การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อ *Ralstonia solanecearum* สาเหตุโรคเหี่ยวในพริก

Screening and Testing of *Bacillus subtilis* Efficiency to Control *Ralstonia solanecearum* Cause of Wilt Disease in Pepper

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ [1/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล [1/] นาตยา จันทร์ส่อง [2/] วงศ์ บุญสืบสกุล [1/]

บทคัดย่อ

การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* จากดิน และรากพริกที่เก็บมาจากแปลงพริกของเกษตรกรที่จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 35 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรีย *B. subtilis* จำนวน 55 สายพันธุ์ โดยแยกจากรากพริกจำนวน 18 สายพันธุ์ แยกจากดินบริเวณรากพริกจำนวน 37 สายพันธุ์ นำไปทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริกในห้องปฏิบัติการ ได้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* จำนวน 7 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.1, UB No.2, UB No.4, UB No.5, UB No.8, UB No.10 และ UB No.25 จากนั้นนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 7 สายพันธุ์ ไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนทดลอง พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.2, และ UB No.25 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกได้ 60 และ 66.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

รหัสการทดลอง

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4

คำนำ

โรคเหี่ยว (Bacterial Wilt Disease) มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ชื่อเดิม *P*seudomonas *solanacearum* พบระบาดในเขตอบอุ่นและเขตร้อนของโลก ระบาดมากในเขตร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส และดินมีความชื้นสูง (ณัฏฐิมา, 2552) เชื้อสาเหตุสามารถเข้าทำลายพืชได้มากมายหลายชนิด ทั้งพืชเศรษฐกิจและวัชพืช เชื้ออาศัยอยู่ในดินและเศษซากพืชได้เป็นเวลานาน สามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ และแพร่ระบาดไปกับน้ำได้ เชื้อสาเหตุที่อยู่ในดินเข้าทำลายพืชบริเวณราก โดยเข้าทางช่องเปิดธรรมชาติหรือบาดแผลที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ แมลง และไส้เดือนฝอย เป็นต้น (วนิดา, 2542)

ประเทศไทยพบโรคเหี่ยวระบาดและทำความเสียหายมากในพริกที่ปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทำให้เกิดปัญหาในการปลูกพริก เนื่องจากโรคเหี่ยวทำให้ต้นพริกเหี่ยวตาย เกษตรกรจึงเก็บผลผลิตไม่ได้เมื่อพริกเป็นโรคนี้ และในปัจจุบันการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวของพริกนั้นทำได้ค่อนข้างยาก ส่วนใหญ่จะเป็นการแนะนำให้หลีกเลี่ยงการปลูกพืชในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค หรือปลูกพืชหมุนเวียนที่ไม่เป็นพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรค แต่ในความเป็นจริงเกษตรกรไม่สามารถทำตามคำแนะนำได้ เนื่องจากมีข้อจำกัดในด้านพื้นที่ปลูกซึ่งแต่ละครอบครัวมีพื้นที่ไม่มาก และการปลูกพืชอื่นในบางพื้นที่หาตลาดที่จะมารองรับผลผลิตได้ยาก นอกจากนี้ยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคนี้ มีเพียงการแนะนำให้ใช้วิธีการเขตกรรมก่อนปลูกพริก ซึ่งเป็นการฆ่าเชื้อสาเหตุในดินโดยการอบดินด้วยยูเรีย อัตรา 80 กิโลกรัม ผสมกับ ปูนขาวอัตรา 800 กิโลกรัมต่อพื้นที่ 1 ไร่ โดยอบทิ้งไว้ 2-3 สัปดาห์ (ณัฏฐิมา, 2552) แต่วิธีการนี้เป็นการฆ่าเชื้อในดินก่อนปลูกเท่านั้น ไม่สามารถป้องกันกำจัดโรคในระหว่างที่พริกเจริญเติบโตได้ จึงได้หาวิธีการที่จะควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในระหว่างการปลูกพริกโดยจะนำมาใช้ร่วมกับการเขตกรรม วิธีการที่นิยมใช้มากที่สุดคือการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากพืช (rhizosphere bacteria) ได้แก่ *Pseudomonas* sp. J3, *Bacillus* spp. BB11 และ FH 17 มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของพริกได้ (Guo et al., 2002) Aino et al., (1998) พบว่า endophytic pseudomonas FPT และ FPH มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ Ciampi et al., (1998) รายงานว่าการใช้สารสกัดจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ไอโซเลท A47 และ *Pseudomonas fluorescens* BC8 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพไร่ได้ Sanaina et al. (1997) ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* บริเวณรากควบคุมโรคเหี่ยวในมันฝรั่งได้ 24-83 %

