# รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

.....

1. **ชุดโครงการวิจัย** : **วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช**
2. **โครงการวิจัย** : **วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี**
   **กิจกรรมที่ 3** : **การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช**
   **กิจกรรมย่อยที่ 3.3** : **การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมโรคพืช**
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : **การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้**
   **ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)**: Selection and Efficacy of Bacterial Antagonist to Control *Burkholderia gladioli* Cause Bacterial Brown Rot of Orchid
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**


**หัวหน้าการทดลอง** : **ทิพวรรณ กันหาญาติ**
**กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

**ผู้ร่วมงาน** : **ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล**
**ทัศนาพร ทัศคร**
**บูรณี พั่ววงษ์แพทย์**
**รุ่งนภา ทองเครั่ง**
**กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**


5. **บทคัดย่อ**


คัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556 – กันยายน 2558 โดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างกล้วยไม้จังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสงคราม และกาญจนบุรี และจาก culture collection ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา รวม 236 ไอโซเลท มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ จำนวน 27 ไอโซเลท คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ได้ดี จำนวน 5 ไอโซเลท เพื่อใช้ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง โดยเริ่มพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังจากกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการของโรค พ่นทุก 7 วัน จำนวน 5 ครั้ง พบว่ากรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS5 BS23 และ BS40 สามารถควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ได้ดี มีระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างจากกรรมวิธีพ่นด้วยน้ำเปล่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้นเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

**Abstract**

Selection and Efficacy of bacterial antagonist to control *Burkholderia gladioli* cause bacterial brown rot of orchid was conducted during October 2013 – September 2015. A total of 236 bacterial isolates obtained from orchid samples and culture collection of bacteria group. The bacterial isolates were assayed against *B. gladioli* by disc diffusion technique. Twenty-seven isolates showed zone of inhibition against the pathogens, five isolates with a clear zone were selected and tested in greenhouse condition. The antagonistic bacteria were applied five times with 7 days after the presence of orchid disease symptom. The result showed that spraying three isolates, BS5 BS23 and BS40 on orchids were more effective in suppressing bacterial brown rot of orchid than spraying water alone. Based on morphological and biochemical tests, isolate BS5 BS23 and BS40 was primary identified as belonging to the *Bacillus subtilis* group.

**6. คำนำ**

กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเป็นพืชที่มีการส่งออกทั้งในรูปของดอกกล้วยไม้และต้นกล้วยไม้ โดยมีมูลค่าการส่งออกปีละประมาณ 1,500 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 90 ของมูลค่าการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับ (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2544) กล้วยไม้ที่เกษตรกรนิยมปลูกมีหลายสกุล เช่น กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ม็อคคารา ออนซิเดียม แวนด้า แอสโคเซนดา อะแรนดา และคัทลียา ซึ่งแหล่งปลูกที่สำคัญคือ จังหวัด นครปฐม กรุงเทพฯ สมุทรสาคร นนทบุรี ราชบุรี อยุธยา ปทุมธานี ชลบุรี และสุพรรณบุรี (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544) โรคพืชนับเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งในการผลิตกล้วยไม้ เพราะโรคพืชมีผลทำให้ผลผลิตกล้วยไม้ต่ำ และไม่ได้มาตรฐาน โดยเฉพาะโรคเน่าสีน้ำตาล (bacterial brown rot) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* ถ้าอาการรุนแรงจะทำให้กล้วยไม้เน่ายุบตายทั้งต้น เนื่องจากสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียมีน้อย การใช้เป็นติดต่อกันเป็นเวลานานจะมีผลทำให้เชื้อสาเหตุโรคเกิดการดื้อสารเคมีและทำให้มีสารเคมีตกค้าง ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการควบคุมโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้โดยใช้ชีววิธี โดยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อาศัยอยู่บริเวณผิวพืชในสภาพธรรมชาติ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ทั้งในห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลอง ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษานี้คาดหวังว่าจะสามารถนำไปพัฒนาและใช้เป็นแนวทางในการลดการใช้สารเคมีได้อีกทางหนึ่ง

**7. วิธีดำเนินการ**

- อุปกรณ์
    1. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ฟลาสก์ ลูป ตะเกียงแอลกอฮอล์
    2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น ปิเปต เครื่องชั่ง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
    3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. เชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

