัดจันทบุรีเป็นแหล่งเพาะปลูกผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งทุเรียนซึ่งมีพื้นที่เพาะปลูกและปริมาณผลผลิตมากที่สุดในประเทศ (สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์การค้า, 2563) อย่างไรก็ตามปัญหาการเกิดโรคติดเชื้อในไม้ผลมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากไม่สามารถสังเกตพบเชื้อได้ง่ายก่อนที่จะแสดงอาการของโรคทั้งในแปลงปลูก ระหว่างและหลังการเก็บเกี่ยว โดยเชื้อราบางชนิดมีการเข้าทำลายแบบแฝงอยู่ที่ผิวของผลไม้ที่ยังอ่อนโดยแสดงอาการของโรคเมื่อผลสุก นอกจากนี้เชื้อราก่อโรคในจีนัส *Aspergillus* หรือ *Penicillium* อาจมีการสร้างสารพิษที่มีความเป็นพิษสูง เช่น อะฟลาท็อกซิน (เนตรนภิส เขียวขำ, 2554) โรคที่สำคัญในแปลงปลูกทุเรียน ได้แก่ รากเน่าและโคนเน่า ใบติด ราสีชมพู ราแป้ง ผลเน่า (อำพล พรหมเมศร์ และคณะ, 2562) จีนัสสำคัญของเชื้อก่อโรคในทุเรียนประกอบด้วย *Phytophthora palmivora* (Butler) ทำให้เกิดโรครากเน่า โคนเน่า และผลเน่า *Rhizoctonia* sp. ทำให้เกิดโรคใบติดหรือใบไหม้ *Colletotrichum gloeosporiodes* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนส *Corticium salmonicolor* ทำให้เกิดโรคราสีชมพู *Oidium* sp. ทำให้เกิดโรคราแป้ง รวมถึงเชื้อราทั่วไปที่ทำให้เกิดโรคราดำ (นิพนธ์ วิสารทานนท์, 2560) ในขณะที่มักพบการเข้าทำลายพืชผลของเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus*, *Rhizopus* และ *Penicillium* ในระหว่างหรือหลังการเก็บเกี่ยว (สมศิริ แสงโชติ, 2554; นริศรา สุวรรณ, 2555) สอดคล้องกับวัชรี เสาร์เทพ และคณะ (2560) ที่รายงานการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* spp. จำนวน 76 ไอโซเลท และเชื้อรา *Penicillium* spp. จำนวน 8 ไอโซเลท ในผลิตผลทางการเกษตรและดินปลูกพืชจากแหล่งต่าง ๆ จะเห็นได้ว่าเชื้อราโรคพืชที่เข้าทำลายผลไม้ทั้งในช่วงฤดูกาลผลิต ระหว่างการเก็บเกี่ยว และหลังการเก็บเกี่ยวมีหลากหลายชนิดและเป็นปัญหาสำคัญ ซึ่งเกษตรกรและผู้ที่เกี่ยวข้องมักใช้สารเคมีกำจัดแมลงหรือสารเคมีกำจัดเชื้อราในการจัดการปัญหาดังกล่าว แต่การใช้ในปริมาณมากหรือผิดวิธีนำไปสู่ปัญหาสารเคมีตกค้างรวมถึงการมีคุณภาพต่ำของผลผลิตทางการเกษตร การแพร่กระจายของสารเคมีในสภาพแวดล้อม หรือปัญหาเชื้อดื้อยา (Singh et al., 2022) จึงต้องหาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการจัดการโรคมาใช้ควบคู่หรือทดแทนสารเคมีที่มีราคาแพงและกลายเป็นข้อกีดกันทางการค้าตามข้อกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร ดังนั้นการควบคุมโรคพืชในไม้ผลโดยวิธีชีวภาพด้วยการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ท้องถิ่นที่คัดแยกจากดินในพื้นที่เกษตรกรรมจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้น

