การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว

Screening of Lactic Acid Bacteria for Inhibition of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Causing Leaf Blight Disease in Rice

ชุติมา วงษ์ไพศาล[1,2] สุธิดา ไตรบุตร์[1,2] พุทธพร ส่องศรี[3] และ มาลี ศรีสดสุข[4]
Chutima Wongpaisarn[1,2] Suthida Traibut[1,2] Puttaporn Songsri[3] and Malee Srisodsuk[4]

Abstract

In this research, 109 lactic acid bacterial isolates were screened from various Thai-fermented foods. All bacterial isolates were tested for inhibition of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing leaf blight disease in rice by paper disc agar diffusion method. It was found that 4 isolates, namely, HD1-1, HD1-3, PS1-9 and PS1-10 could successfully inhibit the growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. They were classified based on 16S rDNA analysis, and it was found that isolates, HD1-1 and HD1-3 were *Lactobacillus plantarum* while isolate PS1-9 was *Enterococcus faecium* and isolate PS1-10 was *Enterococcus* sp.

Keywords: Bacterial Leaf Blight Disease, Lactic Acid Bacteria, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand
[2] ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา
[2] Center for Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand
[3] สาขาชีวเคมีวิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
[3] Biochemistry Division, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand
[4] สาขาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
[4] Microbiology Division, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand
รับเรื่อง: ตุลาคม 2553
* Corresponding author: faasmls@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้แยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดองชนิดต่างๆ ได้ทั้งหมด 109 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว โดยวิธี paper disc agar diffusion method พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 4 ไอโซเลทได้แก่ HD1-1, HD1-3, PS1-9 และ PS1-10 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ดี ได้จัดจำแนกเชื้อโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท HD1-1และ HD1-3 คือ *Lactobacillus plantarum* ไอโซเลท PS1-9 คือ *Enterococcus faecium* และ ไอโซเลท PS1-10 คือ *Enterococcus* sp.

คำนำ

โรคขอบใบแห้ง(bacterial leaf blight) เป็นโรคข้าวที่ระบาดมากในเขตชลประทานของภาคกลาง พบทั่วไปในเขตภาคเหนือ ภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย และพบทั่วไปในประเทศที่ปลูกข้าวในแถบทวีปเอเชีย ลาตินอเมริกา ตอนเหนือของออสเตรเลีย บางส่วนของแอฟริกาและอเมริกา(Khush *et al*., 1989) เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคคือ *Xanthomonas oryzae* โดยจะทำให้ใบข้าวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีดและกลายเป็นสีน้ำตาลในที่สุด มีลักษณะเหมือนใบไหม้ (leaf blight) มักจะเกิดหยดสีเหลืองขนาดเล็กของเชื้อสาเหตุโรค(bacterial ooze) ออกมาจากผิวใบ หรือที่โคนต้นกล้า ถ้าอาการรุนแรงข้าวจะเหี่ยวแห้งทั้งกอ โรคนี้หากเกิดในระดับปานกลางจะทำให้ผลผลิตลดลงไป 10-20% และในระดับรุนแรงจะทำให้ผลผลิตลดลงถึง 50% โดยทำให้น้ำหนักของเมล็ดลดลงและเมล็ดลีบ(Mew, 1989) พบครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2500 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ในพันธุ์ข้าวขาวเศรษฐีขาวตาแห้ง และข้าวเหนี่ยวก้านพูล(Wijit, 1957) ถูกจัดจำแนกครั้งแรกโดย Fukuoka Prefecture of Japan ในปี ค.ศ. 1884 ซึ่งในครั้งนั้นเชื่อว่ามีสาเหตุมาจากดินเปรี้ยว ต่อมาในปี ค.ศ. 1909 ได้ทำการแยกแบคทีเรียในหยดน้ำจากแผลของใบข้าวที่เป็นโรค และจัดจำแนกพบว่าคือ *Bacillus oryzae* จากนั้นในปี ค.ศ. 1990 ได้มีการจัดจำแนกใหม่เป็น *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Niño-Liu *et al*., 2006)

