Agricultural Sci. J. 42 : 3 (Suppl.) : 97-100 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 3 (พิเศษ) : 97-100 (2554)

การประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BCB3-19 เพื่อควบคุมโรคผลเน่าจากราสีเทาของมะเขือเทศหลังเก็บเกี่ยว

The application of an antagonistic bacterium, *Bacillus subtilis* strain BCB3-19, to control gray mold rot of tomato after harvest

ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล[1]
Sirirat Siripornvisal [1]

Abstract

In this study, an antagonistic bacterium, *Bacillus subtilis* strain BCB3-19, was evaluated for its effectiveness on the biological control of gray mold rot of tomato during storage under mimetic commercial conditions. Results from the pilot study showed that immersion of harvested tomato in cell suspension of BCB3-19 could significantly reduce the incidence and severity of gray mold disease of tomato under both storage conditions at 4 °C and 20 °C. Results from this study led to the conclusion that the antagonistic bacterium BCB3-19 had the potential to be used as a biocontrol agent against gray mold disease on tomato fruit after harvest.
Keywords: antagonistic bacteria, gray mold, tomato

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ทำการประเมินประสิทธิผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิบักษ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BCB3-19 ในการควบคุมโรคเน่าราสีเทาของมะเขือเทศระหว่างเก็บรักษาภายใต้สภาพเลียนแบบการเก็บรักษามะเขือเทศในระดับการค้า ผลการศึกษาพบว่า การแช่ผลมะเขือเทศในเซลล์แขวนลอยของเชื้อ BCB3-19 สามารถลดอัตราการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคราสีเทาของมะเขือเทศหลังเก็บเกี่ยวได้อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งภายใต้สภาพการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 20 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BCB3-19 มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ควบคุมโรคราสีเทาบนผลมะเขือเทศหลังการเก็บเกี่ยวได้
คำสำคัญ: แบคทีเรียปฏิปักษ์ ราสีเทา มะเขือเทศ

คำนำ

การควบคุมโรคเน่าของผักและผลไม้สดด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จัดเป็นวิธีควบคุมทางชีวภาพ ที่กำลังได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เพราะเป็นวิธีที่มีความปลอดภัยและยั่งยืนกว่ากรรมวิธีทางเคมี ซึ่งในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีความพยายามอย่างต่อเนื่องในการค้นหาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้ในควบคุมโรคเน่าของพืชผลต่าง ๆ จนนำมาสู่การค้นพบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สายพันธุ์ใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เคยมีการศึกษาพบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อราที่มีฤทธิ์สูง โดยเฉพาะสารประเภทเพปไทด์และไลโพเพปไทด์ (Leclère *et al*., 2005) และนอกจากคุณสมบัติด้านการควบคุมโรคพืชแล้ว *B. subtilis* ยังมีคุณสมบัติอื่น ๆ ที่เหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะคุณสมบัติด้านความปลอดภัย เนื่องจาก *B. subtilis* เป็นเชื้อแบคทีเรียได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัยต่อมนุษย์ (generally recognized as safe: GRAS) (Teo and Tan, 2005) และยังมีการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. subtilis* บางสายพันธุ์มีสมบัติที่เหมาะจะใช้เป็นโปรไบโอติกส์สำหรับมนุษย์ด้วย (Pinchuk *et al*., 2001; Sorokulova *et al*., 2008) จากคุณสมบัติดังกล่าว ผู้วิจัยจึงเห็นว่าเชื้อ *B. subtilis* น่าจะมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับควบคุมโรคเน่าในพืชผักและผลไม้สด การวิจัยนี้จึงได้นำเอาเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ BCB3-19 (Siriponvisal, 2010) มาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าราสีเทาบนมะเขือเทศหลังเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Botrytis cinerea* ภายใต้สภาพเลียนแบบการเก็บรักษามะเขือเทศในระดับการค้า เพื่อประเมินศักยภาพการใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา เลขที่ 96 ถนนโรจนะ อ.พระนครศรีอยุธยา จ.พระนครศรีอยุธยา 13000
[1] Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University, 96 Rojana Rd., Phranakhon Si Ayutthaya 13000

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วิธีเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อ *B. subtilis* BCB3-19 จากคลังเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา มาเตรียมเซลล์แขวนลอยโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อชะโคโลนีของเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 48 ชั่วโมง จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์เป็น 2 ระดับ คือ 5×10^6 และ 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

