รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชโดยแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas*

นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2561
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชโดยแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas*

นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

b00265578

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2561
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 2

1.5 สมมติฐานงานวิจัย และกรอบแนวความคิดในการวิจัย 2

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 8

บทที่ 4 ผลการวิจัย 11

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 14

บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย 15

เอกสารอ้างอิง 22

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย 25

ประวัตินักวิจัย 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1	11
4.2	12
4.3	13
4.4	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชโดยแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas*
แหล่งเงิน เงินงบประมาณรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2561 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2560 ถึง 30 กันยายน 2561
หัวหน้าโครงการ: นายโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยชิ้นนี้มีคือการคัดแยกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคในพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* แบคทีเรียจำนวน 227 สายพันธุ์ถูกแยกจากดินที่โคนต้นพืช 8 ชนิดในกรุงเทพมหานครฯ นครปฐม และสุพรรณบุรี โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Hicrome Bacillus Agar และ Pseudomonas Agar Base ในแบคทีเรียจำนวนนี้พบว่า มีแบคทีเรีย 18, 17 และ 39 สายพันธุ์ที่สามารถยับยังการเจริญของเชื้อรา *C. capsici F. oxysporum* และ *R. solani* ได้ ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Dual Test การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์พบว่า ร้อยละการยับยั้งการเจริญสูงที่สุดมีค่าสูงกว่าร้อยละ 40 ในการทดสอบกับเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ยกเว้นการทดสอบระหว่างแบคทีเรียจากอาหาร Pseudomonas Base Agar กับเชื้อรา *F. oxysporum* ที่มีค่าสูงสุดอยู่ที่ร้อยละ 38.10 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสูงที่สุดจำนวน 6 สายพันธุ์พบว่า แบคทีเรียจากอาหาร HiCrome Bacillus Agar ได้แก่ สายพันธุ์ B355 และ B397 มีลักษณะเบื้องต้นสอดคล้องกับลักษณะของสกุล *Bacillus* และสายพันธุ์ B102 ไม่สอดคล้อง ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียจากอาหาร Pseudomonas Base Agar ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ P3112, P3115 และ P3119 มีลักษณะสอดคล้องกับสกุล *Pseudomonas*

คำสำคัญ : *Pseudomonas, Bacillus,* แบคทีเรียปฏิปักษ์, เชื้อราก่อโรคพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Antagonistic activities of *Bacillus* and *Pseudomonas* against phytopathogens
Researcher: Dr.Chokchai Kittiwongwattana
Faculty: Faculty of Science **Department:** Department of Biology

ABSTRACT

The main objective of this study was to isolate bacteria of genera *Bacillus* and *Pseudomonas* that harbored the antagonistic activity against three phytopathogenic fungi including *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. The total number of 227 bacterial strains was isolated from soil used for growing eight different plant species in Bangkok, Nakonpathom and Supanburi. HiCrome Bacillus Agar and Pseudomonas Base Agar were used for the isolation. The dual-culture test revealed that there were 18, 17 and 39 bacterial strains with the antagonistic activity against *C. capsici*, *F. oxysporum* and *R. solani*, respectively. The inhibition efficiency was determined. The highest inhibition percentages of antagonistic bacteria were over 40% when tested with the three fungi. The only exception was 38.10% that was found between antagonistic bacteria from Pseudomonas Base Agar and *F. oxysporum*. Preliminary morphological and biochemical characteristics of six bacterial strains with the highest inhibition percentage were determined. Strains B355 and B397 from HiCrome Bacillus Agar showed morphological and biochemical characteristics that were consistent with those of the genus *Bacillus* while strain B102 from the same medium did not. In contrast, all three strains from Pseudomonas Base Agar including P3112, P3115 and P3119 displayed the characteristics of the genus *Pseudomonas*.

