Agricultural Sci. J. 34 : 4-6 (Suppl.) : 84-87 (2003) ว. วิทย. กษ. 34 : 4-6 (พิเศษ) : 84-87 (2546)

การคัดเลือกแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดที่เป็นปฏิปักษ์ต่อ *Penicillium* spp. บนผลส้ม

Selection of Bacteria from Some Food Products Antagonistic to *Penicillium* spp. on Citrus Fruit

สุรศักดิ์ เตชะเอ้ย[1] **และ อุราภรณ์ สอาดสุด**[1]
Surasak Tae-cha-oey[1] and Uraporn Sardsud[1]

Abstract

Thirty three isolates of bacteria from food products were cultivated with 3 isolates of *Penicillium* spp., the causal agents of green mold disease of citrus on potato dextrose agar. A bacterial isolate, KTV3 which has been isolated from vinegar was capable to inhibit the growth of these molds. Microscopic observation revealed that the mold's hyphae near the inhibition zone were thicker and more vacuolar. The morphological and biochemical studies on KTV3 indicated that this bacterium was *Bacillus* sp.

บทคัดย่อ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากผลิตภัณฑ์อาหารจำนวน 13 ไอโซเลท และ *Penicillium* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท ที่เป็นสาเหตุของโรคราเขียวในส้มมาเพาะร่วมกันแบบ dual culture บนอาหาร potato dextrose agar พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท KTV3 ซึ่งแยกได้จากน้ำส้มพริกดอง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท ได้ดี จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในเส้นใยของราเขียว พบว่าเส้นใยที่บริเวณยับยั้งมีลักษณะบวมและมีผนังหนาขึ้น นำแบคทีเรีย KTV3 มาบ่งบอกชนิดโดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเชื้อนี้คือ *Bacillus* sp.

คำนำ

โรคราสีเขียวจากจีนัส *Penicillium* จะทำให้ผลส้มเน่าเสีย หรืออายุการเก็บรักษาสั้นลง การใช้สารเคมีเพื่อควบคุมโรคนี้ หากใช้ไม่ถูกต้องอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และส่งผลให้เชื้อสาเหตุดื้อยา หรือเกิดสารพิษตกค้างในระบบนิเวศน์ ในปัจจุบันการควบคุมโดยชีววิธีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกร เพราะมีต้นทุนในการผลิตไม่สูงมากนัก สามารถทำได้เอง การควบคุมโดยชีววิธีที่นิยมกันในปัจจุบันคือ การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เชื้อปฏิปักษ์ที่ดีเมื่อทำลายเชื้อสาเหตุโรคแล้วยังจะสามารถมีชีวิตอยู่รอดตามธรรมชาติได้ และไม่ก่อให้เกิดมลพิษในธรรมชาติ การควบคุมโดยชีววิธีจึงช่วยลดปริมาณการซื้อสารเคมีกำจัดศัตรูพืชจากต่างประเทศ งานวิจัยนี้ได้ทดสอบการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคส้มโดยชีววิธี โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้จากอาหารหมัก ซึ่งน่าจะปลอดภัยต่อผู้บริโภค

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกและรวบรวมแบคทีเรียปฏิปักษ์จากผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด

ชั่งอาหารแข็ง (ถั่วเน่าและแหนม) อย่างละ 10 กรัม และปิเปตอาหารเหลว (น้ำส้มพริกดองและโยเกิร์ต) อย่างละ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด medical flask ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันประมาณ 3-5 นาที เจือจางสารละลายจนถึงความเจือจาง 10^{-6} นำไปทำ spread plate บนจานอาหาร nutrient agar (NA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 2 วัน จนเชื้อมีการเจริญเต็มที่ จากนั้นเลือกแบคทีเรียที่เจริญได้ดีและสร้างโคโลนีแตกต่างกันแยกเก็บไว้บน nutrient agar slant แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 2 วัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 °ซ. เพื่อทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อไป

2. การทดสอบและคัดเลือกแบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์ต่อการเจริญเติบโตของ *Penicillium* spp.