ในการทดลองนี้จึงได้ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียจากรากและดินบริเวณรากพริก เฉพาะต้นที่ไม่แสดงอาการโรคในบริเวณที่มีการระบาดของโรคในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี เนื่องจากมีสมมุติฐานว่าจุลินทรีย์ที่รากหรือดินบริเวณรอบรากพริกมีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวคือ *Ralstonia solanacearum* ที่เข้าทำลายพริก จากนั้นจึงนำเชื้อ

แบคทีเรียที่เก็บรวบรวมได้มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลองต่อไป เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของพริกที่มีประสิทธิภาพ และสามารถแนะนำให้เกษตรกรนำไปใช้ป้องกันกำจัดโรคนี้ได้

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* จากรากและดินบริเวณรากพริก

1.1 การเก็บตัวอย่างรากพริก และดินบริเวณรากพริก

สำรวจและเก็บตัวอย่างรากพริกและดินรอบรากพริก โดยเก็บเฉพาะต้นที่ไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยว ในแปลงปลูกพริกที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวในเขตพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 18 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากพริกจากแปลงปลูกพริก โดยเก็บดินบริเวณรอบรากต้นพริกที่ไม่แสดงอาการของโรค จำนวน 37 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 55 ตัวอย่าง

1.2 การแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรากพริก

นำตัวอย่างดินบริเวณรากพริกที่เก็บมาได้ผึ่งลมให้แห้งพอหมาดๆ นำมาแยกแบคทีเรียตามวิธี soil plate method โดยชั่งดินจำนวน 25 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตรเขย่าบนเครื่องเขย่า (rotary shaker) เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี soil plate method โดยนำสารละลายดินมาทำให้เจือจางด้วยวิธี serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1}- 10^{-8} จากนั้นนำสารละลายดิน 0.1 มิลลิลิตรของความเข้มข้นที่ 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} และ 10^{-8} มากระจายบนอาหาร King's medium B agar (KB) และ Nutrient glucose agar (NGA) ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ นำโคโลนีของแบคทีเรียที่เก็บรวบรวมได้มาทำการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีตามวิธีการของ Holt *et al.*(1994) และคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรีย *B. subtilis* ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 การแยกแบคทีเรียจากรากพริก

นำตัวอย่างรากพริกที่เก็บมาได้ล้างดินบริเวณรากออกจนรากสะอาด จากนั้นชั่งตัวอย่างรากพริก จำนวน 1 กรัม นำมาบดในโกร่งนึ่งฆ่าเชื้อให้ละเอียด เติมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ไว้นาน 20 นาที ทำให้เจือจางโดยวิธี serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1}- 10^{-8} จากนั้นนำสารละลายรากพริก 0.1 มิลลิลิตร ของความเข้มข้นที่ 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} และ 10^{-8} มากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ King's medium B agar (KB) และ Nutrient glucose agar (NGA) ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ นำโคโลนีของแบคทีเรียที่เก็บรวบรวมได้มาทำการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีตามวิธีการของ Holt *et al.*(1994) และคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรีย *B. subtilis* ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ

การทดลองนี้เป็นการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* โดยการนำ *B. subtilis* ที่แยกได้จากรากและดินบริเวณรากพริก จำนวน 55 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ

2.1 การเตรียมแบคทีเรีย *R. solanacearum*

นำแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพริกที่เป็นโรคเหี่ยวในจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ No. 2109 และ No. 2133 มาเลี้ยงบนอาหารเอียง Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาทำสารละลายแบคทีเรียโดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำมาทำ double layer ลงบนอาหาร PSA โดยนำหลอดอาหาร PSA ปริมาตร 7 มิลลิลิตร หลอมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เติมด้วยสารละลายแบคทีเรีย 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเททับลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PSA ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เอียงจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้อาหาร PSA ที่ผสมสารละลายแบคทีเรียกระจายคลุมทั่วผิวหน้าอาหาร PSA ชั้นล่างที่เทไว้แล้ว เมื่ออาหารแข็งตัวเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง โดยคว่ำจานเลี้ยงเชื้อลง

2.2 การเตรียมแบคทีเรีย *B. subtilis*

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่แยกได้จากรากและดินบริเวณรากพริกจำนวน 55 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Glucose Broth (NGB) ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความดูดกลืนแสง (optical density) 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งจะได้แบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

2.3 การทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum*

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวที่แยกได้จากพริก จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ No. 2109 และ No. 2133 ในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี disc diffusion method โดยใช้ micropipette หยดสารละลายของแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เตรียมไว้แล้ว จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรองแผ่นกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วใช้ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อคีบกระดาษวางบนผิวหน้าอาหารที่เลี้ยงแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เตรียมไว้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยการวัดความกว้างของบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของแบคทีเรียถึงขอบบริเวณใส

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อ *R. solanacearum* ในโรงเรือนทดลอง

การทดลองนี้เป็นการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนทดลอง

3.1 การเตรียมดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum*

เตรียมสารละลายแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยนำแบคทีเรีย *R. solanacearum* No.2133 มาเลี้ยงบนอาหาร PSA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง เติมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงให้มีค่า 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งจะได้แบคทีเรียที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายแบคทีเรียไปผสมกับดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อดิน 8 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มเชื้อไว้ 2 สัปดาห์ แล้วจึงนำดินที่บ่มเชื้อไว้มาตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี soil dilution plates ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร จากนั้นนำดินที่ผสมเชื้อใส่กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว จำนวน 0.8 กิโลกรัมต่อกระถาง จำนวน 120 กระถาง

3.2 การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis*

เตรียมสารละลายแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* โดยนำแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ มาเลี้ยงบนอาหาร PSA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง นำมาทำสารละลายแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยเติมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความดูดกลืนแสง 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งจะได้แบคทีเรียที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

3.3 การควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomize Design (CRD) มี 8 กรรมวิธี 15 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.1

กรรมวิธีที่ 2 แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.2

กรรมวิธีที่ 3 แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.4

กรรมวิธีที่ 4 แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.5

กรรมวิธีที่ 5 แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.8

กรรมวิธีที่ 6 แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.10

กรรมวิธีที่ 7 แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.25

กรรมวิธีที่ 8 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

ในการทดลองนี้จะใช้ต้นกล้าพริกที่มีลักษณะแข็งแรง ปราศจากโรคและแมลง มีอายุประมาณ 30-40 วัน สูงประมาณ 10-15 เซนติเมตร มีใบจริงประมาณ 5 ใบ นำมาย้ายลงปลูกในดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เตรียมไว้ กรรมวิธีละ 15 กระถางๆ ละ 1 ต้น รดแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธีที่กำหนดไว้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อต้น เริ่มรดครั้งแรกหลังย้ายพริกลงปลูกในกระถางและรดทุกๆ 7 วัน จนกระทั่งพริกในกรรมวิธีเปรียบเทียบตายหมด

การบันทึกผล บันทึกต้นพริกที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 15, 30 และ 45 วัน และตรวจนับปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* และ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ทุก 15, 30 และ 45 วัน