5. สารป้องกันกำจัดโรคพืช thiram 80% WG

6. กล้วยไม้

7. เครื่องพ่นมือ

- วิธีการ

1. การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

1.1 การแยกเชื้อจากวัสดุปลูก

แช่วัสดุปลูกจำนวน 10 กรัม ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจางโดย วิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ $10^{-1}$-$10^{-6}$ จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร ของความเข้มข้นที่ $10^{-2}$, $10^{-4}$ และ $10^{-6}$ เท่า มากระจายบนอาหาร PSA และ TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อมีเชื้อเจริญที่บริเวณผิวหน้าอาหาร ทำการบันทึกลักษณะและเลือกเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เก็บเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การแยกเชื้อจากส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้

นำส่วนราก ใบ และดอกของกล้วยไม้จากแปลงปลูกกล้วยไม้เกษตรกร มาแยกหาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยเขย่าในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นจึงนำสารแขวนลอยมาทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution และดูดสารแขวนลอยที่ความเข้มข้น $10^{-3}$ และ$10^{-4}$ เท่า ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มากระจายบนอาหาร PSA และ TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อมีเชื้อเจริญที่บริเวณผิวหน้าอาหาร ทำการบันทึกลักษณะและเลือกเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เก็บเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 การเตรียมเชื้อจาก culture collection

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collection ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหาร TSA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ทั้งหมดและจาก culture collection ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธี disc diffusion โดยเลี้ยงเชื้อ *B. gladioli* บนอาหาร NA เพื่อใช้เตรียม cell suspension ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ $10^8$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ดูดเชื้อ *B. gladioli* ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมลงในหลอดที่บรรจุอาหาร NA ที่หลอมไว้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทลงในจานอาหาร NA ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง วางกระดาษกรองเบอร์ 1 (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีเชื้อ *B. gladioli* ผสม จานละ 5 ชิ้น ดูดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรอง โดยหยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ

28 องศาเซลเซียส ทำ 4 ซ้ำ แล้วตรวจสอบบริเวณใส (clear inhibition zone) หลังบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง หาค่าเฉลี่ยของบริเวณใสและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* 5 ไอโซเลท เพื่อใช้ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในสภาพเรือนทดลอง

3.1 การเตรียมเชื้อ *B. gladioli* สำหรับปลูกเชื้อบนกล้วยไม้

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อมาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แล้ววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ปรับให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.2 มีความเข้มข้นเชื้อประมาณ $1.0 \times 10^8$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ปลูกเชื้อบนต้นกล้วยไม้โดยใช้วิธีการพ่น แล้วใช้ถุงพลาสติกพ่นน้ำละอองฝอยคลุมต้นกล้วยไม้เพื่อเพิ่มความชื้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำถุงพลาสติกออก

3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สำหรับพ่นบนกล้วยไม้

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีจำนวน 5 ไอโซเลท ในอาหาร TSB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อมาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับค่าความขุ่นของเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ $10^9$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ก่อนนำไปพ่นให้ทั่วต้นกล้วยไม้ด้วยเครื่องพ่นมือ

3.3 การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 7 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 15 ต้น โดยมีกรรมวิธีทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BS3

กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BS5

กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BS6

กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BS23

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BS40

กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืช thiram 80% WG อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยน้ำเปล่า

ทำการพ่นให้ทั่วต้นกล้วยไม้ทุกๆ 7 วัน จำนวน 5 ครั้ง

3.4 การบันทึกผลการทดลอง

3.4.1 ตรวจสอบการเกิดโรคของกล้วยไม้ก่อนพ่นทุกครั้ง และหลังพ่นครั้งสุดท้าย 7 และ 14 วัน ประเมินระดับความรุนแรงของโรคทุกใบในแต่ละต้น จำนวน 15 ต้นต่อซ้ำ โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคเป็น 6 ระดับ ดังนี้

ระดับ 1 ใบไม่ปรากฏอาการของโรค

ระดับ 2 ใบปรากฏอาการของโรค 1-5 % ของพื้นที่ใบ

ระดับ 3 ใบปรากฏอาการของโรค 6-10 % ของพื้นที่ใบ

ระดับ 4 ใบปรากฏอาการของโรค 11-25 % ของพื้นที่ใบ

ระดับ 5 ใบปรากฏอาการของโรค 26-50 % ของพื้นที่ใบ

ระดับ 6 ใบปรากฏอาการของโรค 51-100 % ของพื้นที่ใบ

3.4.2 นำค่าความรุนแรงที่ประเมินได้มาหาค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรค

3.4.3 วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

4. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยทำการศึกษาลักษณะรูปร่างทางสรีรวิทยาของเชื้อ ทดสอบแกรม การสร้างสปอร์และการย้อมติดสี Malachite green และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิด โดยศึกษาตามคู่มือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition และ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition

- เวลาและสถานที่

ต.ค. 56 – ก.ย. 58 ที่ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และสวนกล้วยไม้ของเกษตรกร

**8. ผลการทดลองและวิจารณ์**

1. การแยกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ในห้องปฏิบัติการ

ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากวัสดุปลูก ราก ใบ และดอกของกล้วยไม้ที่เก็บมาจากแปลงกล้วยไม้ของเกษตรกรจังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสงคราม และกาญจนบุรี พบว่าสามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 30 ไอโซเลท นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ทั้งหมดและจาก culture collection ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา รวม 236 ไอโซเลท มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้จำนวน 27 ไอโซเลท เป็นเชื้อที่แยกได้จากกล้วยไม้จำนวน 1 ไอโซเลท และเป็นเชื้อจาก culture collection ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา จำนวน 26 ไอโซเลท คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ได้ดี จำนวน 5 ไอโซเลท เพื่อทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในสภาพเรือนทดลอง

ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้เพื่อใช้ควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในสภาพเรือนทดลอง โดยปลูกเชื้อ *B. gladioli* บนกล้วยไม้ และเริ่มพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังจากกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการของโรค พ่นทุก 7 วัน จำนวน 5 ครั้ง พบว่ากรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS5 BS23 และ BS40 สามารถควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ได้ดี มีระดับ

ความรุนแรงของโรคแตกต่างจากกรรมวิธีพ่นด้วยน้ำเปล่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในเรือนทดลองแล้วจะนำไปทดสอบในสภาพแปลงเกษตรกรต่อไป

3. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS5 BS23 และ BS40 โดยทำการศึกษาลักษณะรูปร่างทางสรีรวิทยาของเชื้อ ทดสอบแกรม การสร้างสปอร์และการย้อมติดสี Malachite green และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิด พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท มีโคโลนีสีขาวครีม เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์รูปวงรี เจริญในสภาพที่มีอากาศ (aerobe) สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ NaCl 10% เชื้อให้ผลบวกกับการทดสอบ Catalase, Gelatin hydrolysis, Nitrate reduction และ Starch hydrolysis แต่เชื้อไม่สามารถสร้าง Indole, $H_2S$, Arginine dihydrolase และ Ornithine decarboxylase ได้ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition ผลการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้น พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (ตารางที่ 2)

ในประเทศไทยมีรายงานการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรคพืชในไม้ดอกไม่มากนัก เสมอใจและคณะ (2551) ทำการศึกษาเพื่อหาแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุม *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* เชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ของหน้าวัว โดยแยกเชื้อแบคทีเรียจากวัสดุปลูกหน้าวัว ใบหน้าวัวที่เป็นโรคและใบปกติ จำแนกเชื้อได้เป็น *B. subtilis* ทำการทดสอบการควบคุมโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ Casino และ Tropical โดยการพ่นแต่ละกลุ่มของ B1228, B1317 และ B1348 ในเรือนทดลอง ผลการทดลองพบว่า การใช้เชื้อผสม 3 ชนิด มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสามารถลดการเกิดโรคได้ 81-89% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม สำหรับในกล้วยไม้ ปิยรัตน์ และคณะ (2553) ทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* บนกล้วยไม้สกุลแวนด้าลูกผสมอายุ 4 เดือน โดยพ่นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ 5 ไอโซเลท ได้แก่ NA18, KA28, KA33, KA34, KA35 และชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท KA33 เปรียบเทียบกับการพ่นน้ำเปล่า ผลการทดสอบหลังจากพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมโรคตามกรรมวิธี 5 ครั้ง พบว่าทุกกรรมวิธีให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีกว่าการพ่นด้วยน้ำเปล่า โดยกรรมวิธีการพ่นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท KA28 กล้วยไม้แสดงอาการโรคต่ำสุด รองลงมาคือ เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท KA33 กรรมวิธีการพ่นชีวภัณฑ์แบคทีเรียไอโซเลท KA33 ให้ผลในการควบคุมโรคใกล้เคียงกับการพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท KA34 และ KA35 และในปี 2555 สุรีย์พรและคณะ ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collections และแยกเก็บจากบริเวณผิวใบของกล้วยไม้จังหวัดกาญจนบุรีเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) และ *E. chrysanthemi* (Ech) แล้วทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดในสภาพโรงเรือน พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมได้ทั้ง Ecc และ Ech ส่วนไอโซเลต 17G18 ไม่สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc ได้ โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ech ได้ดีกว่า Ecc (สุรีย์พร และ