นำเชื้อรา *Botrytis cinerea* จากคลังเชื้อราโรคพืช สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา นำมาเตรียมสปอร์แขวนลอย โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ผสมสาร Tween 20 ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ชะสปอร์ของเชื้อ *B. cinerea* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 15 วัน จากนั้นกรองผ่านแผ่นกระดาษเซ็ดเลนส์ แล้วปรับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยเป็น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2. การทดลอง

เก็บผลมะเขือเทศที่ระยะเริ่มสุก ที่มีสภาพสมบูรณ์ นำมาล้างและฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (0.016 โมลต่อลิตร) 3 นาที และล้างด้วยน้ำปะปา 3 รอบ จากนั้นนำผลมะเขือเทศทั้งหมดไปแช่ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *B. cinerea* นาน 1 นาที แล้วนำมาผึ่งอากาศให้แห้ง จากนั้นนำไปใช้ทดสอบใน 6 ตำรับการทดลอง ตำรับละ 50 ผล ดังนี้

1 **ตำรับควบคุม** นำไปจุ่มในน้ำเปล่านาน 10 นาที สำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลล์เซียส

2 **ตำรับทดลอง** นำไปจุ่มในเซลล์แขวนลอยของเชื้อปฏิปักษ์ ความเข้มข้น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที สำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลล์เซียส

3 **ตำรับทดลอง** นำไปจุ่มในเซลล์แขวนลอยของเชื้อปฏิปักษ์ ความเข้มข้น 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที สำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลล์เซียส

4 **ตำรับควบคุม** นำไปจุ่มในน้ำเปล่านาน 10 นาที สำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลล์เซียส

5 **ตำรับทดลอง** นำไปจุ่มในเซลล์แขวนลอยของเชื้อปฏิปักษ์ ความเข้มข้น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที สำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลล์เซียส

6 **ตำรับทดลอง** นำไปจุ่มในเซลล์แขวนลอยของเชื้อปฏิปักษ์ ความเข้มข้น 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที สำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลล์เซียส

นำผลมะเขือเทศแต่ละตำรับการทดลองมาผึ่งอากาศให้หมาด แล้วบรรจุในถ้วยพลาสติก ถ้วยละ 1 ผล ปิดด้วยพลาสติกห่ออาหาร และนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 4 หรือ 20 องศาเซลเซียส ทำการตรวจผลในวันที่ 15 ของการเก็บรักษา และประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราสีเทาโดยพิจารณาจากอัตราการติดโรค และความรุนแรงของโรค

การประเมินอัตราการเกิดโรคใช้วิธีนับจำนวนผลมะเขือเทศที่มีการติดโรค คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคเทียบกับตำรับควบคุมตามสมการที่ (1) และ (2) ตามลำดับ

$$DI = \frac{ni}{50} \times 100 \quad \text{----------(1)}$$

$$\%RDI = \frac{(DI_{conrol} - DI_{treated})}{DI_{conrol}} \times 100 \quad \text{------(2)}$$

โดยที่ DI = เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
ni = จำนวนผลมะเขือเทศที่เกิดโรคในตำรับทดลองนั้นๆ
50 = จำนวนผลมะเขือเทศทั้งหมดในตำรับการทดลอง
%RDI = เปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรค

การประเมินความรุนแรงของโรคแบ่งออกเป็น 6 ระดับ ได้แก่ ระดับ 0 ไม่แสดงอาการของโรค ระดับ 1 แสดงอาการของโรค 1-20% ระดับ 2 แสดงอาการของโรค 21-40% ระดับ 3 แสดงอาการของโรค 41-60% ระดับ 4 แสดงอาการของโรค 61-80% และระดับ 5 แสดงอาการของโรค 81-100% จากนั้น คำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคและเปอร์เซ็นต์การลดความรุนแรงของโรคเทียบกับตำรับควบคุมตามสมการที่ (3) และ (4) ตามลำดับ

$$DS = \frac{\sum(ns \times s)}{n \times 5} \times 100 \quad \text{----------(3)}$$

$$\%RDS = \frac{(DS_{conrol} - DS_{treated})}{DS_{conrol}} \times 100 \quad \text{--(4)}$$

โดยที่ DS = เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค
ns = จำนวนผลมะเขือเทศที่เกิดโรคในระดับความรุนแรงนั้นๆ
s = ระดับความรุนแรงของการเกิดโรค
n = จำนวนผลมะเขือเทศที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด
5 = ระดับการเกิดโรคสูงสุด
%RDS = เปอร์เซ็นต์การลดความรุนแรงของโรค

3. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองข้างต้นดำเนิน 3 รอบการทดลองที่เป็นอิสระจากกัน นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) สำหรับเชื้อแต่ละชนิดหรือไอโซเลตด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 10