Xanthomonas oryzae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น มีแฟลกเจลล่า 1 เส้นสำหรับเคลื่อนที่ มีขนาดความยาวเฉลี่ย 1.3-2.1 μm และความกว้างเฉลี่ย 0.5-0.7 μm (ภาพที่ 1A) ปกติเชื้อนี้จะอยู่เดี่ยวๆ หรือจับกันเป็นคู่ บางครั้งพบว่าสามารถเจริญต่อกันเป็นสายยาวได้ ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็งที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบมีลักษณะกลมนูน ผิวเรียบ มีเมือก (ภาพที่ 1B)สร้างรงควัตถุสีเหลืองไม่ละลายน้ำชื่อ xanthomonadin ซึ่งเป็นสาร brominated aryl-polyene และสร้างแคปซูลจาก extracellular polysaccharide(EPS) ซึ่ง EPS มีส่วนสำคัญในการสร้างหยดของเหลวที่ไหลซึมออกมาจากใบที่เป็นโรคเพื่อป้องกันการแห้งและยังช่วยในการแพร่กระจายของเชื้อโดยอาศัยลมและฝน เชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* เจริญโดยใช้ออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะสม 25 - 30°C ช่วง pH ที่เหมาะสมคือ 6.0-6.5 (Mizukami and Wakimoto, 1969; Ou, 1972; Swings, 1990; Niño-Liu *et al*., 2006)

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria, LAB) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมหรือเป็นท่อน ต้องการพลังงานสำหรับการเจริญจากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลชนิดต่างๆโดยแบ่งกลุ่มจากผลผลิตการหมักกลูโคส ได้เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม homofermentative ซึ่งได้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว และกลุ่ม heterofermentative ซึ่งได้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ เอธานอล หรือกรดอะซิติก แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยในการนำไปใช้ในอาหาร (generally recognized as safe,

GRAS) มีบทบาทสำคัญในการผลิตอาหารหมักดอง และการถนอมอาหารเนื่องจากสามารถสร้างกรด และ bacteriocin สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารและช่วยในด้านรส กลิ่น สี และเนื้อสัมผัสของอาหารให้ดีขึ้น ช่วยให้ร่างกายย่อยสลายได้ง่ายขึ้น และช่วยเพิ่มคุณค่าทางอาหาร (Mogensen, 1993) เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถกำจัดจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ดังนั้นจึงน่าสนใจในการนำมาใช้กำจัดโรคพืชเพื่อลดการใช้สารเคมี

ในการทดลองนี้ จึงได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญ

อุปกรณ์และวิธีการ

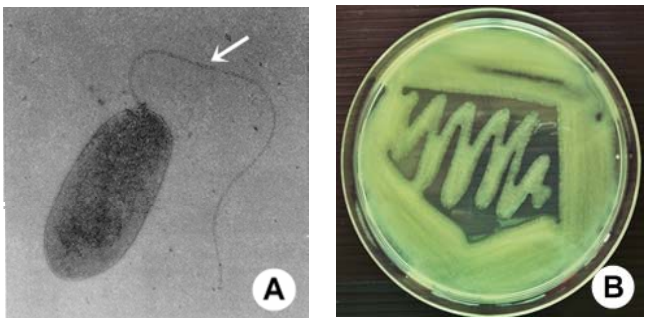
การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

แยกแบคทีเรียกรดแลคติก จากอาหารหมักดอง เช่น ปลาส้ม หมูส้ม แหนม หอยดอง ผักเสี้ยนดอง โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง De Man Rogosa and Sharpe (MRS) ที่ผสม bromcresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อที่เจริญและสร้างกรด เปลี่ยนสีอาหารจากน้ำเงินม่วงเป็นเหลือง นำเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว

เลี้ยงเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* CR 1-5 จากพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 105 ได้รับจากศูนย์วิจัยข้าวเชียงราย ในอาหาร Nutrient Glucose Broth (NGB) โดยใช้ incubator shaker ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปเจือจางให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{600} เท่ากับ 0.2 เกลี่ยให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหาร Nutrient Glucose Agar (NGA) ผึ่งให้แห้ง เตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปเจือจางให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{600} เท่ากับ 0.2

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยวิธี paper disc agar diffusion method (Anonymous, 1953) โดยใช้กระดาษตาปลา (paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm วางลงบนผิวหน้าอาหาร NGA ที่เกลี่ยเชื้อ *X. oryzae* จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกลงบนแผ่นกระดาษตาปลา ปริมาตร 5 µl โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม (control) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ตรวจและบันทึกผลการทดลองโดยวัดความกว้างบริเวณใสของการยับยั้ง (inhibition zone)