Keywords : *Bacillus, Pseudomonas,* Antagonistic bacteria, Phytopathogenic fungi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเกษตรกรรมในประเทศไทยได้รับผลกระทบจากปัจจัยหลายด้านได้แก่ การชลประทาน สภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไป ตลอดจนการถูกทำลายโดยศัตรูพืชทั้งในกลุ่มที่เป็นสัตว์และจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชมีหลายกลุ่มด้วยกันได้แก่กลุ่มไวรัส แบคทีเรีย ฟังไจ และโปรโตซัว ด้วยเหตุนี้เกษตรกรจึงมีความจำเป็นต้องใช้สารเคมีหลายชนิดเป็นจำนวนมากในการป้องกันและยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช อย่างไรก็ดีการใช้สารเคมีควบคุมยับยั้งการเกิดโรคในพืชอาจส่งผลเสียให้แก่เกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมได้ ดังนั้นจึงมีความพยายามประยุกต์ใช้ตัวควบคุมทางชีวภาพที่เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคได้เพื่อลดผลกระทบจากการใช้สารเคมี โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีหลากหลายชนิดทั้งในจุลินทรีย์ในกลุ่มฟังไจและกลุ่มแบคทีเรีย จากการศึกษาค้นคว้าและพัฒนาที่ผ่านมาทำให้ในปัจจุบันมีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิดที่ถูกทดสอบและจัดจำหน่ายในรูปของผลิตภัณฑ์ทางการค้าเพื่อใช้ในการป้องกันการเกิดโรคในพืช เช่นเชื้อรา *Trichoderma harizanium* เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นต้น โครงการวิจัยนี้มุ่งศึกษาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในกลุ่มแบคทีเรียโดยแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและถูกนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านเกษตรกรรมเป็นอย่างมากทั้งในแง่ของการเป็นปุ๋ยชีวภาพและตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีซึ่งอาจตกค้างในผลผลิตและสิ่งแวดล้อมและส่งผลเสียต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในธรรมชาติ งานวิจัยหลายชิ้นที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* มีความโดดเด่นในแง่ของการสร้างสารประกอบทุติยภูมิชนิดต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราได้ งานวิจัยจำนวนมากที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในสกุลดังกล่าวนี้มีความโดดเด่นในการสร้างสารประกอบทุติยภูมิที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้เช่นสารปฏิชีวนะ zwittermicin A จากแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดโรคพืชที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบบางชนิดได้ และสารประกอบ 2,4 Diacetylphloroglucinaol ในแบคทีเรียบางสายพันธุ์ของ *Pseudomonas fluorescens* ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคในพืชได้ เป็นต้น วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยนี้คือการคัดแยกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* จากดิน แสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช 1 ชนิดได้แก่ แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และเชื้อราที่ก่อโรคในพืช 3 ชนิดได้แก่ *Fusarium oxysporum, Rhizoctonia solani* และ *Colletotrichum capsici* เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ก่อให้เกิดโรคเหี่ยว (Bacterial wilt) ในพืชวงศ์ Solanaceae เช่น ยาสูบ มะเขือเทศ มันฝรั่ง เป็นต้น และยังก่อให้เกิดโรคในกล้วยได้ด้วย เชื้อรา *R. solani* ก่อให้เกิดโรคพืชหลายรูปแบบ เช่น โรคเน่าคอดิน (damping-off) ซึ่งเป็นอาการของโรคที่พบโดยทั่วไปในพืชหลากหลายชนิด ขี้กลาก (canker) ที่เกิดขึ้นกับฝ้าย ยาสูบ และโรคกาบใบแห้ง (sheath blight) ซึ่งเกิดขึ้นในข้าว เป็นต้น เชื้อรา *F. oxysporum* ก่อให้เกิดโรคเหี่ยว (wilt) ขึ้นในมะเขือเทศและกล้วย ส่วนเชื้อรา *C. capsici* ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส (anthraxnose) ในพริก โครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วนด้วยกันได้แก่การคัดแยกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* จากดิน, การทดสอบการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิด และการทดสอบพิสูจน์ลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นทั้งลักษณะทางฟีโนไทป์และทางชีวเคมี ผลที่จะได้รับจากโครงงานวิจัยนี้คือแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างน้อย 1 ชนิดเพื่อนำไปศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งและสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในงานทางด้านเกษตรกรรมต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อคัดแยกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* จากดิน
- เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช *R. solanacearum, F. oxysporum, R. solani* และ *C. capsici* โดยแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* ที่คัดแยกมาได้
- เพื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* ที่แสดงกิจกรรมยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ hichrome *Bacillus* agar และอาหาร *Pseudomonas* agar base ตามลำดับ โดยคัดแยกจากดินในแหล่งปลูกพืชที่ต่างกันอย่างน้อย 2 แหล่งเพื่อให้ได้แบคทีเรียอย่างน้อย 150 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช 4 ชนิดได้แก่ *R. solanacearum, F. oxysporum, R. solani* และ *C. capsici* โดยวิธีทดสอบที่ใช้คือวิธี dual culture แบคทีเรียที่แสดงผลบวกกับการทดสอบถูกนำมาศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานเบื้องต้นได้แก่ลักษณะรูปร่างของโคโลนี, การติดสีแกรม, กิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลส สำหรับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, กิจกรรมของเอนไซม์ออกซิเดสและการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas*