ระยะเวลา

ดำเนินการทดลองตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2552 ถึง 30 กันยายน 2553

สถานที่ดำเนินการ

กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรีย *B. subtilis* จากรากและดินบริเวณรากพริก

การแยกแบคทีเรีย *B. subtilis* จากรากและดินบริเวณรากพริกที่เก็บจากแปลงพริกในจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 35 ตัวอย่าง โดยทำตามวิธีการของ Holt *et.al.*(1994) โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นแกรมบวก ใช้อากาศในการดำรงชีวิต (aerobic bacteria) สร้างเอนไซม์ catalase ได้ มีรูปร่างเป็นท่อนตรง (rod shape) มีหางรอบตัว (peritrichous flagella) สร้างสปอร์เพียงสปอร์เดียวเป็นรูปไข่ (oval shape) ภายในเซลล์ (endospores) ได้แบคทีเรีย *B. subtilis* ทั้งหมด 55 สายพันธุ์ โดยแยกจากรากพริกจำนวน 18 สายพันธุ์ แยกจากดินบริเวณรากพริกจำนวน 37 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน glycerol 20% ที่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

2. การทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ในห้องปฏิบัติการ

คัดเลือกได้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.1, UB No.2, UB No.4, UB No.5, UB No.8, UB No.10 และ UB No.25 (ตารางที่ 2) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริกจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ No. 2109 และ No. 2133 โดยมีระดับการยับยั้งที่แตกต่างกัน มีความกว้างของ

บริเวณใสตั้งแต่ 2.97 - 7.8 มิลลิเมตร แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.25 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีที่สุดโดยมีความกว้างของบริเวณใส 7.25 และ 6.85 มิลลิเมตร รองลงมาคือแบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ โดยมีความกว้างของบริเวณใส 7.8 และ 5.2 มิลลิเมตร (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.25 และ UB No.2 มีการผลิตสารปฏิชีวนะออกมาจำนวนมากทำให้เกิดปฏิกิริยายับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Baker and Cook (1974) ที่รายงานว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถสร้างสปอร์ที่ทนทานต่อความร้อน และสร้างสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อ *R. solanacearum* ในโรงเรือนทดลอง

ผลการทดลองพบว่าต้นพริกที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.25 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกได้ดีที่สุด โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวร้อยละ 66.67 ส่วนต้นพริกที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.2 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกรองลงมา คือ ร้อยละ 60 ในขณะที่ต้นพริกที่เป็นต้นเปรียบเทียบซึ่งรดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแสดงอาการของโรคร้อยละ 100 (ตารางที่ 4)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* และแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าสอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ ในกรรมวิธีที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.25 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกดีที่สุด คือ 66.67 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เพิ่มมากขึ้น โดยมีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3.45 x 10^4, 5.34x 10^5 และ 7.5 x 10^5 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน ตามลำดับ เช่นเดียวกับกรรมวิธีที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.2 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกรองลงมา คือ 60 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เพิ่มมากขึ้น โดยกรรมวิธีที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.2 มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3.6 x 10^4, 8.45x 10^4 และ 5.7 x 10^5 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* คงที่และลดลง หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน (ตารางที่ 5) ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.25 และ UB No.2 ลดลง โดยกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.25 มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ 7.52 x 10^5, 9.8x 10^4 และ 7.86 x 10^4 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน ตามลำดับ กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.2 มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ 4.5 x 10^5, 6.35x 10^4 และ 2.15 x 10^4 หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม หลังปลูก 15, 30 และ 45 วัน ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีอื่นๆ มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* หลังปลูก

15, 30 และ 45 วัน เพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 6)