ภาพที่ 1 แฟลกเจลาของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* (A) และลักษณะโคโลนีของเชื้อ *X. oryzae* บนอาหารแข็ง (B)

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าวด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยวิธี paper disc agar diffusion method โดยวางกระดาษตาปลา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm ลงบนผิวหน้าอาหาร NGA ที่เกลี่ยเชื้อ *X. oryzae* ตามวิธีข้างต้น จากนั้นหยดน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียกรดแลคติกที่กรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 µm ปริมาตร 5 µl ลงบนแผ่น กระดาษตาปลา เปรียบเทียบกับ 0.1% V-bactcine โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ตรวจและบันทึกผลการทดลองโดยวัดความกว้างบริเวณใสของการยับยั้ง

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าวโดยใช้กรดอินทรีย์

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค ด้วยกรดอินทรีย์ โดยวิธี paper disc agar diffusion method เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น โดยหยดสารละลายกรดแลคติกและกรดอะซิติก ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ปริมาตร 5 µl บนกระดาษ ตาปลาบนอาหาร NGA ที่เกลี่ยเชื้อ *X. oryzae* เปรียบเทียบกับ 0.1% V-bactcine โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ตรวจและบันทึกผลการทดลองโดยวัดความกว้างบริเวณใสของการยับยั้ง

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์ไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มจำนวนในส่วนของ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer 27F 5'-AGA GTT TGA TC[A,C] TGG CTC AG-3' และ 1492R 5'-GG[C,T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3' โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที ทำปฏิกิริยา 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซิส นำแถบดีเอ็นเอไปทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) นำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

ผลและวิจารณ์

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

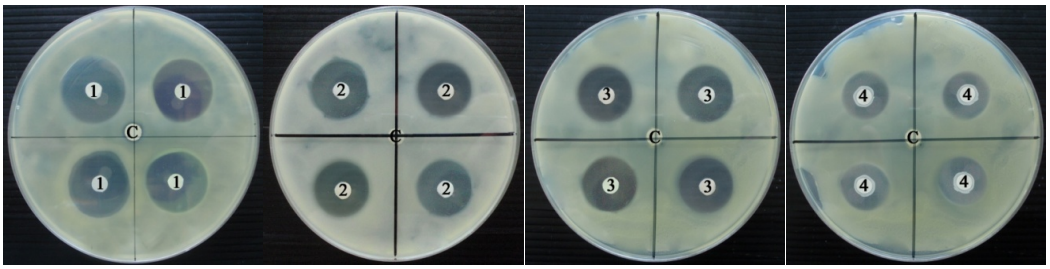
จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวและอาหารหมักดองชนิดต่างๆ เช่น โยเกิร์ต, นมเปรี้ยว, หมูส้ม, แหนม ปลาส้ม, แหนมตุ้ม, ปลาร้า, ปูเค็ม, หอยดอง, ไส้กรอกอีสาน, ผักกาดดอง, มะนาวดอง, ผักเสี้ยนดอง และหน่อไม้ดอง จำนวนทั้งหมด 24 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกเชื้อที่เจริญและสร้างกรดบนอาหาร MRS ที่เติม bromcresol purple เป็นอินดิเคเตอร์โดยเปลี่ยนสีอาหารจากน้ำเงินม่วงเป็นเหลืองได้ จำนวน 109 ไอโซเลท (ตารางที่ 1)

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าวโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติก 109 ไอโซเลทที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยวิธี paper disc agar diffusion method พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 84 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท HD1-1, HD1-3, PS1-9 และ PS1-10 ที่แยกได้จากหอยดองและปลาส้ม แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคได้สูงสุด

ตารางที่ 1 ชนิดตัวอย่างที่นำมาแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

ชนิดตัวอย่าง	รหัสเชื้อที่แยกได้	จำนวนไอโซเลท
โยเกิร์ต	(YD, YF)	4
นมเปรี้ยว	(B, Y)	2
หมูส้ม	(MS1, MS2)	15
แหนมปลาส้ม	(PS1, PS2)	16
แหนมตุ้ม	(HMT1, HMT2)	13
แหนมแท่ง	(HM1, HM2, HM3)	33
ไส้กรอกอีสาน	(ES)	4
ปลาร้า	(PR)	1
ปูเค็ม	(PK)	2
หอยดอง	(HD1, HD2)	14
ผักกาดดอง	(PKD)	0
มะนาวดอง	(MND)	0
ผักเสี้ยนดอง	(PSD)	5
หน่อไม้ดอง	(NMD)	0
รวม		109



