Agricultural Sci. J. 34 : 4-6 (Suppl.) : 92-95 (2003) ว. วิทย. กษ. 34 : 4-6 (พิเศษ) : 92-95 (2546)

การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Penicillium* sp. สาเหตุโรคราเขียวจากผิวของผลส้ม

Isolation and Screening of Antagonistic Microorganisms Against *Penicillium* sp. the Causative Agent of Green Mold Disease from Citrus Fruit Surface

ภานุวัตร ลมทวีวงศ์[1] และ อุราภรณ์ สอาดสุด[1]
Phanuwat Lomthaweewong[1] and Uraporn Sardsud[1]

Abstract

Three samples of unidentified fungi, isolated from surface tissue of diseased citrus fruits, P1, P2 and P3, were tested for pathogenicity. Citrus fruits were artificially wounded and separately inoculated with spore suspensions of these samples. The data showed that the test sample P1 was capable of causing moldy rot. The fungus was identified as *Penicillium* sp. A total of 87 epiphytic microorganisms firmly attached to the surfaces of citrus fruits were isolated and screened for antagonistic activity against *Penicillium* sp. P1 on PDA plates by spot testing. Eleven isolates i.e. FPL3, GPL2, GPL8, GPL10, GPL15, GPL23, HPL2, HPL8, OPL1, OPL2 and OPL7 were found to inhibit fungal growth with various sizes of clear zone exhibited on the medium. The most promising isolate, with an average diameter of 33.7 mm in clear zone, GPL10 was identified as *Bacillus* sp. and has the similar characteristics to that of *Bacillus brevis*.

บทคัดย่อ

นำเชื้อราซึ่งแยกจากผิวของผลส้มที่เป็นโรคราเขียวจำนวน 3 ตัวอย่างคือ P1, P2 และ P3 มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค ด้วยการปลูกเชื้อลงบนผิวของผลส้มที่ผ่านการทำแผลแล้ว พบว่าเชื้อราตัวอย่าง P1 สามารถทำให้เกิดโรคราเขียวกับผลส้มได้ เมื่อนำมาวินิจฉัยพบว่าเป็นเชื้อรา *Penicillium* sp. แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดแน่นอยู่บนผิวของผลส้มได้ 87 ไอโซเลท นำมาทดสอบยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* sp. P1 บนอาหาร potato dextrose agar ด้วยวิธี spot test พบเชื้อที่สามารถยับยั้งได้จำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ FPL3, GPL2, GPL8, GPL10, GPL15, GPL23, HPL2, HPL8, OPL1, OPL2 และ OPL7 โดยการให้วงใส (clear zone) ขนาดต่างๆ กันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อไอโซเลท GPL10 ให้วงใส ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยกว้างที่สุด เท่ากับ 33.7 มิลลิเมตร เมื่อนำมาบ่งบอกชนิดพบว่าเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Bacillus brevis*

คำนำ

โรคราเขียวเป็นโรคที่พบได้บ่อยในส้มหลังการเก็บเกี่ยว มีสาเหตุมาจากการเข้าทำลายของเชื้อราในจีนัส *Penicillium* วิธีที่เกษตรกรผู้ปลูกส้มนิยมใช้ในการควบคุมโรคดังกล่าวคือการใช้สารเคมี แต่สารเคมีที่ใช้นั้นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้มีราคาแพง นอกจากนี้ยังอาจเกิดอันตรายต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภคด้วย

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้กัน โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งนอกจากจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้แล้ว ยังสามารถมีชีวิตรอดและเพิ่มปริมาณได้มาก เมื่อได้รับอาหารหรือเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การควบคุมเชื้อก่อโรคจึงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ต่างจากการใช้สารเคมีที่ให้ผลในการควบคุมโรค ในระยะสั้นๆ แล้วหมดฤทธิ์ไป ต้องคอยฉีดพ่นบ่อยครั้ง ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีและค่าแรงงาน

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวของผลส้ม มาทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคราเขียวในส้ม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

นำเชื้อราซึ่งแยกจากผิวของผลส้มที่เป็นโรคจำนวน 3 ตัวอย่างคือ P1, P2 และ P3 จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยนำผลส้มไปล้างด้วยน้ำไหลก่อน ตาม

