วารสารเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี | Agriculture and Technology Journal
ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 มกราคม - เมษายน 2563 | Vol.1 No.1 January – April 2020

Received: December 12, 2019; Revised: March 2, 2020; Accepted: April 20, 2020

ประสิทธิภาพและการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก

Efficacy and identification of beneficial bacteria to control *Colletotrichum capsici* caused anthracnose of chili

สุวิจักขณ์ สมจินดา[1] ดุสิต อธินุวัฒน์[1] และวิลาวรรณ์ เชื้อบุญ[1*]

Suwichak Somjinda[1], Dusit Athinuwat[1] and Wilawan Chuaboon[1*]

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

[*]Corresponding Author E-mail Address : wchuaboon@gmail.com

บทคัดย่อ

คัดแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากผลพริก ได้ทั้งหมด 121 ไอโซเลทจากตัวอย่างพริก 20 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็น 7 กลุ่มตามลักษณะโคโลนีบนอาหาร nutrient glucose agar และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสด้วยวิธี Dual culture บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ พบว่า แบคทีเรียที่มีประโยชน์ไอโซเลท TU089, TU101 และ TU121 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย เท่ากับ 85.55, 78.33 และ 88.33% ตามลำดับ และให้ผลการยับยั้งดีกว่าการใช้สารเคมี เมื่อเปรียบเทียบกับสารคาร์เบนดาซิม (36.66%) โดยเมื่อจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี โดยเทียบเคียงกับตำราของ Bergey's manual of determinative Bacteriology พบว่า TU089, TU101 และ TU121 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis, B. licheniformis* และ *B. megaterium* ตามลำดับ

คำสำคัญ: แบคทีเรียที่มีประโยชน์ พริก ควบคุมโรค โรคแอนแทรคโนส

Abstract

All of the 121 isolates of beneficial bacteria were screened from 20 samples of chili. The isolates were divided into 7 groups according to the characteristics of the colonies grown on nutrient glucose agar. The efficacy of beneficial bacteria against anthracnose disease by dual culture method on potato dextrose agar (PDA) were investigated and arranged by a completely randomized design. The bacterial isolates of TU089, TU101, and TU121 were found to be effective in inhibiting the growth of *C. capsici* strain P-TU008 with 85.55, 78.33, and 88.33% inhibited, respectively, which was better than chemical reagent when compared with

agrochemical carbendazim (36.66%). The classification of all 3 isolates by morphological, physiological, and biochemical characteristics by compared with Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The result revealed that bacteria isolate TU089, TU101, and TU121 were similar to *Bacillus subtilis, B. Licheniformis*, and *B. megaterium* respectively.

Keywords: Beneficial bacteria, Chili, Disease control, Anthracnose

บทนำ

โรคแอนแทรคโนส (สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp.) เป็นโรคที่สำคัญและพบการระบาดในทุกพื้นที่การผลิตพริก ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายทั้งในแปลงปลูกและหลังการเก็บเกี่ยว (บุญญวดี และคณะ, 2559) เชื้อรานี้สามารถเข้าทำลายพริกได้ในระยะที่ผลยังไม่เกิดการสุกแก่ทางสรีรวิทยา (Maturity) โดยไม่แสดงอาการ จนกว่าเมื่อผลพริกเริ่มสุกแก่ ซึ่งนับเป็นการเข้าทำลายแบบแฝง กรณีผลพริกเป็นโรคแอนแทรคโนส เมล็ดภายในผลก็เป็นโรคแอนแทรคโนสด้วย ซึ่งสามารถอยู่ข้ามฤดูและแพร่ระบาดปลิว~~แพร่~~กระจายไปตามลม ละอองน้ำ แมลง เครื่องมือการเกษตร และแสดงอาการของโรคเมื่อนำไปปลูกต่อไป วิธีการควบคุมโรคส่วนใหญ่มักใช้สารเคมีโดย ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงเช่น ปัญหาสารเคมีตกค้างในผลผลิตและสภาพแวดล้อม ~~ซึ่ง~~ปัจจุบันผู้บริโภคมีความใส่ใจเกี่ยวกับสุขภาพมากขึ้น วิธีการที่ลดการใช้สารเคมี เช่น การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญในการนำมาใช้ป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนสในพริก (ดาราวดี, 2558) โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสในพริก (มาลิษา และวิลาวรรณ์, 2562) หรือการพัฒนาชีวผลิตภัณฑ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเศรษฐกิจในระยะกล้า เช่น พริก คะน้า ข้าวโพด (ปัญญาพร และวิลาวรรณ์, 2562)