แบคทีเรียปฏิปักษ์ (Antagonistic bacteria) เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มส่งเสริมการเจริญของพืชที่สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่าง ๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโต กลไกการทำลายเชื้อก่อโรคพืชของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยสารที่ผลิตออกมานอกเซลล์ เช่น สารปฏิชีวนะ ไซเดอโรฟอร์ เอนไซม์ และสารระเหย ข้อสรุปจากรายงานวิจัยจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์มีบทบาทสำคัญในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค (Mageshwaran et al., 2022) สอดคล้องกับรายงานของ Hassan และคณะ (2019) ถึงประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ของ *Bacillus licheniformis* BL350-2 ต่อเชื้อราจีนัส *Aspergillus* และ *Penicillium* สายพันธุ์ก่อโรคในข้าวโพดที่สร้างสารพิษ โดยที่แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์ได้ในช่วง 44-62 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบในจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 5 วัน อย่างไรก็ตามยังไม่มี

รายงานเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินในพื้นที่สวนผลไม้มาทดสอบยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคไม้ผล โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ท้องถิ่นอาจมีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์ทางการค้าที่คัดแยกจากแหล่งอื่น เนื่องจากสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในพื้นที่ได้ดีกว่า ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราจากดินสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี ซึ่งเป็นงานทดลองเบื้องต้นที่จะนำไปสู่การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของจังหวัดจันทบุรี เพื่อการพัฒนาสูตรหัวเชื้อให้สะดวกต่อการใช้งานของเกษตรกร

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้จากสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี ครอบคลุมทั้ง 10 อำเภอ เก็บตัวอย่างดินรอบทรงพุ่มต้นผลไม้โดยเน้นต้นทุเรียนที่มักเป็นโรคจากเชื้อรา บริเวณรอบทรงพุ่ม โคนต้นพืช และบริเวณที่มีการทับถมของเศษซากพืช ตามวิธีของกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2564)

การคัดแยกแบคทีเรียในดิน

การคัดแยกแบคทีเรียในดินทำตามวิธีการของ นุชจรินทร์ นนทรี และคณะ (2555) โดยนำดินตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่บรรจุสารละลายน้ำเกลือปลอดเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างมาเจือจางให้มีระดับความเจือจาง 10^{-2} ถึง 10^{-5} แล้วจึงเกลี่ยบนอาหาร Nutrient Agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะแตกต่างกัน ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคขีดเชื้อ (streak plate) เก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนอาหาร NA สำหรับใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

การศึกษาความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียต่อเชื้อรา

การศึกษาความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ต่อเชื้อราทดสอบใช้วิธี Dual Culture ตามวิธีการของ Petatán-Sagahón และคณะ (2011) โดยวางชิ้นวุ้น (fungal disc) ขนาด 5 มิลลิเมตร ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* *Rhizopus oligosporus* และ *Penicillium* sp. อายุ 2-5 วัน ตรงกลางผิวหน้าอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) แล้วขีดเชื้อแบคทีเรียทดสอบความยาว 2 เซนติเมตร (เพาะเลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง) บนผิวหน้าอาหารทั้ง 4 ด้าน ห่างจากชิ้นวุ้นเชื้อราด้านละ 2.5 เซนติเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท โดยมีเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่ลงเชื้อแบคทีเรียทดสอบเป็นชุดควบคุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-5 วัน สังเกตผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราเทียบกับชุดควบคุมแล้ววัดรัศมีการเจริญของเชื้อรา คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยราโดยใช้สูตรดังนี้ PIRG = (R1 – R2)/R1 × 100 เมื่อ R1 = รัศมีของเชื้อในชุดควบคุม และ R2 = รัศมีของเชื้อที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียทดสอบ คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่แสดงความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราทดสอบ 5 ลำดับแรก สำหรับการทดสอบในขั้นถัดไป

การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราของเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่คัดเลือก