คณะ, 2555) และยังไม่มีรายงานการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อ *B. gladioli*

**9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ**

ทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้จำนวน 27 ไอโซเลท และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* จำนวน 5 ไอโซเลท เพื่อใช้ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง พบว่ากรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS5 BS23 และ BS40 สามารถควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ได้ดี มีระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างจากกรรมวิธีพ่นด้วยน้ำเปล่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้น พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในเรือนทดลองแล้วจะนำไปทดสอบในสภาพแปลงเกษตรกรต่อไป

**10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสามารถควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ได้ดีในเรือนปลูกพืชทดลองแล้วนำมาพัฒนาต่อเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในสภาพแปลงเกษตรกรต่อไป

**11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)**

-

**12. เอกสารอ้างอิง**


กรมส่งเสริมการเกษตร. 2544. ทะเบียนเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้เพื่อการส่งออกปี 2544. กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 655 หน้า.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ สุรีย์พร บัวอาจ อัจฉรา พยัพพานนท์ และดวงพร อมัตรัตนะ. 2553. การควบคุมโรคใบจุดเหลืองของกล้วยไม้สกุลแวนด้าโดยชีววิธี. หน้า 2390-2402. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2544. สถิติการค้าสินค้าเกษตรกรรมไทยกับต่างประเทศปี 2544. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ.

สุรีย์พร บัวอาจ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล บุษราคัม อุดมศักดิ์ และรุ่งนภา คงสุวรรณ์. 2553. คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้. หน้า 857-884. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

เสมอใจ ชื่นจิตต์  วสันณ์ เพชรรัตน์ และพรศิลป์ จันทวีเมือง. 2551. การประเมินการควบคุมโรคใบไหม้ของหน้าวัวด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์. *ว. วิทยาศาสตร์การเกษตร* 39: 195-198.

**13. ภาคผนวก**

-

**ตารางที่ 1** ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้

| กรรมวิธี | ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรค | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ก่อนพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ | | | | | 7 วันหลังพ่น | 14 วันหลังพ่น |
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | ครั้งที่ 4 | ครั้งที่ 5 | ครั้งที่ 5 | ครั้งที่ 5 |
| 1. พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS3 | 1.03 | 1.14 | 1.64 | 2.26 ab[1/] | 3.22 b | 3.22 bc | 4.43 bcd |
| 2. พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS5 | 1.02 | 1.34 | 1.47 | 1.71 a | 2.14 ab | 2.20 ab | 2.90 ab |
| 3. พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS6 | 1.01 | 1.18 | 1.72 | 2.22 ab | 3.38 b | 3.39 bc | 4.76 cd |
| 4. พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS23 | 1.03 | 1.22 | 1.64 | 2.06 ab | 2.30 ab | 2.30 abc | 3.03 abc |
| 5. พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS40 | 1.02 | 1.19 | 1.54 | 1.74 a | 2.37 ab | 2.37 abc | 3.22 abc |
| 6. พ่นด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืช thiram 80% WG | 1.06 | 1.13 | 1.36 | 1.65 a | 1.70 a | 1.70 a | 2.26 a |
| 7. พ่นด้วยน้ำเปล่า | 1.01 | 1.30 | 1.84 | 2.71 b | 3.34 b | 3.54 c | 4.99 d |
| CV (%) | 3.9 | 14.9 | 27.8 | 27.0 | 29.6 | 29.8 | 30.4 |

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

**ตารางที่ 2** คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

| คุณสมบัติที่ใช้ทดสอบ | เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *Bacillus subtilis*[1/] | BS5 | BS23 | BS40 |
| Gram staining | + | + | + | + |
| Endospore | + | + | + | + |
| Anaerobic growth | - | - | - | - |
| Mobility test | + | + | + | + |
| Catalase reaction | + | + | + | + |
| Gelatin hydrolysis | + | + | + | + |
| Starch hydrolysis | + | + | + | + |
| Nitrate reduction | + | + | + | + |
| Growth in 10% NaCl | + | + | + | + |
| Indole production | nd | - | - | - |
| $H_2S$ production | nd | - | - | - |
| Arginine dihydrolase | - | - | - | - |
| Ornithine decarboxylase | - | - | - | - |

[1/] ข้อมูลจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three (2009), nd คือ ไม่มีข้อมูล, เครื่องหมาย + คือ เกิดปฏิกิริยาเป็นบวก, เครื่องหมาย - คือ เกิดปฏิกิริยาเป็นลบ