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก

นำเชื้อ *C. capsici* สายพันธุ์ TU-008 สายพันธุ์รุนแรง (มาลิษา และวิลาวรรณ์, 2562) จากห้องปฏิบัติการเกษตรอินทรีย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ มาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคโดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อสาเหตุนำชิ้นเชื้อที่ได้ไปคว่ำลงบนผลพริกบ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง (28±3 องศาเซลเซียส) ภายในกล่องพลาสติกชื้นจนกว่าจะแสดงอาการโรค

2. แยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์

แยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากผลพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท ที่มีความอุดมสมบูรณ์ไม่แสดงอาการของโรคใด ๆ โดยเก็บตัวอย่างพริกจากพื้นที่ปลูกพริกจังหวัดอ่างทอง ระหว่างเดือน เมษายน-พฤษภาคม 2562 ด้วยวิธี Leaf wash technique ดัดแปลงจากวิลาวรรณ์ และคณะ (2558) โดยนำผลพริก 10 กรัม แช่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร หยดสารลดแรงตึงผิว 1-2 หยด จากนั้นเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้แบคทีเรียออกมาอยู่ในน้ำ และใช้เป็น stock suspension เจือจางความเข้มข้นด้วยวิธี Ten-fold serial dilution ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายให้ทั่วผิวหน้าอาหาร nutrient glucose agar (NGA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3. ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici*

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* ด้วยวิธี Dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA ตามวิธีการดัดแปลงของ ชมพูนุท และคณะ (2550) วางแผนการทดลองแบบ CRD การทดลองละ 5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเปรียบเทียบกรรมวิธีควบคุม เลือกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

4. จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์

จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง 3 อันดับแรกในการยับยั้งเชื้อ *C. capsici* (จากข้อ 3) นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ เช่น Oxygen relationship, Gelatin hydrolysis, Catalase production, Starch hydrolysis, Citrate utilization, Urease test, และ Salt tolerance (Schaad, 1988) แล้วใช้วิธีการเทียบเคียงกับตำราของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th eds. (Holt et al., 1994)

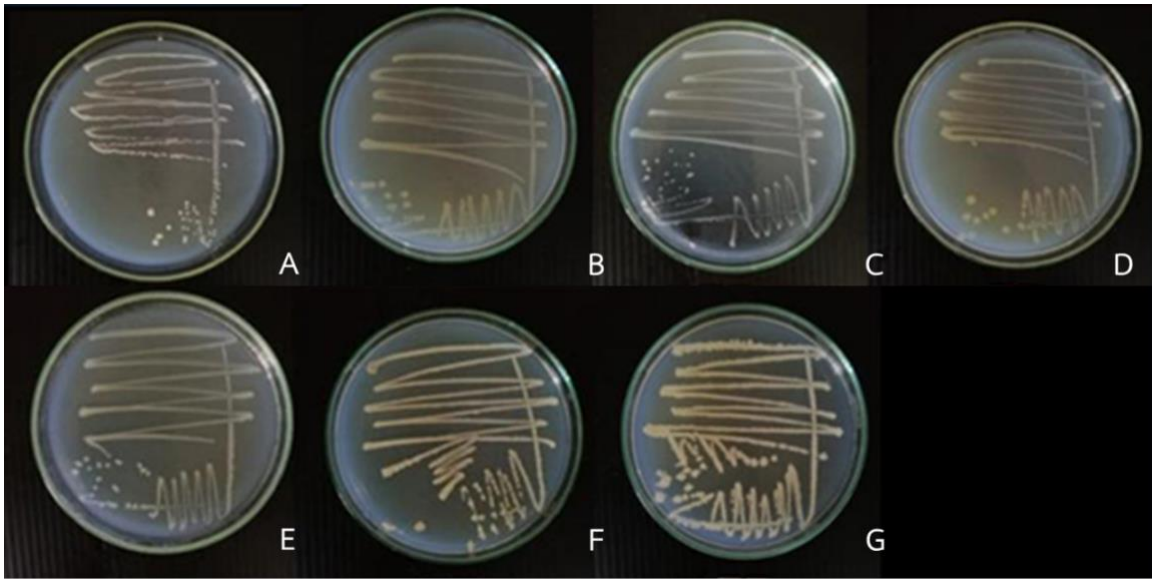
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

1. การเตรียมเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก

เชื้อรา *C. capsici* เมื่อทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนพริก พบว่าเชื้อรา *C. capsici* สายพันธุ์ P-TU008 ยังคงมีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนสในพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท โดยแสดงความรุนแรงโดยการเจริญของเส้นใยคลุมทับผิวผลของพริกในบริเวณที่ปลูกเชื้อ และก่อให้เกิดอาการโรคภายใน 10 วัน หลังปลูกเชื้อ โดยมีลักษณะการแพร่กระจายตัวลุกลามย่างรวดเร็ว ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับที่ มาลิษา และวิลาวรรณ์ (2562) รายงานว่าสามารถแยกเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นเชื้อรา *C. capsici* จำนวน 12 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกทดสอบ โดยก่อให้เกิดเส้นใยเชื้อราคลุมทับบริเวณปลูกเชื้อโรคภายใน 3 วัน หลังปลูกเชื้อ และเชื้อสามารถแพร่กระจายตัวรุกรามอย่างรวดเร็ว และแสดงอาการโรคให้เห็นภายใน 10 วัน หลังทดสอบ

