Agricultural Sci. J. 39 : 3 (Suppl.) : 31-34 (2008) ว. วิทย. กษ. 39 : 3 (พิเศษ) : 31-34 (2551)

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากดินบริเวณบ่อกุ้งเพื่อใช้เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคขั้วหวีเน่าของกล้วยหอมทอง

Selection of Chitinase Producing Bacteria from Soil in Shrimp Farms for Using as Antagonistic Bacterium Against Crown Rot Pathogens of Banana cv. Kluai Hom Thong

กัลยา ศรีพงษ์[1] ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์[1] วาริช ศรีละออง[1] และสุพรรนี อะโอกิ[2]
Kanlaya Srepong[1] Pongphen Jitarerat[1] Varit Srelaong[1] and Supannee Aoki[2]

Abstract

Chitinase producing bacteria from soil in shrimp farms were isolated on Chitin selective agar. Five isolates of bacteria (A5, A23, C23, E9 and F10) showed a large clear zone on the medium about 1.1-1.6 cm in diameter. Chitinase activity of these bacteria was measured, bacterium A23 showed the highest of chitinase activity (0.58 Unit/ml). Ability of the selected bacteria against to crown rot pathogens (*Colletotrichum musae Lasiodiplodia theobromea* and *Fusarium* sp.) of banana cv. Kluai Hom Thong was determined by filter paper disc method. Only bacteria A23 inhibited the mycelial growth of *C. musae* and had higher inhibitory effect to spore germination of *C. musae* than *Fusarium* sp. and *L. theobromea* respectively. The structure of pathogenic mycelium that mixed with bacteria A23 under microscope showed that the mycelium oasef pathogens was swollen, rough and could not proliferate. Thus, this result indicates that bacteria A23 may be used as the antagonistic bacteria for controlling crown rot disease on banana cv. Kluai Hom Thong.

Keywords: Antagonistic bacteria, Banana, Chitinase, Crown rot disease

บทคัดย่อ

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากดินบริเวณบ่อกุ้งบนอาหาร Chitin selective agar พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต (A5 A23 C23 E9 และ F10) ที่เจริญบนอาหารแล้วทำให้เกิดวงใส (clear zone) ขนาดใหญ่ที่สุด คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.1-1.6 เซนติเมตร เมื่อตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส พบว่าแบคทีเรีย A23 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสมากที่สุด (0.58 Unit/ml) การทดสอบความสามารถของเชื้อ แบคทีเรียเหล่านี้ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคขั้วหวีเน่าของกล้วยหอมทอง ได้แก่ *Colletotrichum musae Lasiodiplodia theobromea* และ *Fusarium* sp. ด้วย Filter paper disc method พบว่าแบคทีเรีย A23 สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *C. musae* ได้เพียงเชื้อเดียว และสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. musae* ได้ดีกว่า *Fusarium* sp. และ *L. theobromea* ตามลำดับ เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเชื้อราที่อยู่ร่วมกับแบคทีเรีย A23 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรีย A23 มีผลทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคมีลักษณะบวมพอง ขรุขระ และเส้นใยไม่ยืดยาว ดังนั้นแบคทีเรีย A23 อาจมีความเป็นไปได้ในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อป้องกันโรคขั้วหวีเน่าของกล้วยหอมทองต่อไป

คำสำคัญ: กล้วยหอมทอง, ไคติเนส, แบคทีเรียปฏิปักษ์, โรคขั้วหวีเน่า

[1] สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี / ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ถ. บางขุนเทียนชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กทม. 10150

[1] Division of Postharvest Technology, School of Bioresources and Technology / Postharvest Technology Innovation Center, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkhuntein Rd., Thakham, BangKhuntein, Bangkok 10150

[2] สายวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี, 34000

[2] Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Ubonratchatani Rajabhat University, 34000