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[1] Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

ด้วยการเช็ดผิวผลด้วยสำลีจุ่ม 70% ethanol แล้วจึงนำไปทำแผลด้วย inoculator ให้มีพื้นที่ 5x5 mm^2 ลึก 1 mm ผลละ 3 ตำแหน่ง นำ paper disc เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm ที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่ม spore suspension ของเชื้อราตัวอย่าง ($2x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) แล้ววางลงบนแผลที่ทำไว้ เชื้อละ 2 ผล นำส้มที่ปลูกเชื้อแล้วไปวางใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้อง (25±2 °ซ.) ตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคทุกวันเป็นเวลา 14 วัน

2. การระบุชนิดของเชื้อราก่อโรค

นำเชื้อราตัวอย่างที่ก่อโรคราเขียวบนผลส้มมาเพาะลงบนจานอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีไปทำ wet mount เพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำแนกเชื้อราในระดับจีนัสโดยใช้ Key to genera producing penicilli (Pitt & Hocking, 1997) และระบุชนิดของเชื้อราก่อโรคนั้นโดยอาศัยลักษณะและขนาดของโคโลนีบนจานอาหาร Czapek yeast extract agar (CYA) และ malt extract agar (MEA) รวมถึงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ Key to subgenera of *Penicillium* และ Key to *Penicillium* subgen. *Penicillium* species (Pitt & Hocking, 1997)

3. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวของผลส้ม

ล้างผลส้ม (สายพันธุ์ฟรีมองต์ ผิวทอง โอเชี่ยน และสายน้ำผึ้ง) ด้วยน้ำไหล แล้วนำไปใส่ลงในบีกเกอร์ซึ่งมีน้ำกลั่นปริมาตร 200 ml นำบีกเกอร์ไปวางใน ultrasonic bath (Branson 2210) เพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวของผลส้มเป็นเวลา 10 นาที ใช้ปิเปตดูดสารละลายในบีกเกอร์ไปหยดลงบนจานอาหาร PDA แล้วกระจายเชื้อด้วยวิธี Spread plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำโคโลนีที่มีลักษณะของโคโลนีต่างกันไป restreak จนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บเป็น stock cultures

4. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรค

Primary screening

ใช้ cotton swab จุ่ม spore suspension ของเชื้อราก่อโรค แล้วนำไป swab บนจานอาหาร PDA ขีดตารางบนก้นจานเพาะเชื้อให้มีช่องสำหรับเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่มีพื้นที่เท่า ๆ กัน จำนวน 9 ช่องต่อ 1 จานด้วยปากกาเขียนแก้ว แตะเชื้อลงบนอาหารตรงจุดกึ่งกลางของช่องที่ขีดไว้ช่องละ 1 เชื้อ ทำซ้ำเชื้อละ 3 จาน นำจานอาหารไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค โดยดูว่ามีการสร้างวงใสหรือไม่

Secondary screening

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้วงใสไปทดสอบเพื่อยืนยันผลการยับยั้งอีกครั้งโดยการเพาะเชื้อแต่ละไอโซเลทจำนวน 3 จุดบนจานอาหาร PDA หลังจาก spread ด้วย spore suspension ของ *Penicillium* sp. แล้ว ทำซ้ำ 2 จาน นำจานอาหารไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการเกิดวงใสรอบโคโลนี หากมีวงใสเกิดขึ้นครบแสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นทั้ง 6 วง แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย

5. การระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ให้ขนาดของวงใสกว้างที่สุด

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของวงใสกว้างที่สุดมาระบุชนิด โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ขนาด สี ลักษณะเกี่ยวกับแสง และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อย้อมและไม่ย้อมสีแกรม) จำแนกเชื้อจุลินทรีย์ในระดับจีนัส โดยอาศัยลักษณะการติดสีกรัม รูปร่างของเซลล์ การมีหรือไม่มีเอนโดสปอร์ ร่วมกับ Key to genera of endosporeforming bacteria (Norris *et al*., 1981) จากนั้นนำเชื้อมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Catalase test, Voges-Proskauer test (VP-test), Acid from D-glucose, D-xylose และ D-mannitol, Gas from D-glucose, Hydrolysis of starch, Utilization of citrate, Nitrate reduced to nitrite, Formation of indole, Growth at 50 55 และ 65 °ซ.) แล้วนำผลที่ได้มาใช้ในการระบุชนิดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยอาศัย Key to *Bacillus* species (Sneath *et al*., 1996)