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์

สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ได้ จำนวน 121 ไอโซเลท และสามารถจัดกลุ่มตามลักษณะโคโลนีได้ 7 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีลักษณะโคโลนีสีขาวครีม ขอบเรียบ กลมนูน กลุ่มที่ 2 มีโคโลนีสีขาวด้าน ขอบเรียบ กลมนูน กลุ่มที่ 3 มีโคโลนีสีขาว ขอบเรียบ กลมนูน มันวาว กลุ่มที่ 4 โคโลนีสีขาวด้าน ขอบหยัก แบนราบ กลุ่มที่ 5 โคโลนีสีเทาขาว กลมนูน ขอบเรียบ กลุ่มที่ 6 มีโคโลนีสีขาวด้าน ขรุขระ ขอบหยัก และ กลุ่มที่ 7 มีโคโลนีสีน้ำตาลเหลือง ขรุขระ ขอบหยัก (รูปที่1)

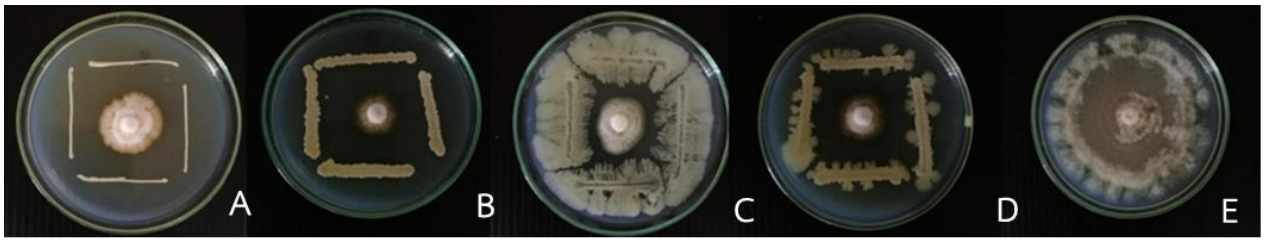


รูปที่ 1 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ได้จัดกลุ่มตามลักษณะโคโลนีบนอาหาร NGA โดยกลุ่มที่ 1 มีลักษณะโคโลนีสีขาว ครีม ขอบเรียบ กลมนูน (A), กลุ่มที่ 2 โคโลนีสีขาวด้าน ขอบเรียบ กลมนูน (B), กลุ่มที่ 3 โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ กลมนูน มันวาว (C), กลุ่มที่ 4 โคโลนีสีขาวด้าน ขอบหยัก แบนราบ (D), กลุ่มที่ 5 โคโลนีสีเทาขาว กลมนูน ขอบเรียบ (E), กลุ่มที่ 6 โคโลนีสีขาวด้าน ขรุขระ ขอบหยัก (F) และ กลุ่มที่ 7 โคโลนีสีน้ำตาลเหลือง ขรุขระ ขอบหยัก (G)

ผลการทดลองดังกล่าว ให้ผลเช่นเดียวกับ มาลิษา และวิลาวรรณ์ (2562) โดยสามารถแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากผลพริกที่มีความอุดมสมบูรณ์ไม่แสดงอาการของโรคใด ๆ จำนวน 20 ตัวอย่าง ได้เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ได้ จำนวน 182 สายพันธุ์ และสามารถจัดกลุ่มตามลักษณะโคโลนีได้ 8 กลุ่ม

3. ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici*

ประสิทธิภาพแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* สายพันธุ์ P-TU008 พบว่า แบคทีเรียที่มีประโยชน์ไอโซเลท TU013, TU074, TU089, TU101 และ TU121 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย เท่ากับ 83.11, 75.00, 85.55, 78.33 และ 88.33% ตามลำดับ (รูปที่2) เมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีคาร์เบนดาซิม (36.66%) เช่นเดียวกับ Montesines et al. (1996) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากส่วนเหนือดินของพืช และรากพืชหลายชนิด พบว่ามีเพียง 7% ที่สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียและการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Stemphylium vesicarium* ได้ และมีเพียง 4 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคใบจุดสีน้ำตาลของแพร์เมื่อทดสอบด้วยวิธีการ detached leaf ในขณะที่ Hussien et al. (2007) ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีในการควบคุมโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *S. vesicarium* บนต้นหอม พบว่า *P. fluorescens, B. subtilis* และ *T. harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *S. vesicarium* ได้ดีที่สุด