ภาพที่ 2 บริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่เลี้ยงบนอาหาร NGA โดยแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท HD1-1(1) HD1-3(2) PS1-9 (3) PS1-10 (4) เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น (C)

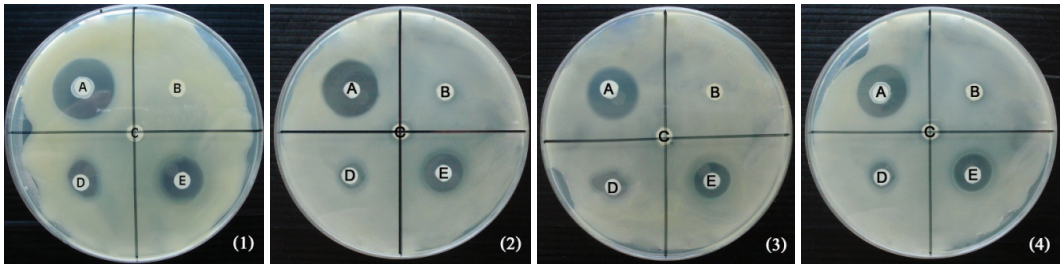
โดยให้ความกว้างบริเวณใสของการยับยั้ง 13.0, 11.0, 11.0 และ 10.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 2) สอดคล้องกับการทดลองของ Visser และคณะ (1986) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ เช่น *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis, L. sake, L. hilgardii, Leuconostoc mesenteroides* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ *Xanthomonas campestris, Erwinia carotovora*, และ *Pseudomonas syringae* ได้

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าวโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ

นำแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท HD1-1, HD1-3, PS1-9 และ PS1-10 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ได้ดี มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อและน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อเปรียบเทียบกับ 0.1% V-bactcine ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ป้องกันและกำจัดโรคพืช ซึ่งมียาปฏิชีวนะ streptomycin และ penicillin เป็นองค์ประกอบ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ดีกว่าสารละลาย 0.1% V-bactcine ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้(ภาพที่ 3) ซึ่งแสดงว่า กลไกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืชเกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก

การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าวด้วยกรดอินทรีย์

ทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยใช้กรดอะซิติก กรดแลคติก และ V-bactcine โดยวิธี paper disc agar diffusion method พบว่ากรดอะซิติกความเข้มข้น 20% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ กรดแลคติกความเข้มข้น 20% และกรดอะซิติกความเข้มข้น 15% ตามลำดับ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้ดีกว่า V-Bactcine 0.1% (ตารางที่ 2, ภาพที่ 4) แสดงให้เห็นว่ากลไกที่แบคทีเรียกรดแลคติกยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* เกิดขึ้นเนื่องจากกรดที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้น ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม homofermentative จะผลิตกรดแลคติกจากการหมักย่อยกลูโคส ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม heterofermentative ได้ผลผลิตทั้งกรดแลคติกและกรดอะซิติก โดยกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นมานั้นมีผลในการยับยั้งการขนส่งสารแบบ active transport และทำลายสมดุลความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Cleveland *et al.* 2001) การสะสมของกรดส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงซึ่งจะมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ไม่ทนกรด

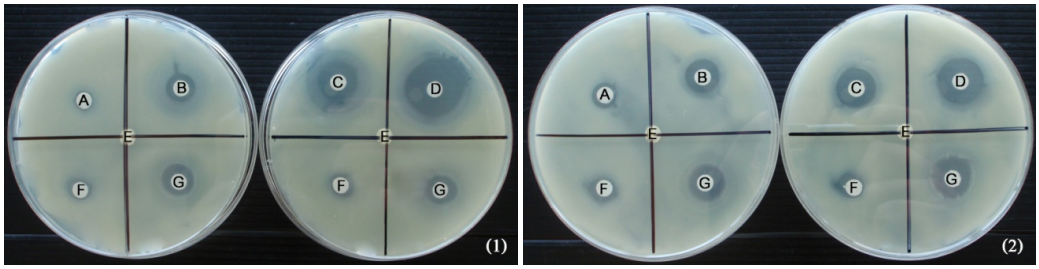


ภาพที่ 3 บริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่เลี้ยงบนอาหาร NGA โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (A) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเชื้อ (B) ของไอโซเลท HD1-1(1), HD1-3(2), PS1-9 (3) PS1-10 (4) เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น (C) และสารละลาย 0.1% V-bactcin (E)