คำนำ

โรคขั้วหวีเน่าในกล้วยหอมทองมีสาเหตุจากเชื้อราหลายชนิด เช่น *Lasiodiplodia theobromae, Collectotrichum musae, Fusarium* sp. (ดนัย, 2549) การป้องกันส่วนใหญ่จะใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราเป็นหลัก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการหาวิธีควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้เอนไซม์ไคติเนส (Chitinase) หรือสารปฏิชีวนะอื่นๆ ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นเพื่อต่อต้านเชื้อก่อโรค หรือการใช้เชื้อจุลินทรีย์ ปฏิปักษ์ร่วมกับการควบคุมวิธีอื่นเพื่อให้ผลผลิตคงความสมบูรณ์แข็งแรงยากต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากดินบ่อเลี้ยงกุ้งในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคขั้วหวีเน่าของกล้วยหอมทอง เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากดินบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง

เก็บตัวอย่างดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง บ้านคลองสวน จังหวัดสมุทรปราการ จำนวน 7 บ่อ มาแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการ spread plate ในอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะบนโคโลนีเดี่ยวแล้วนำไปแตะบนอาหาร chitin selective agar (อภิญญา และคณะ, 2543) และทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในหน่วยเซนติเมตร

2. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำเชื้อแบคทีเรียที่สร้างวงใสมาเลี้ยงในอาหารเหลว Enzyme production medium (EPM) (Monika และคณะ, 1993) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (รุ่น RC 5C PLUS) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ไปตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสตามวิธีของ Miller (1995) และปริมาณโปรตีนตามวิธี Bradford (1976) รายงานกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในหน่วย Unit/ml

3. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติผลิตเอนไซม์ไคติเนสต่อการเจริญทางเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคขั้วหวีเน่า

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *C. musae L. theobromae* และ *Fusarium* sp. ด้วยวิธี Filter paper disc (Dhingra และ Sinclair, 1995) และต่อการงอกของสปอร์ โดยนำสปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่ความเข้มข้น $2x10^5$ spore/ml ผสมกับน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) หรือเชื้อแบคทีเรีย A23 ที่ความเข้มข้น $5x10^8$ cell/ml ในอัตราส่วน 1:3 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที ตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า หลังจากบ่มนาน 0 6 12 18 24 และ 30 ชั่วโมง และรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อรา

ผลการทดลองและวิจารณ์

เชื้อแบคทีเรียจากดินบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งจำนวน 223 ไอโซเลต มีเพียง 21 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสในอาหาร Chitin selective agar โดยพบว่าแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่แบคทีเรีย A5, A23, C23, E10 และ F9 สร้างวงใส (clear zone) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่าไอโซเลตอื่นๆ (1.1-1.6 เซนติเมตร) (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เมื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรีย A23 มีกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดคือ 0.58 Unit/ml รองลงมาได้แก่แบคทีเรีย A5 E10 C23 และ F9 (0.39 0.38 0.35 และ 0.15 Unit/ml) (ไม่ได้แสดงข้อมูล) สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติผลิตเอนไซม์ไคติเนสต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคขั้วหวีเน่าด้วยวิธี Filter paper disc บนอาหาร PDA พบว่าแบคทีเรีย A23 สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *C. musae* ได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบ paper disc เท่ากับ 1.75 เซนติเมตร แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* และ *Fusarium* sp. ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ อภิญญา และคณะ (2543) พบว่าเชื้อ *Bacillus cereus* H11 ซึ่งผลิตเอนไซม์ chitinase ได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporiodes* ได้แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* ได้ นอกจากนี้การที่แบคทีเรีย A23 สามารถยับยั้ง *C. musae* ได้ดี อาจเนื่องจากแบคทีเรีย A23 สามารถผลิตสารเมตา