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก (30 ไอโซเลท) และจากภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (3 ไอโซเลท) มาเลี้ยงใน nutrient broth (NB) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 1 วัน และเตรียมเชื้อรา *Penicillium* spp. ที่จะใช้ในการทดสอบโดยนำเชื้อราดังกล่าวที่ได้มาจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (3 ไอโซเลท) มาเลี้ยงบนจานอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่มี 25% lactic acid 1-2 หยด ด้วยวิธี streak plate บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน เติม 1% Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนจาน

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

อาหารเพาะเชื้อ *Penicillium* spp. นับจำนวนสปอร์ด้วย haemacytometer ให้ได้ความเข้มข้น $2x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร ทดสอบความเป็นปฏิปักษ์โดย swab spore suspension ของ *Penicillium* spp. แต่ละไอโซเลทมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร PDA ให้กระจายทั่วถึง ใช้ปากคีบจับ paper disc จุ่มเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NB แต่ละหลอดวางลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่ผ่านการ swab เชื้อ *Penicillium* spp. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดของวงใสโดยเลือกวงใสที่ชัดเจนใกล้เคียงกับโปรคลอราซ แล้วนำเส้นใยในบริเวณใกล้เคียงวงใสมาทำสไลด์สดตรวจดูลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์เทียบกับเส้นใยปกติ

3. การระบุชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท KTV3

นำแบคทีเรีย KTV3 ที่คัดเลือกไว้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ นำผลที่ได้มาพิจารณาตามลักษณะที่ระบุไว้ในคีย์ (Sneath *et al*., 1996) เพื่อระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของเชื้อต่อไป

ผล

1. ผลการแยกและรวบรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด

สามารถแยกแบคทีเรียได้ 30 ไอโซเลท และได้รับจากคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่อีก 3 ไอโซเลท ให้ชื่อตั้งต้นของแต่ละไอโซเลทว่า KT ได่แก่ แบคทีเรียจากน้ำส้มพริกดอง (KTV) 5 ไอโซเลท จากถั่วเน่า (KTS) 10 ไอโซเลท จากโยเกิร์ต (KTY) 6 ไอโซเลท จากแหนม (KTP) 9 ไอโซเลท จากถั่วเน่าอุตสาหกรรมเกษตร (KTBS) 1 ไอโซเลท จากโยเกิร์ตอุตสาหกรรมเกษตร (KTLB) 1 ไอโซเลท และจากวุ้นมะพร้าวอุตสาหกรรมเกษตร (KTAX) 1 ไอโซเลท

2. ผลการทดสอบและคัดเลือกแบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Penicillium* spp.

นำแบคทีเรียมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Penicillium* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจานเพาะเชื้อ พบว่าแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของ *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 3 และ *Penicillium* sp. B ได้ 10 8 และ 11 ไอโซเลท ตามลำดับ และมีเพียง 2 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลทได้ โดยการสร้างวงใส (Table 2) และเมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้งเชื้อราโปรคลอราซ และ PDB พบว่าความกว้างของวงใสจาก KTV3 จะมีค่าใกล้เคียงกับสารยับยั้งเชื้อราโปรคลอราซที่ความเข้มข้น 500 ppm

Table 2 Efficiency of antagonistic bacteria isolated from food products on growth of *Penicillium* spp. exhibited as clear inhibition zone.