ผลและวิจารณ์ผล

ก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยเคยทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* BCB3-19 ในการควบคุมเชื้อรา *B. cinerea* เชื้อสาเหตุโรคเน่าราสีเทาของมะเขือเทศหลังเก็บเกี่ยว พบว่าเชื้อ BCB3-19 สามารถยับยั้งเชื้อรา *B. cinerea* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในชุดทดลองแบบ *in vitro* และ *in vivo* (Siriponvisal, 2010) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวเป็นเพียงการทดลองระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น จึงยังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนว่าเชื้อ BCB3-19 มีศักยภาพเพียงพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในระดับการค้าหรือไม่ ดังนั้น การทดลองนี้จึงเป็นการขยายผลการทดลองสู่ระดับนำร่อง โดยทำทดลองภายใต้สภาพเลียนแบบการเก็บรักษามะเขือเทศหลังเก็บเกี่ยวในระดับการค้า (mimetic commercial conditions) ประกอบด้วยสภาพแวดล้อมการเก็บรักษาที่อุณหภูมิปกติ (20 องศาเซลเซียส) และสภาพแวดล้อมการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเกิดโรคเน่า (disease incidence: DI) และความรุนแรงของโรค (disease severity: DS) บนผลมะเขือเทศในตำรับควบคุมที่เก็บรักษาโดยผ่านการล้างด้วยน้ำธรรมดา กับตำรับทดลองที่เก็บรักษาโดยผ่านการล้างและจุ่มในเซลล์แขวนลอยของเชื้อ BCB3-19 ผลการทดลองเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าดังแสดงใน Figure 1A พบว่าการจุ่มผลมะเขือเทศในเซลล์แขวนลอยของเชื้อ BCB3-19 สามารถลดอัตราการเกิดโรคราสีเทาได้ ทั้งที่ระดับอุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส และเมื่อพิจารณาตาม Figure 1B ยังเห็นได้ว่า โรคราสีเทาที่เกิดกับผลมะเขือเทศในตำรับการทดลองที่จุ่มเชื้อ BCB3-19 มีความรุนแรงน้อยกว่าตำรับควบคุมที่ไม่ผ่านการจุ่มเชื้อก่อนเก็บรักษา จึงเป็นการบ่งชี้ในเบื้องต้นว่า การจุ่มผลมะเขือเทศในเซลล์แขวนลอยของเชื้อ BCB3-19 สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้