การทดสอบในขั้นนี้ทำตามวิธีการของ Sivanantham และคณะ (2013) โดยดูดสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ของเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงบนอาหาร NA) ลงบนผิวหน้าอาหาร PDA เกลี่ยเชื้อให้ทั่วด้วยเทคนิค spread plate จากนั้นวางชิ้นวุ้นของเชื้อราลงบนผิวหน้าอาหาร PDA บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อราในจานทดสอบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรีย ทุกชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราของสารกรองที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่คัดเลือก

การทดสอบในขั้นนี้ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ ทำตามวิธีการของ Sivanantham และคณะ (2013) โดยเติมหัวเชื้อปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ในฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์ (10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที) นำส่วนใสมากรองด้วยหัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน และนำมาเจือจางด้วยอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อรา อัตราส่วนของส่วนใสต่ออาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อรา เป็น 1 : 50 (ปริมาตร/ปริมาตร) เทอาหาร PDA ที่เติมส่วนใสลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นวางชิ้นวุ้นของเชื้อราบริเวณกึ่งกลางผิวหน้าอาหารทดสอบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน โดยมีจานเพาะเชื้อราที่เติมอาหาร NB เป็นชุดควบคุม คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ทุกชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่คัดเลือก

นำแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกมาตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (Zhao et al., 2013) เตรียมเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว NB บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยดกล้าเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงตรงกลางผิวหน้าอาหาร Carboxy methyl cellulose (CMC) เชื้อละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสโดยเทสารละลายไอโอดีนให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วจึงดูดออก จากนั้นวัดบริเวณใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียต่อเชื้อรา

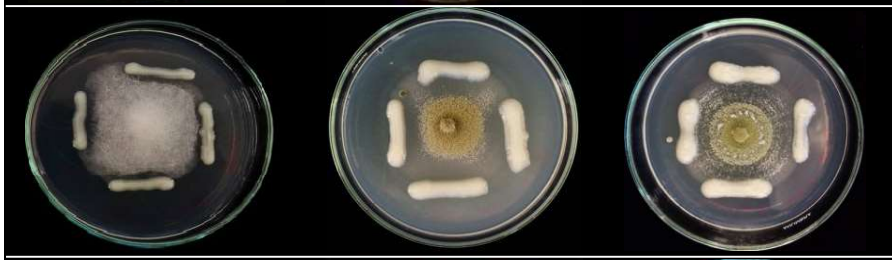
การศึกษาความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินสวนผลไม้ทั้ง 169 ไอโซเลท ต่อเชื้อรา *Aspergillus, Rhizopus* และ *Penicillium* ซึ่งเป็นสกุลของเชื้อราที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม บางชนิดเป็นเชื้อก่อโรคพืช หรือเป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อโรคพืช มีผลทำให้เกิดความเสียหายและลดปริมาณผลผลิตทางการเกษตร (Jaibangyang et al., 2020) โดยมีรายงานว่าเชื้อราในจีนัส *Aspergillus* และ *Penicillium* มักทำให้เกิดโรคในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Aspergillus* หลายชนิดที่ผลิตอัลฟาทอกซิน (ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2554) ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน โดยมีแบคทีเรีย จำนวน 4 ไอโซเลท ที่ยับยั้ง *A. oryzae* และแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Penicillium* sp. ได้ในช่วง 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป นอกจากนี้มีแบคทีเรียจำนวน 7, 1 และ 2