โบไลต์ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *C. musae* ได้ดี Wen-Teish และคณะ (2006) พบว่าเชื้อ *Bacillus cereus* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใย *F. oxysporum F. solani* และ *P. ultimum* ได้ ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากเอนไซม์ไคติเนสที่เชื้อสร้างขึ้นเพื่อย่อยเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค หรือเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสร่วมกับสารอื่นๆ เช่น สารปฏิชีวนะ Zwittermicin A (Silo-Suh และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ชนิดอื่นที่สามารถสร้างสารทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราได้ เช่น กลูแคนเนส โปรติเอส และ เซลลูเลส ส่วนแบคทีเรีย A5 C23 E10 และ F9 นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคทั้งสามชนิดได้ โดยไม่พบวงใสรอบๆ paper disc อภิญญา (2543) ระบุว่าผลการยับยั้งเชื้อราที่แตกต่างกันอาจเนื่องจากเชื้อราแต่ละชนิดมีโครงสร้างในการสืบพันธุ์แตกต่างกัน และเมื่อศึกษาผลของแบคทีเรีย A23 ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคขั้วหวีเน่า พบว่าแบคทีเรีย A23 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราทั้งสามชนิดได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่น) ($p \leq 0.01$) โดยสามารถยับยั้งการงอกของ *C. musae* ได้ดีที่สุด ในขณะที่สปอร์ของเชื้อรา *C. musae L. theobromae* และ *Fusarium* sp. ที่เลี้ยงในน้ำกลั่นมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 100% ในชั่งโมงที่ 30 18 และ 24 แต่เมื่อเชื้อราเหล่านี้อยู่ในสภาพที่มีแบคทีเรีย A23 ร่วมด้วย พบว่า สปอร์ของเชื้อราเหล่านี้มีการงอกเท่ากับ 44.33% 64% และ 65% ตามลำดับ (รูปที่ 2) จากการศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีลักษณะบวม ขรุขระ ไม่ยืดยาวออกไป และมีเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย A23 เจริญอยู่รอบๆ เส้นใยของเชื้อรามากมาย (รูปที่ 1) เช่นเดียวกับ Wen-Tao และคณะ (2007) พบว่าเส้นใยของเชื้อรา *Botrytis cinerea* มีการบวมพอง ขดงอ และไม่เจริญยืดยาวออกไปเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ผสมไคโตซาน

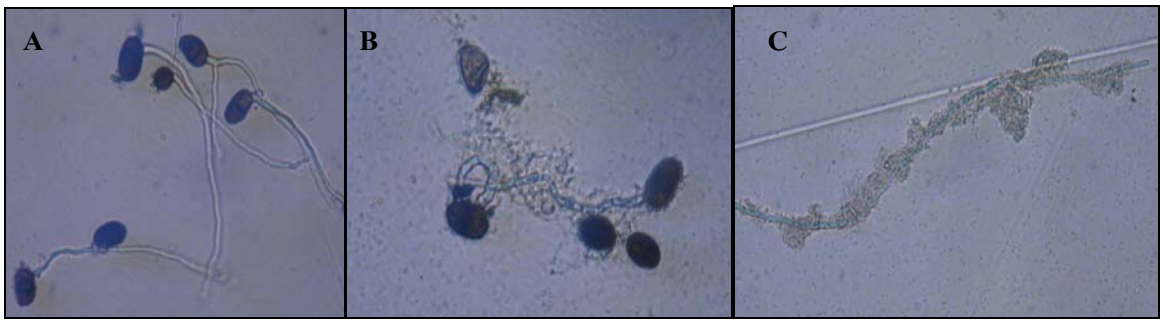

Fig. 1 Effect of bacteria isolate A23 on fungal mycelium of *L. theobromae* (A) mycelium of *L. theobromae* grew on PDA (Control) (B, C) mycelium of *L. theobromae* grew together with bacteria isolate A23