ตารางที่ 2 ความกว้างบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งของข้าว โดยใช้กรดอินทรีย์ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ 0.1% V-bactcine เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NGA หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

สารทดสอบ	ความกว้างบริเวณใสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)
5% กรดอะซิติก	1.0
10% กรดอะซิติก	6.0
15% กรดอะซิติก	10.0
20% กรดอะซิติก	16.0
5% กรดแลคติก	3.5
10% กรดแลคติก	7.0
15% กรดแลคติก	9.0
20% กรดแลคติก	12.0
0.1% V-bactcine	9.0
น้ำกลั่น	0.0

หมายเหตุ: ความกว้างของบริเวณใส = [เส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใส – ด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางกระดาษตาปลา]/2



ภาพที่ 4 บริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่เลี้ยงบนอาหาร NGA โดยกรดอะซิติก (1) และกรดแลคติก (2) ความเข้มข้น 5% (A), 10% (B), 15% (C) และ 20% (D) เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น (E) และ 0.1% V-bactcine (G)

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้ 16S rDNA

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท HD1-1, HD1-3, PS1-9 และ PS1-10 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ตรวจสอบผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 1600 bp เมื่อนำแถบดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ จากฐานข้อมูล GENBANK, DDBJ และ EMBL ด้วยโปรแกรม BLASTN และ ClustalW2 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท HD1-1, HD1-3, PS1-9 และ PS1-10 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* และ *Enterococcus* sp. 99%, 99%, 98% และ100% ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท HD1-1, HD1-3, PS1-9 และ PS1-10 คือ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* และ *Enterococcus* sp. ตามลำดับ (ตารางที่ 3) จากการทดลองของ Visser และคณะ(1986) พบว่า *Lactobacillus plantarum* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ *Xanthomonas campestris, Erwinia carotovora*, และ *Pseudomonas syringae* ได้ผลดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ ที่แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท HD1-1, HD1-3 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ดีเป็นเชื้อ *Lactobacillus plantarum* เช่นกัน

สรุป

สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าวได้ดี 4 ไอโซเลทได้แก่ HD1-1, HD1-3, PS1-9 และ PS1-10 ซึ่งจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของส่วน 16S rDNA พบว่า เป็นเชื้อ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* และ *Enterococcus* sp. ตามลำดับ การทดสอบคุณสมบัติของกรดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าว พบว่าทั้งกรดอะซิติกและกรดแลคติกที่ความเข้มข้น 10% ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% similarity)ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท HD1-1, HD1-3, PS1-9 และ PS1-10

แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% similarity)	ผลการจัดจำแนก
HD1-1	99	*Lactobacillus plantarum*
HD1-3	99	*Lactobacillus plantarum*
PS1-9	98	*Enterococcus faecium*
PS1-10	100	*Enterococcus* sp.

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

Cleveland J., T. J. Montville, I. F. Nes and M. L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol.71: 1–20.

Khush, G. S., D. J. Mackill and G. S. Sidhu. 1989. Breeding rice for resistance to bacterial blight. pp. 207-217. *In* Bacterial Blight of Rice. International Rice Research Institute. Los Banos. Philippines.

Mew, T. W. 1987. Current status and prospects of research on bacterial blight on rice. Ann. Rev. Phytopathol.25: 259-382.

Mizukami, T. and S. Wakimoto. 1969. Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. Ann. Rev. Phytopathol.7: 51-72.

Mogensen, G. 1993. Starter culture, pp. 1-11. *In* J. Smith (*ed.*). Technology of Reduced additive Food. Chapman&Hall, London.

Niño-Liu, D. O., P. C. Ronald and A. J. Bogdanove. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. Mol. Plant Pathol. 7: 303-324.

Ou, S. H. 1972. Rice Disease. Commonwealth Mycological Institute. Kew, England. 368p.

Swings, J., V. D. Mooter, M. Vauterin, L. Hoste, B. Gillis, M. T. W. Mew and K. Kersters. 1990. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*X.c.* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *X. oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. Nom. Rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 309-311.

Visser R., W. H. Holzapfel, J. J. Bezuidenhout and J. M. Kotzé. 1986. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol.52(3): 552–555.

Wijit Kajonmalee. 1957. The survey of Rice Diseases in Rice Field the Central of Thailand. B.S. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)