ไอโซเลทที่ยับยั้งเชื้อรา *R. oligosporus, A. oryzae* และ *Penicillium* sp. ได้ในช่วง 41-50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ รหัสไอโซเลท MaB01-6, MaB01-12, KaB02-2, NaB01-7 และ SoB02-3 ที่สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ทั้ง 3 ชนิด หรือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราชนิดใดชนิดหนึ่งตั้งแต่ 40 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปไว้สำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป ซึ่งแสดงรูปและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราแต่ละชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลทที่คัดเลือก ดังตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หลายจีนัสมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้งานต่อไป โดยศึกษาการควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ๆ ในพืชเศรษฐกิจของจันทบุรี เช่น เชื้อราไฟทอปโทรา ราสีชมพู และอื่น ๆ รวมทั้งทดสอบคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ในการส่งเสริมการเจริญของพืช เพื่อให้ได้สายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติเป็น multifunctional PGPR ซึ่งเหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นหัวเชื้อเพื่อนำไปใช้งานในพื้นที่เกษตรกรรม สอดคล้องกับรายงานของ Uzair และคณะ (2018) ที่รายงานการคัดแยกแบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* จำนวน 18 สายพันธุ์จากตัวอย่างดินชายฝั่งของ Balochistan ประเทศปากีสถาน ในจำนวนนี้มี 4 สายพันธุ์ที่มีผลยับยั้งเชื้อราทดสอบ *Rhizopus microsporus, Fusarium oxysporum, Aspergillus niger, Alternaria alternata,* และ *Penicillium digitatum* และทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชในระดับห้องปฏิบัติการของ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ต้นแบบ โดยมี *Ps. aeruginosa* PS24 ที่มีคุณสมบัติหลายประการในการส่งเสริมการเจริญของพืชจากการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของแบคทีเรียทั้ง 169 ไอโซเลทที่คัดแยกจากดินสวนผลไม้

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา	**จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่ยับยั้งเชื้อรา**		
	R. oligosporus	*A. oryzae*	*Penicillium* sp.
50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป	0	4	1
41 – 50	7	1	2
31 – 40	3	5	2
21 – 30	19	3	6
11 – 20	20	14	17
1 - 10	0	24	17
0	120	118	124
รวม	**169**	**169**	**169**

ตารางที่ 2 รูปแสดงการยับยั้งเชื้อราแต่ละชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่คัดเลือก

รหัสไอโซเลท	*R. oligosporus*	*A. oryzae*	*Penicillium* sp.
Control			
MaB01-6			
MaB01-12			
MaB01-6			
MaB01-12			
SoB02-3			

หมายเหตุ: Control หมายถึง เชื้อราที่ไม่ได้เพาะเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (ชุดควบคุม)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราแต่ละชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่คัดเลือก

รหัสไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา		
	R. oligosporus	*A. oryzae*	*Penicillium* sp.
MaB01-6	41.16 ± 0.90	52.15 ± 0.84	54.29 ± 0.00
MaB01-12	31.43 ± 0.67	40.27 ± 0.39	41.43 ± 2.02
KaB02-2	47.07 ± 0.78	20.83 ± 1.79	16.67 ± 0.00
NaB01-7	47.07 ± 0.78	50.00 ± 0.00	23.09 ± 0.59
SoB02-3	47.07 ± 0.78	33.33 ± 0.00	36.11 ± 0.94

ประสิทธิภาพของเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่คัดเลือกและสารกรองที่ปราศจากเซลล์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา

ผลการทดลองพบว่าเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้สูงกว่าสารกรองที่ปราศจากเซลล์ซึ่งแสดงค่าการยับยั้งได้น้อยมากหรือไม่ยับยั้ง (ตัวอย่างผลทดสอบในภาพที่ 1) ซึ่งเซลล์ของไอโซเลท MaB01-6 ยับยั้งการเจริญของเส้นใย *R. oligosporus* และ *A. oryzae* ได้สูงที่สุด โดยมีค่า 73.80 ± 1.68 และ 78.33 ± 2.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท NaB01-7 ให้ค่าการยับยั้ง *Penicillium* sp. ได้สูงที่สุดโดยมีค่า 91.81 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) ผลที่ได้จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราต้องเกิดควบคู่กับการเจริญของเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ เป็นไปได้ว่ากลไกการยับยั้งอาจเกิดจากการสร้างสารระเหย เช่น แอมโมเนีย ไฮโดรเจนไซยาไนด์ สอดคล้องกับรายงานของ Senthilkumar และคณะ (2021) ที่รายงานฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชของสารระเหยที่สร้างจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ จากการทดสอบด้วยวิธี Dual Plate เช่นเดียวกับ Choub และคณะ (2022) ซึ่งรายงานว่าสารระเหยอินทรีย์ที่ผลิตจาก *Bacillus velezensis* CE 100 มีผลทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Colletotrichum gloeosporioides* รวมถึงลดเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์และการเจริญเส้นใยของเชื้อราสายพันธุ์นี้ได้ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่แสดงผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