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.25 และ UB No.2 สามารถอยู่ในดินปลูกพริกได้นานกว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์อื่นๆ ทำให้ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เพิ่มมากขึ้น และจากผลการทดลองการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.25 และ UB No.2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ No. 2109 และ No. 2133 ได้ดี มีความกว้างของบริเวณใสมากกว่ากรรมวิธีที่รดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์อื่นๆ แสดงว่ามีการผลิตสารปฏิชีวนะออกมาจำนวนมาก จึงทำให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.25 และ UB No.2 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกมากกว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์อื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Baker and Cook (1974) ได้รายงานว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สร้างสปอร์ที่เรียกว่าเอ็นโดสปอร์ (endospore) ซึ่งมีความทนทาน และอยู่รอดสูงแม้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ขาดแคลนอาหาร ความร้อนสูง แสงอุลตร้าไวโอเลต และสามารถงอกกลับเป็นเซลแบคทีเรียใหม่ได้โดยง่าย นอกจากนั้นยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคได้ทันทีที่ใส่ลงไปในดิน เนื่องจากในดินมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. การแยกแบคทีเรีย *B. subtilis* จากรากและดินบริเวณรากพริกในจังหวัดอุบลราชธานี สามารถแยกแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้จำนวน 55 สายพันธุ์

2. การคัดเลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริกในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี disc diffusion method สามารถคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ได้จำนวน 7 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.1, UB No.2, UB No.4, UB No.5, UB No.8, UB No.10 และ UB No.25

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง สามารถคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ 2 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No. 2 และ UB No.25 ซึ่งสามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกได้ร้อยละ 60 และ 66.67 ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2552. โรคเหี่ยวเขียว. *ใน* คู่มือโรคผัก. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 8.

วนิดา ฐิตะฐาน. 2542. โรคเหี่ยวของพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 150 หน้า.

Aino, M., Maekawa, Y., Mayama, S and Kato, H. 1998. The use of endophytic bacteria in biocontrol. *In* The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper number 2.10.5s.

Baker, K.F. and R.J. Cook. 1974. Biological Control of Soil-Borne Pathogens. W.H. Freeman and Co., San Francisco. 433 p.

Ciampi, L., Fuentes, R., Schobitz, R., Bernal, G. and Oyarzun, J. 1998. Biological control of *Ralstonia solanacearum* : Alginate beads as carriers for antagonistic cells. *In* : The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper number B2.

Guo,J., H. Qi and S. Li . 2002. Biocontrol efficiency of three PGPR strains admixture to Pepper bacterail wilt. Bacterial wilt newsletter. 17 :3 .

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltomore.

Sanaina, V., V. Kishore and G.S. Shekhawat. 1997. Biocontrol of bacterial wilt of potato by avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* and other Bactria. Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium, Guadeloupe 22-27 June, 1997.

ตารางที่ 1 แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากรากและดินบริเวณรากพริกในจังหวัดอุบลราชธานี

สถานที่	แหล่งที่มา	จำนวนสายพันธุ์
1. ต.โพนแพง อ.ม่วงสามสิบ	ดินบริเวณรากพริก	7
2. ต.หนองเหล่า อ.ม่วงสามสิบ	ดินบริเวณรากพริก	8
3. ต.โพธิ์ศรี อ.พิบูลฯ	ดินบริเวณรากพริก	22
4. ต.โพนแพง อ.ม่วงสามสิบ	รากพริก	4
5. ต.หนองเหล่า อ.ม่วงสามสิบ	รากพริก	5
6. ต.โพธิ์ศรี อ.พิบูลฯ	รากพริก	9
	รวม	**55**

ตารางที่ 2 แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

สายพันธุ์ที่แยกได้	สถานที่	แหล่งที่มา
1. UB No.1	ต.โพธิ์ศรี อ.พิบูลฯ	รากพริก
2. UB No.2	ต.หนองเหล่า อ.ม่วงสามสิบ	ดินบริเวณรากพริก
3. UB No.4	ต.โพธิ์ศรี อ.พิบูลฯ	ดินบริเวณรากพริก
4. UB No.5	ต.โพนแพง อ.ม่วงสามสิบ	ดินบริเวณรากพริก
5. UB No.8	ต.หนองเหล่า อ.ม่วงสามสิบ	ดินบริเวณรากพริก
6. UB No.10	ต.โพธิ์ศรี อ.พิบูลฯ	ดินบริเวณรากพริก
7. UB No.25	ต.โพธิ์ศรี อ.พิบูลฯ	ดินบริเวณรากพริก