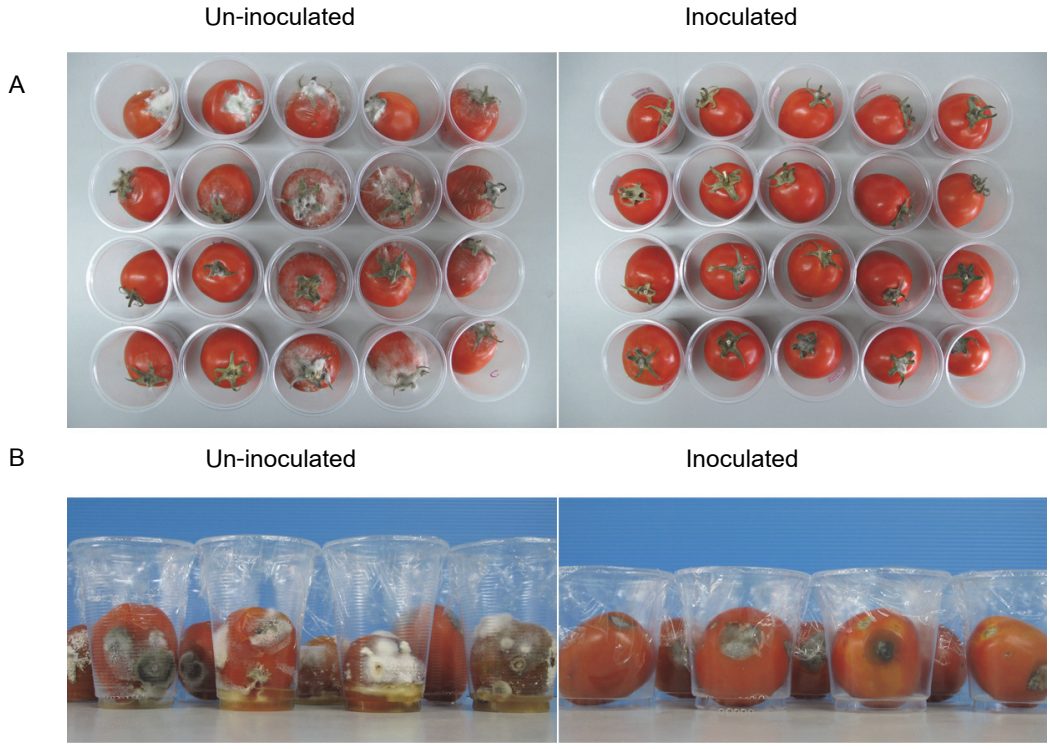

Figure 1 Photographs demonstrate the incidence and severity of gray mold rot on tomato fruits from un-inoculated and inoculated treatements; (A) compare the incidence of gray mold rot on tomato fruits from an un-inoculated treatment and from an inoculated treatment which 10^6 cfu/ml of BCB-19 was applied; (A) compare the severity of gray mold rot on tomato fruits from an un-inoculated treatment and from an inoculated treatment which 10^6 cfu/ml of BCB-19 was applied.

เมื่อนำข้อมูลจากการสังเกตมาคำนวณเป็นประสิทธิภาพการควบคุมโรคดังที่ระบุ Table 1 และ Table 2 จะเห็นได้ว่าการจุ่มมะเขือเทศในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย BCB3-19 สามารถลดความอัตราการเกิดโรค และระดับความรุนแรงของโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยประสิทธิภาพการควบคุมโรคจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเชื้อปฏิปักษ์ ซึ่งในการวิจัยนี้ พบว่าความเข้มข้นของเชื้อ BCB3-19 ที่ระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถลดอัตราการเกิดโรคราสีเทาได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าเชื้อ BCB3-19 สามารถควบคุมโรคราสีเทาบนมะเขือเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Table 1 Effectiveness of BCB3-19 in the control of tomato gray mold under at 4 °C

Treatments	Disease control indices			
	DI (%)	RDI (%)	DS (%)	RDS (%)
un-inoculated (control)	75.7[a]	0.0[a]	56.4[a]	0.0[a]
inoculated (10^6 cfu/ml)	25.3[b]	66.6[b]	10.0[b]	82.3[b]
inoculated (10^8 cfu/ml)	0.0[c]	100.0[c]	0.0[c]	100.0[c]

Data of the same column marked with different letters are significantly different (P<0.05)

DI = disease incidence; **RDI** = reduction of disease incidence;

DS = disease severity; **RDS**, (reduction of disease severity)

Table 2 Effectiveness of BCB3-19 in the control of tomato gray mold under at 20 °C

Treatments	Disease control indices			
	DI (%)	RDI (%)	DS (%)	RDS (%)
un-inoculated (control)	50.3[a]	0.0[a]	38.0[a]	0.0[a]
inoculated (10^6 cfu/ml)	17.7[b]	64.8[b]	7.2[b]	81.1[b]
inoculated (10^8 cfu/ml)	0.0[c]	100.0[c]	0.0[c]	100.0[c]

Data of the same column marked with different letters are significantly different (P<0.05)

DI = disease incidence; **RDI** = reduction of disease incidence;

DS = disease severity; **RDS**, (reduction of disease severity)

สรุป

จากผลการศึกษาทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* BCB3-19 สามารถควบคุมโรคราสีเทาบนมะเขือเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ควบคุมโรคราสีเทาบนผลมะเขือเทศหลังการเก็บเกี่ยวในระดับการค้า

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์วิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา สำหรับความเอื้อเฟื้อด้านเครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช)

เอกสารอ้างอิง

Leclère, V., M. Béchet, A. Adam, J.-S. Guez, B. Wathelet, M. Ongena, P. Thonart, F. Gancel, M. Chollet-Imbert and P. Jacques. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Appl. Envi. Microbiol. 71(8): 4577- 4584.

Pinchuk, I. V., P. Bressollier, B. Verneuil, B. Fenet, I.B. Sorokulova, F. Mégraud and M.C. Urdaci. 2001. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45: 3156-3161.

Siripornvisal S. 2010. Biocontrol efficacy of *Bacillus subtilis* BCB3-19 against tomato gray mold. KMITL Sci. Tech. J. 10(2): 37-44

Sorokulova, I. B., I.V. Pinchuk, M. Denayrolles, I.G. Osipova, J.M. Huang, S.M. Cutting and M.C. Urdaci. 2008. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. Digestive Diseases and Science 53: 954-963

Teo, A. Y. L. and H.M. Tan. 2005. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a novel strain of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tracts of healthy chickens. Appl. Envi. Microbiol. 71: 4185-4190.