ผล

1. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราตัวอย่าง

เชื้อราตัวอย่าง P1 เท่านั้นที่สามารถทำให้เกิดโรคราเขียวบนผลส้มได้ โดยอาการของโรคในช่วงสัปดาห์แรก เชื้อราจะสร้างเส้นใยสีขาวเป็นจุดๆ รอบบริเวณแผล ในสัปดาห์ที่สองเชื้อราจะสร้างสปอร์สีเขียวเทาบนเส้นใย ทำให้เห็นขอบของโคโลนีที่เป็นเส้นใยไม่ชัดเจน

2. การระบุชนิดของเชื้อราก่อโรค

โคโลนีของเชื้อราก่อโรค P1 บน PDA มีผิวราบ ค่อนข้างละเอียด โคโลนีอายุ 7 วัน บน CYA มีขนาด 38 มิลลิเมตร ผิวเป็นร่องลึกตามแนวรัศมี สำหรับโคโลนีอายุ 7 วัน บน MEA นั้น มีขนาด 37 มิลลิเมตร ผิวเป็นร่องตื้นๆ โคโลนีแผ่ออกเป็นวง จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อนี้มีการสร้าง penicilli ผนังของ stipes ขรุขระ สร้างโคนิเดียรูปร่างกลม ขนาด 4.5 µm phialides มีขนาด 12.2 µm เมื่อนำไปจำแนกในระดับจีนัสพบว่าเป็นเชื้อราในจีนัส *Penicillium* แต่ไม่สามารถระบุชนิดได้เนื่องจากยังมีข้อมูลไม่เพียงพอ

3. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวของผลส้ม

แยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 87 ไอโซเลท โดยแยกได้จากส้มสายพันธุ์ฟรีมองต์ 10 ไอโซเลท ผิวทอง 37 ไอโซเลท สายน้ำผึ้ง 24 ไอโซเลท และโอเชี่ยน 16 ไอโซเลท

4. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรค

เชื้อจุลินทรีย์จำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ FPL3, GPL2, GPL8, GPL10, GPL15, GPL23, HPL2, HPL8, OPL1, OPL2 และ OPL7 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคดังกล่าวได้ โดยให้วงใสขนาดต่างๆ กัน เชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท GPL10 ให้วงใสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยกว้างที่สุด มีขนาดเท่ากับ 33.7 มิลลิเมตร (Figure 1 และ Table 1)

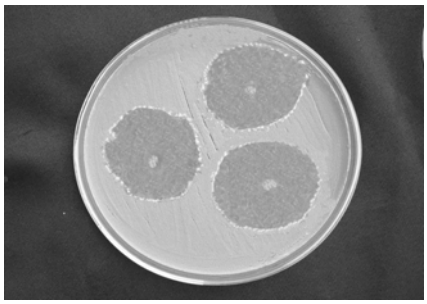

Figure 1 The growth inhibition of GPL10 on *Penicillium* sp. P1 on PDA plate at an ambient temperature for 7 days.

Table 1 The clear zone diameter of 11 microbial isolates after dual cultivation with *Penicillium* sp. P1.

Isolates	FPL3	GPL2	GPL4	GPL5	GPL7	GPL10	HPL2	HPL8	OPL1	OPL2	OPL7
Ø (mm)	9.2	9.8	9.2	22.0	6.0	33.7	9.8	14.8	12.2	10.2	15.0

5. การระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ให้ขนาดของวงใสกว้างที่สุด

เชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท GPL10 มีขนาดของโคโลนีประมาณ 3 มิลลิเมตร ไม่มีสี โปร่งแสง (translucent) เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง ขนาดประมาณ 1.5 µm สร้างเอนโดสปอร์ สำหรับการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าให้ผลบวกกับ Catalase test, Voges-Proskauer test, Acid from D-glucose, D-mannitol, Hydrolysis of strarch, Utilization of citrate, Nitrate reduced to nitrite และ Growth at 50 °ซ. และให้ผลลบกับการทดสอบ Acid from D-xylose, Gas from D-glucose, Formation of indole และ Growth at 55 55 and 65 °ซ. ใช้คุณสมบัติการสร้างเอนโดสปอร์และการให้ผลบวกต่อ Catalase test ในการจำแนกระดับจีนัสโดยใช้คีย์สำหรับแบคทีเรียในจีนัสที่สร้างเอนโดสปอร์ พบว่า เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใด เนื่องจากไม่มีคุณสมบัติที่เหมือนกับแบคทีเรียตัวใดใน Key to *Bacillus* species (Sneath *et al*., 1996) อย่างครบถ้วน

วิจารณ์

เชื้อราตัวอย่าง P1 สามารถก่อโรคราเขียวในผลส้มได้ เชื้อราดังกล่าวอยู่ในจีนัส *Penicillium* และมีลักษณะบางประการที่แตกต่างไปจากลักษณะของเชื้อรา *P. digitatum* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคราเขียวที่ Pitt & Hocking (1997) ได้รายงานไว้ อีกทั้งลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium* sp. P1 ก็แตกต่างจากอาการที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อราดังกล่าวได้ เนื่องจากยังไม่ข้อมูลไม่เพียงพอ **โดยต้องศึกษาลักษณะและขนาดของโคโลนีบนอาหารจำเพาะ ได้แก่** 25% glycerol nitrate agar (G25N) และ neutral creatine sucrose agar (CSN) เชื้อรา *Penicillium* sp. P1 มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคสูง เพราะแม้จะไม่ได้ทำให้ส้มช้ำโดยการโยนหรือทุบส้มก่อนปลูกเชื้อตามวิธีของสาริณี (2545) แต่ก็สามารถทำให้เกิดโรคได้

เชื้อที่แยกได้จำนวน 11 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค *Penicillium* sp. P1 บนจานอาหารได้ โดยพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท GPL10 ให้วงใสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยกว้างที่สุด อย่างไรก็ตาม ควรนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 11 ไอโซเลท ไปศึกษาในขั้นต่อไป เนื่องจากการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพียงเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และวิธี spot test ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ก็เป็นเพียงวิธีการทดสอบเบื้องต้น ซึ่งปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบในแต่ละจุดนั้นไม่เท่ากัน อย่างไรก็ตาม เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความทนทานต่อแรงดันออสโมติกและคลื่นเสียงความถี่สูง โดยจะเห็นได้จากการวิจัยนี้ ซึ่งแยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวของผลส้มในน้ำกลั่น วิธีนี้ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Vinas *et al*. (1997) ซึ่งแยกเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายบัฟเฟอร์

เชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท GPL10 เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากไม่มีคุณสมบัติที่เหมือนกับแบคทีเรียตัวใดใน Key to *Bacillus* species (Sneath *et al*., 1996) อย่างครบถ้วน อย่างไรก็ตาม เชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมีคุณสมบัติคล้าย *B. subtilis* มากที่สุด

สรุป

จากการวิจัย แยกเชื้อจุลินทรีย์จากผิวของผลส้มได้ 87 ไอโซเลท และมี 11 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pencillium* sp. P1 ซึ่งแยกจากผิวของผลส้มที่เป็นโรคราเขียวได้โดยการให้วงใส เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ GPL10 ซึ่งแยกได้จากส้มสายพันธุ์ผิวทอง ที่ให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของวงใสกว้างที่สุดเท่ากับ 33.7 มิลลิเมตร มาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* และมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *B. brevis* มากที่สุด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนในการเสนอผลงานครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สาริณี ประสาทเขตต์กรณ์. 2545. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Norris, J.R., R.C.W. Berkeley, N.A. Logan and A.G. O'Donnell. 1981. Endospore-forming bacteria. *In* Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel (eds.) The Prokaryote: Volume 2. Springer-Verlag. New York. p. 1711.

Pitt, J. and A. Hocking. 1997. Fungi and Food Spoilage. 2nd ed. University Press. Cambridge.

Sneath, P.H.A., N.s. Mair and M.B. Sharpe. 1996. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2. William & Wilkin. Baltimore and Marryland.

Vinas, I., J. Usall, N. Teixido and V. Sanchis. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. Food Microbiology. 40: 9-16.