รูปที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* สายพันธุ์ TU-008 A) ไอโซเลท TU074, B) ไอโซเลท TU089, C) ไอโซเลท TU101, D) ไอโซเลท TU121 เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับกรรมวิธีควบคุม (E)

4. จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์

จำแนกชนิดไอโซเลท TU013, TU074, TU089, TU101 และ TU121 โดยเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ไอโซเลท TU013 มีโคโลนีสีขาวด้าน ขอบเรียบ กลมนูน, TU074 โคโลนีสีขาวด้าน ขอบหยัก แบนราบ, TU089 โคโลนีสีเทาขาว กลมนูน ขอบเรียบ, TU101 มีโคโลนีสีขาวด้าน ขรุขระ ขอบหยัก และ TU121 มีโคโลนีสีน้ำตาลเหลือง ขรุขระ ขอบหยัก และศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาพบว่า TU089, TU101 และ TU121 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่ TU013 และ TU074 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ การศึกษาวิจัยครั้งนี้จะทำการจำแนกด้วยชีวเคมีโดยเลือกเฉพาะแบคทีเรียไอโซเลทที่เป็นแกรมบวกเท่านั้น เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่เป็นเชื้อสาเหตุโรค พบว่า เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท TU089, TU101 และ TU121 มาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการเทียบเคียงกับตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th eds. (Holt et al., 1994) พบว่า TU089, TU101 และ TU121 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Bacillus subtilis, B. licheniformis* และ *B. megaterium* ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการในการจำแนกชนิดแบคทีเรียที่มีประโยชน์ไอโซเลท TU089, TU101 และ TU121

ชีวเคมีทดสอบ	แบคทีเรียเปรียบเทียบ[2]			แบคทีเรียที่มีประโยชน์[1]		
	B. subtilis	*B. licheniformis*	*B. megaterium*	TU089	TU101	TU121
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+
Catalase production	+	+	-	+	+	-
Oxygen relationship	+	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+
Urease test	+	+	+	+	+	+
Indole test	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+
Salt Tolerance						
5%	-	-	+	-	-	+
7%	-	-	+	-	-	+

[1] += เกิดปฏิกิริยา – = ไม่เกิดปฏิกิริยา

[2] คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการเปรียบเทียบกับตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. (Holt et al., 1994)

บทสรุป

คัดแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากผลพริก ได้ทั้งหมด 121 ไอโซเลท แบ่งตามลักษณะโคโลนีได้ 7 กลุ่ม และพบว่า ไอโซเลท TU013, TU074, TU089, TU101 และ TU121 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* TU-008 สายพันธุ์รุนแรงทั้งการทดสอบบนอาหารแข็งและอาหารเหลว โดยมีประสิทธิภาพดีเทียบเท่าสารเคมีคาร์เบนดาซิม และเมื่อจำแนกชนิดตาม

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีพบว่า TU089, TU101 และ TU121 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis, B. licheniformis* และ *B. megaterium* ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

เป็นผลงานวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภททุนวิจัยทั่วไปสำหรับผู้ปฏิบัติงานในมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตามสัญญาเลขที่ TUGR 2/14/2562

เอกสารอ้างอิง

ดาราวดี วงษ์ชาล. (2558). ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* สูตร ENCAPSULATE ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

บุญญวดี จิระวุฒ รัตตา สุทธยาคม และวีรภรณ์ เดชนำบัญชาชัย. (2559). การใช้สารกลุ่มปลอดภัยร่วมกับความร้อนในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกหวาน. วารสารวิชาการเกษตร. 34(2): 134-149.

ปัญญาพร อดิษภาส และวิลาวรรณ์ เชื้อบุญ. (2562). การพัฒนาชีวผลิตภัณฑ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเศรษฐกิจในระยะกล้า. ใน ประชุมวิชาการเกษตรพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ครั้งที่ 6. วันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2562. ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 19-24.

มาลิษา มณีจันทร์ และ วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ. (2562). ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสในพริก. ใน ประชุมวิชาการเกษตรพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ครั้งที่ 6. วันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2562. ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 54-58.

วราภรณ์ สุทธิสา และปพิชญา นามแสง. (2560). การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบมะเขือเทศในการควบคุมเชื้อรา *Stemphylium* sp. สาเหตุโรคใบจุดสีเทา. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 22: 73-83.

วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ. (2551). ลักษณะและการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ควบคุมเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edited. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.: USA.

Montesinos E., Bonaterra A., Ophir Y. and Beer S.V. (1996). Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. Biological Control. 86(8): 856-863.

Schaad N.W. (1988). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Bacteriology Committee of American Phytopathological Society. 2(3): 10-16.