(ก) (ข) (ค)

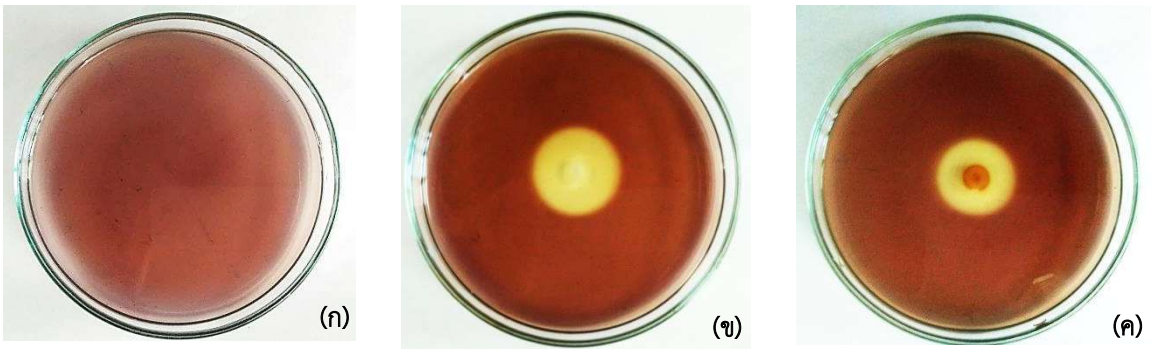
ภาพที่ 1 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* sp. ของ (ก) ชุดควบคุม เทียบกับ (ข) เซลล์แบคทีเรีย NaB01-7 และ (ค) สารกรองที่ปราศจากเซลล์

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของเซลล์แบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกและสารกรองที่ปราศจากเซลล์

เชื้อรา / รหัสไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา					
	R. oligosporus		*A. oryzae*		*Penicillium* sp.	
	เซลล์	สารกรองที่ปราศจากเซลล์	เซลล์	สารกรองที่ปราศจากเซลล์	เซลล์	สารกรองที่ปราศจากเซลล์
MaB01-6	73.80 ± 1.68	7.79 ± 0.00	78.33 ± 2.36	18.97 ± 1.19	51.56 ± 1.37	6.58 ± 0.03
MaB01-12	58.26 ± 0.98	2.56 ± 0.00	50.10 ± 0.83	14.67 ± 1.21	43.61 ± 2.55	6.59 ± 0.00
KaB02-2	49.02 ± 3.45	0.00 ± 0.00	70.29 ± 0.79	11.78 ± 0.47	60.93 ± 3.67	6.63 ± 0.04
NaB01-7	46.61 ± 0.98	9.08 ± 1.67	49.57 ± 0.61	20.06 ± 1.75	91.81 ± 0.00	9.87 ± 0.04
SoB02-3	57.32 ± 0.05	0.00 ± 0.00	48.69 ± 0.64	11.61 ± 1.72	62.38 ± 1.79	6.58 ± 0.03

ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่คัดเลือก

นำแบคทีเรียที่ปฏิปักษ์ไอโซเลทที่คัดเลือกมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อรา โดยการหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เป็นกลไกหนึ่งที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (Jaibangyang et al., 2020) ผลการทดลองพบว่ามี 2 ไอโซเลทที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยเกิดวงใสรอบหยดเชื้อ ได้แก่ ไอโซเลท NaB01-7 มีวงใสกว้าง 27.20 ± 0.07 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2ข) และไอโซเลท MaB01-12 มีวงใสกว้าง 20.00 ± 0.03 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2ค) ส่วนรหัสไอโซเลท MaB01-6, KaB02-2 และ SoB02-3 ไม่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส นอกจากนี้พบว่าเชื้อ MaB01-12, MaB01-6 และ NaB01-7 สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทดังกล่าว (ไม่แสดงผลการทดสอบ) สอดคล้องกับรายงานของ Memenza-Zegarra และ Zúñiga-Dávila (2021) ที่รวบรวมสายพันธุ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 26 สายพันธุ์จากดินรากถั่วที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช *Sclerotinia, Fusarium* และ *Rhizoctonia* เนื่องจากสามารถผลิตทั้งสารระเหยและสารที่ไม่ระเหย เช่น เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน เซลลูโลส และไคติน ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา รวถึงสามารถสร้างไซเดอโรฟอร์และไลโพเปปไทด์ที่มีสมบัติยับยั้งเชื้อรา (Antifungal lipopeptide)



ภาพที่ 2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง CMC (ก) ชุดควบคุมแบบลบ (negative control) โดยการหยด Nutrient broth (ข) ไอโซเลท NaB01-7 (ค) ไอโซเลท MaB01-12

สรุป

แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ในงานวิจัยนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* และ *Penicillium* sp. ได้ตั้งแต่ 40 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป โดยสารกรองที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียไม่แสดงผลการยับยั้ง นอกจากนี้พบว่าบางไอโซเลทของแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยโดยทดสอบการยับยั้งเชื้อราไฟทอปโทราซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่เข้าทำลายทุเรียนซึ่งเป็นไม้ผลเศรษฐกิจหลักของจังหวัดจันทบุรีหรือเชื้อราก่อโรคชนิดอื่น ๆ ศึกษากลไกการยับยั้ง รวมทั้งทดสอบคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ในการส่งเสริมการเจริญของพืช เพื่อให้ได้ไอโซเลทของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติเด่นทั้งในด้านการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคไม้ผลและส่งเสริมการเจริญของพืชได้หลากหลาย ซึ่งเหมาะสมต่อการขยายการผลิตเพื่อพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์การเกษตรสำหรับการใช้งานของเกษตรกร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนักศึกษาที่มีส่วนร่วมในการทำวิจัย และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ที่สนับสนุนในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือสำหรับการศึกษาวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2564. **วิธีการเก็บตัวอย่างดินที่ถูกต้องเพื่อการวิเคราะห์**. แหล่งที่มา: https://www.doa.go.th/oard5/?p=2632, 23 ตุลาคม 2565.

นริศรา สุวรรณ. 2555. **การแยกและการหาลักษณะเฉพาะของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของพริกกะเหรี่ยง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2560. **โรคทุเรียน**. แหล่งที่มา: http://www. kasetnumchok.com/โรคทุเรียน/, 22 กุมภาพันธ์ 2565.

นุชจรินทร์ นนทรี, วาริณี คุ้มสะอาด, ศิรินันท์ รุ้งเรืองธรรม และสุชาดา สุขประเสริฐ. 2555. **การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพเพื่อการบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปแป้งมัน.** วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

เนตรนภิส เขียวขำ. 2554. **สารพิษจากเชื้อราในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว.** แหล่งที่มา: https://www.phtnet.org/2011/08/96/, 23 ตุลาคม 2565.

วัชรี เสาร์เทพ, อรอุมา เพียซ้าย และ พัชรวิภา ใจจักรคำ. 2560. การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. ที่ปนเปื้อนในอาหาร ผลิตผลทางการเกษตร และดินเพาะปลูก และการสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน บี1. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.** 48(1): 127-138.