ตารางที่ 3 ขนาดความกว้างของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ No. 2109 และ No. 2133 บนอาหาร Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA)

แบคทีเรียปฏิปักษ์	**ความกว้างของบริเวณใส (มิลลิเมตร)**	
	R. solanacearum **No. 2109**	***R. solanacearum*** **No. 2133**
1. UB No.1	6.80	3.50
2. UB No.2	**7.80**	**5.20**
3. UB No.4	5.95	4.55
4. UB No.5	2.97	3.20
5. UB No.8	4.70	3.10
6. UB No.10	4.15	3.25
7. UB No.25	**7.25**	**6.85**

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

แบคทีเรียปฏิปักษ์	การเกิดโรค % 1/			การควบคุมโรค % 2/		
	15 วัน	30 วัน	45 วัน	15 วัน	30 วัน	45 วัน
1. UB No. 1	40.00	66.67	80.00	60.00	33.33	20.00
2. UB No. 2	**13.33**	**33.33**	**40.00**	**86.67**	**66.67**	**60.00**
3. UB No. 4	46.67	66.67	73.33	53.33	33.33	26.67
4. UB No. 5	60.00	73.33	86.67	40.00	26.67	13.33
5. UB No. 8	33.33	60.00	66.67	66.67	40.00	33.33
6. UB No. 10	13.33	40.00	66.67	86.67	60.00	33.33
7. UB No. 25	**6.67**	**20.00**	**33.33**	**93.33**	**80.00**	**66.67**
8. control	66.67	100.00	100.00	33.33	0.00	0.00

1/ การเกิดโรค (%) = $\frac{\text{จำนวนต้นตาย}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$

2/ การควบคุมโรค (%) = $\frac{\text{จำนวนต้นรอดตาย}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$

ตารางที่ 5 ประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในการทดลองการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลองระยะเวลา 15, 30 และ45 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์	**ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* (หน่วยโคโลนี / ดิน 1 กรัม)**		
	15 วัน	**30 วัน**	**45 วัน**
1. UB No.1	6.80×10^4	5.25×10^4	7.35×10^4
2. UB No.2	**3.60×10^4**	**8.45×10^4**	**5.70×10^5**
3. UB No.4	6.40×10^3	4.40×10^3	6.60×10^3
4. UB No.5	7.20×10^5	3.45×10^4	6.70×10^3
5. UB No.8	8.90×10^4	2.10×10^3	1.50×10^3
6. UB No.10	4.50×10^5	7.70×10^4	1.25×10^3
8. UB No.25	**3.45×10^4**	**5.34×10^5**	**7.50×10^5**

ตารางที่ 6 ประชากรของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในการทดลองการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนปลูกพืชทดลองระยะเวลา 15, 30 และ 45 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์	**ปริมาณประชากรของแบคทีเรีย *R. solanacearum* (หน่วยโคโลนี / ดิน 1 กรัม)**		
	15 วัน	**30 วัน**	**45 วัน**
1. UB No.1	2.26×10^5	5.50×10^5	7.39×10^5
2. UB No.2	**4.50×10^5**	**6.35×10^4**	**2.15×10^4**
3. UB No.4	1.75×10^5	8.30×10^5	1.45×10^6
4. UB No.5	5.60×10^4	6.15×10^5	9.60×10^5
5. UB No.8	2.15×10^5	2.87×10^4	2.75×10^5
6. UB No.10	3.50×10^5	6.95×10^5	8.40×10^5
8. UB No.25	**7.52×10^5**	**9.80×10^4**	**7.86×10^4**