Isolates	Food Products	Inhibition zone (cm)		
		Penicillium sp. 1	*Penicillium* sp. 2	*Penicillium* sp. 3
KTV2	Vinegar with chili	1.80	1.20	2.65
KTV3	Vinegar with chili	2.30	3.80	4.75
KTS7	Fermented soybean	-	0.75	0.60
KTS8	Fermented soybean	0.55	-	-
KTY3	Yogurt	0.55	-	0.60
KTY5	Yogurt	0.55	-	-
KTY6	Yogurt	-	0.70	-
KTP8	Fermented Pork	-	0.65	-
KTBS	Fermented soybean from Faculty of Agroindustry, CMU	-	0.55	0.60
Prochloraz 250 ppm	-	3.00	3.30	3.10
Prochloraz 500 ppm	-	3.50	3.70	4.20
PDB	-	-	-	-

Note - means no clear zone developed.

เมื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อราบริเวณที่ถูกยับยั้งพบว่า เส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเทาออกขาว เมื่อนำไปทำ slide แบบ wet mount แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีลักษณะบวม และงอ เมื่อเทียบกับเชื้อราบริเวณที่ไม่ถูกยับยั้ง (Figure 1 และ Figure 2)

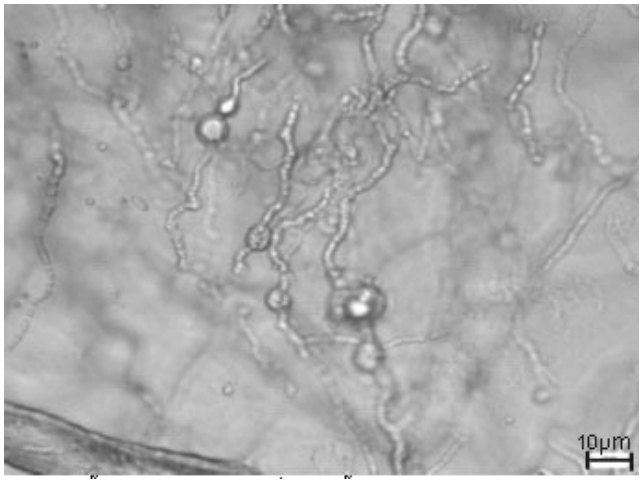

Figure 1 Swollen mycelia of *Penicillium* sp.1 near inhibition zone of antagonistic bacterium isolate KTV3 on PDA.

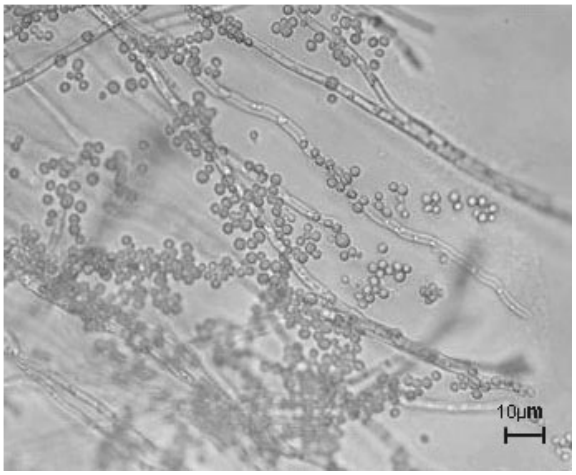

Figure 2 Normal mycelia and conidia of *Penicillium* sp. 1 from 5 days colony on PDA.

3. การระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท KTV3

จากการนำแบคทีเรียไอโซเลทที่ KTV3 มาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม พบว่าแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง มีเอนโดสปอร์ และเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน เมื่อนำ KTV3 ไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีได้แก่ Catalase test, Citrate utilization test, Gelatin liquefaction test, VP-test, Nitrate reduction, Starch hydrolysis, การใช้น้ำตาลและการเกิดกรดใน glucose, L-arabinose, D-mannitol และการเจริญที่อุณหภูมิ 25 30 37 และ 45 °ซ. เมื่อนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่กล่าวไว้ในรูปวิธานของ (Sneath *et al*., 1996) ทำให้ทราบว่า KTV3 คือ *Bacillus* sp.

จากการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียแอนตาโกนิสต์ ไอโซเลท KTV3 เมื่อนำไปย้อมการติดสีเอนโดสปอร์พบว่า ตัวเซลล์จะติดสีแดง ส่วนสปอร์จะติดสีเขียว

วิจารณ์

การวิจัยได้นำอาหารจากแหล่งต่างๆ มาใช้ในการแยกแบคทีเรีย บนอาหาร nutrient agar (NA) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่นำมาแยกเหมาะสมสำหรับการวิจัยในครั้งนี้ เพราะไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค แบคทีเรียที่แยกได้เหมาะสมสำหรับการทำวิจัยครั้งนี้ เพราะสามารถยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้ แต่เชื้อนี้อาจเป็นเพียงเชื้อที่ปนเปื้อนมากับพริกดอง และอาจมี toxin ซึ่งควรมีการตรวจสอบกันต่อไป

KTV3 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้ดี โดยสร้างสารบางอย่างออกมา โดยดูได้จากความกว้างของวงใสซึ่งน่าจะเป็นสารพวกกรด หรือสารปฏิชีวนะ และสอดคล้องกับการวิจัยของสุรชัย (2546) ซึ่งได้ศึกษาแบคทีเรียแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมักดอง พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้สามารถผลิตกรดแลคติคออกมายับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้จากการสร้างวงใส นอกจากนี้ในงานวิจัยของอมรรัตน์ (2544) ได้แยกแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงจากผลไม้เพื่อใช้ในการผลิตกรดน้ำส้ม พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ 60 ไอโซเลท สามารถสร้างกรดออกมาโดยดูลักษณะของวงใส เมื่อนำไประบุชื่อวิทยาศาสตร์ อยู่ในจีนัส *Acetobacter* และ *Gluconobacter*

เมื่อนำบริเวณปลายเส้นใยที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียไอโซเลท KTV3 มาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ พบว่าเส้นใยมีลักษณะผิดปกติ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของวาสนา (2545) ที่ได้นำเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. มาทดสอบกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดินใต้ต้นมะม่วงพบว่าเส้นใยมีลักษณะบวมและมีผนังหนา จากการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท KTV3 คือ *Bacillus* sp. จึงน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาในการควบคุมโรคพืชชนิดอื่นต่อไปในอนาคต ในการทำวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรค green mold บนส้ม ซึ่งได้ทำการทดลอง ในจานเพาะเชื้อเท่านั้น หากนำไปประยุกต์ใช้จริงจะต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยหลายๆ อย่างประกอบกัน เช่น การหาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ เป็นต้น

สรุป

1. การนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากผลิตภัณฑ์อาหารจำนวน 13 ไอโซเลท และ *Penicillium* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท ที่เป็นสาเหตุของโรคราเขียวในส้มมาเพาะร่วมกันแบบ dual culture บนอาหาร potato dextrose agar พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท KTV3 ซึ่งแยกได้จากน้ำส้มพริกดอง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท ได้ดี

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในเส้นใยของราเขียว พบว่าเส้นใยที่บริเวณยับยั้งมีลักษณะบวมและมีผนังหนาขึ้น

3. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย KTV3 พบว่าเป็น *Bacillus* sp.

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนในการเสนอผลงานครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

วาสนา บริรักษ์. 2545. การคัดเลือกแบคทีเรียแอนทาโกนิสต์ของเชื้อโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วง. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุรชัย เตชะเอ้ย. 2546. ผลการยับยั้งของแลคติคแอสิดแบคทีเรียต่อการเจริญของ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในการเพาะเลี้ยงร่วมกัน. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อมรรัตน์ หมอยาดี. 2544. การแยกเชื้อน้ำส้มสายชูที่ทนอุณหภูมิสูงจากผลไม้เพื่อใช้ในการผลิตกรดน้ำส้ม. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Sneath, P.H.A., N.S. Mair and M.B. Sharpe. 1996. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Volumn 2. William & Wilkin. Baltimore and Maryland.