สมศิริ แสงโชติ. 2554. **โรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของผักผลไม้ และการจัดการ**. แหล่งที่มา: https://www.phtnet.org/2011/06/94/, 28 ตุลาคม 2565.

ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2554. **สารพิษจากเชื้อราในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว**. แหล่งที่มา: http://www.phtnet.org/article/view-article.asp?aID=44, 28 ตุลาคม 2565.

สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์การค้า. 2563. **ทุเรียน ราชาแห่งผลไม้ไทย ถูกใจคนต่างแดน**. แหล่งที่มา: http://www.tpso.moc.go.th/sites/default/files/thueriiyn_240863.pdf, 28 ตุลาคม 2565.

อำพล พรหมเมศร์, สรัญยา วัลยะเสวี, หัทยา อรุโณทยานันท์, โรเบิร์ต เจมส์ แมกกอฟเวิ่น, รัชดาวรรณ ชีวังกูร และชัยวัฒน์ โตอนันต์. 2562. ประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ *Chaetomium* spp. ต่อ *Phytophthora palmivora* (P-05) สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าทุเรียน. **เก่นเกษตร.** 47(6): 1251-1264.

Choub, V., S. Won, H. B. Ajura and J. Moon. 2022. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Bacillus velezensis* CE 100 against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Horticulture**, 8 Iss 557, p 557.

Hassan, Z. Ul., R. Al. Thani, H. Alnaimi, Q. Migheli and S. Jaoua. 2019. Investigation and application of Bacillus licheniformis volatile compounds for the biological control of toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* spp. **ACS Omega.** 4(17): 17186-17193.

Jaibangyang, S., R. Nasanit and S. Limtong. 2020. Biological control of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* by volatile organic compound-producing antagonistic yeasts. **Biocontrol.** 65, 377-386.

Mageshwaran, V., R. Gupta, R. K. Sahu, P. Tripathi and R. Vishwakarma. (2022). Potential of bacterial endophytes in biological control of soil-borne phytopathogens. *In*: Singh, U.B., Sahu, P.K., Singh, H.V., Sharma, P.K., Sharma, S.K. (eds) **Rhizosphere Microbes.** Microorganisms for Sustainability, 40. Springer, Singapore.

Memenza-Zegarra, M. and D. Zúñiga-Dávila. 2021. Bioprospection of native antagonistic rhizobacteria from the Peruvian Coastal ecosystems associated with *Phaseolus vulgaris*. **Current Microbiology**. https://doi.org/10.1007/s00284-021-02388-.

Petatán-Sagahón, I., M. A. Anducho-Reyes, H. V. Silva-Rojas, A. Arana-Cuenca, A.Tellez-Jurado, I. O. Cárdenas-Álvarez and Y. Mercado-Flores. 2011. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. **International Journal of Molecular Sciences**. 12 (9), 5522-5537.

Senthilkumar, M., N. Amaresan and A. Sankaranarayanan. 2021. Antagonistic activity of volatile compound of bacteria against phytopathogens: dual plate assay. *In*: **Plant-Microbe Interactions**. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0_45.

Singh, S. K., V. K. Singh, P. K. Singh, A. Modi and A. Kumar. 2022. Chapter 13. Microbial antagonists in postharvest management of fruit, pp. 333-346. *In* **Research and Technological Advances in Food Science**. Academic Press.

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

Uzair, B., R. Kausar, S. A. Bano, S. Fatima, M. Badshah, U. Habiba and F. Fasim. 2018. Isolation and molecular characterization of a model antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* divulging *in vitro* plant growth promoting characteristics. **BioMed Research International,** https://doi.org/10.1155/2018/6147380.

Zhao, J., Q. Xue, G. Nui, L. Xue, G. Shen and J. Du. 2013. Extracellular enzyme production and fungal mycelia degradation of antagonistic *Streptomyces* induced by fungal mycelia preparation of cucurbit plant pathogens. **Annals of Microbiology**. 63, 809–812.