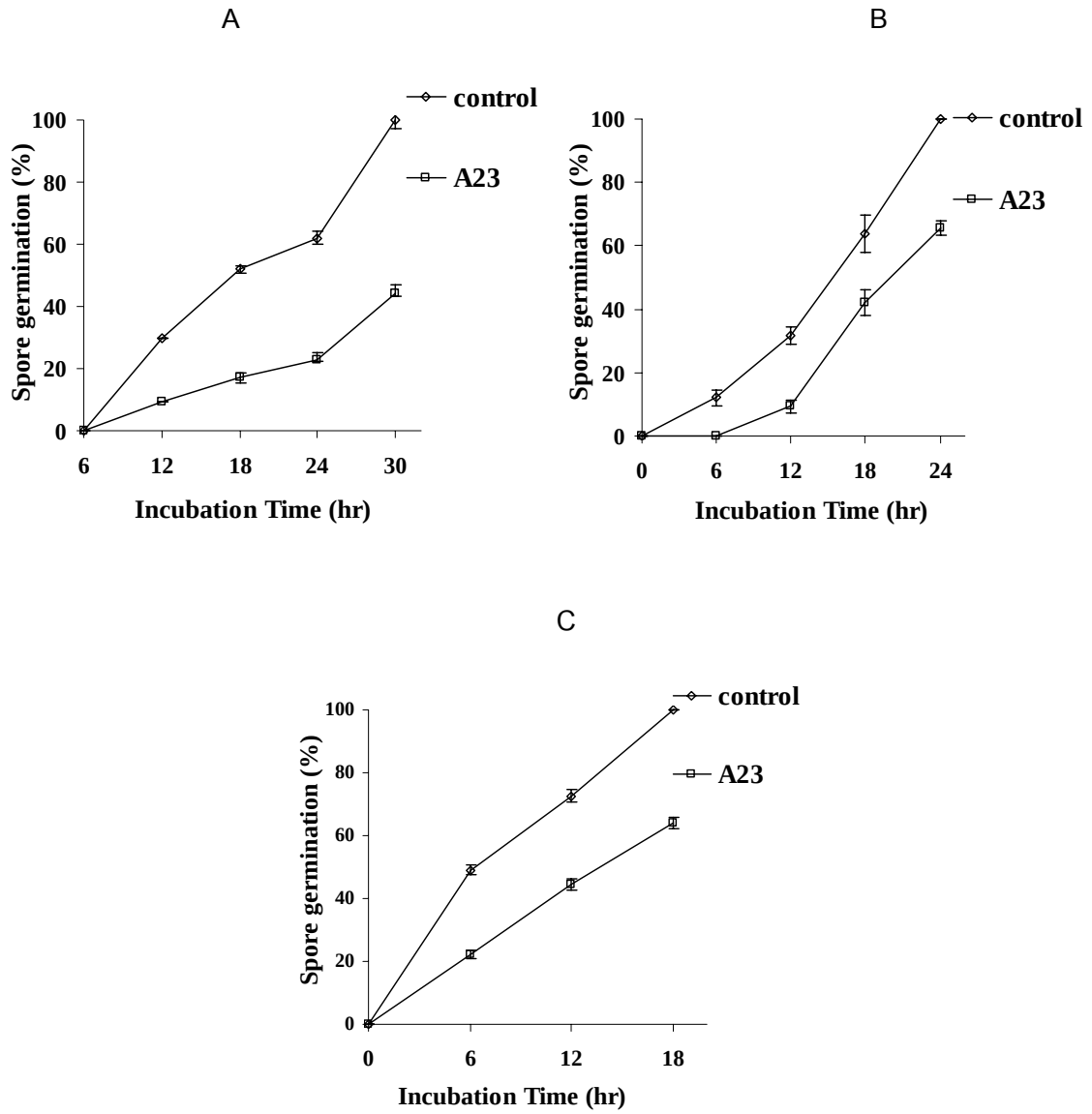

Fig. 2 Effect of bacteria isolate A23 on spore germination of *C. musae* (A) *Fusarium* sp. (B) and *L. theobromae* (C) ($p \leq 0.01$)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ และอาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษา ตลอดจนเพื่อนนักศึกษาทุกคนที่คอยช่วยเหลืองานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ดนัย บุญยเกียรติ, 2549, โรคหลังการเก็บเกี่ยวของผักและผลไม้, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ, หน้า 145-197.

อภิญญา ผลิโกผล, ศิริลาภา สมานมิตร และ ปฏิพันธ์ นันทขว้าง, 2543, การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในมะม่วงและส้มโดยแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Wen-Tao, X., Kun-Lun, H., Feng, G., Wei, Q., Jia-Jia, Y., Zhi-Hong, L. and Yun-Bo, Luo., 2007, Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*, Postharvest Biology and Technology, 46 : 86–94.

Wen-Teish, C., Yu-Chung C. and Chia-Ling Jao., 2006, Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* on shellfish chitin wastes, Bioresource Technology, 98:124–130.