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอน 3 ขั้นตอนได้แก่ การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกเชื้อ การทดสอบการยับยั้งรากอ่อโรคพืช และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ

1.5 สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* และ *Bacillus* มีประสิทธิภาพสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราก่อโรคในพืชได้ จึงควรคัดแยกแบคทีเรียในสกุลเหล่านี้มาศึกษาเพิ่มเติม

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่ถูกจัดอยู่ในไฟลัม *Firmicutes* คลาส *Bacilli* ออเดอร์ *Bacillales* วงศ์ *Bacillaceae* (Prescott) ในปัจจุบันมีแบคทีเรียที่ถูกจัดจำแนกให้อยู่ในสกุล *Bacillus* อย่างเป็นทางการแล้วจำนวน 336 ชนิด และมีแบคทีเรีย type species คือ *Bacillus subtilis* (http://www.bacterio.net) แบคทีเรียที่เป็นสมาชิกของสกุลนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกหรือแกรมลบ สร้างสปอร์ชนิด endospore ได้โดยมีสปอร์เพียง 1 สปอร์ต่อ 1 เซลล์ สปอร์มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตตลอดจนทนทานต่อรังสี สารฆ่าเชื้อทำความสะอาดพื้นผิว เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) ซึ่งเซลล์ของแบคทีเรียในสกุลนี้อาจอยู่เดี่ยวๆ อยู่เป็นคู่ หรือเรียงตัวต่อกันเป็นโซ่ แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่ถูกคัดแยกได้จากดิน หรือตัวอย่างที่มีดินปนเปื้อน (Logan and Vos, 2015) นอกจากนี้ยังมีหลายสปีชีส์ที่ถูกคัดแยกได้จากสภาวะแวดล้อมอื่นๆ ด้วย เช่น ทะเลสาบน้ำเค็ม อาหาร และ น้ำ เป็นต้น (Mathan Kumar *et al.*, 2015) บางชนิดต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (aerobes) ในขณะที่บางชนิดสามารถเจริญเติบโตในที่ๆ มีหรือไม่มีอากาศได้ (facultative anaerobes) ดีเอ็นเอของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีองค์ประกอบเป็นเบส G และ C (G+C content) อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 32-66 แบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีทั้งชนิดที่เคลื่อนที่ไม่ได้ และเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาแบบ peritrichous flagella นอกจากนี้ลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งของแบคทีเรียเกือบทั้งหมดในสกุลนี้คือให้ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลสเป็นบวก ในอดีตการจัดจำแนกแบคทีเรียให้อยู่ในสกุล *Bacillus* เป็นไปอย่างไม่ถูกต้องนักจึงทำให้มีสกุลนี้ประกอบไปด้วยแบคทีเรียที่มีความหลากหลายทางด้านลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์เป็นอย่างมาก อย่างไรก็ดีการศึกษาลำดับเบสของยีนที่กำหนดการสร้าง ribosomal RNA (rRNA) ของแบคทีเรียทำให้สมาชิกเดิมของสกุล *Bacillus* ถูกจัดให้อยู่ในสกุลใหม่อื่นๆ เช่นสกุล *Alicyclobacillus* เป็นสกุลของแบคทีเรียที่มีลักษณะบางประการแตกต่างจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เช่น สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด (acidophile) และเซลล์ย้อมติดสีแกรมบวกหรือแกรม variable ดีเอ็นเอมีองค์ประกอบเป็นเบส G และ C ในปริมาณระหว่างร้อยละ 51 ถึง 60 และเซลล์สร้างกรดไขมันชนิด ω-alicyclic ในขณะที่สกุล *Paenibacillus* เป็นสกุลของแบคทีเรียที่ถูกจัดตั้งขึ้นมาใหม่โดยมีทั้งสมาชิกที่เซลล์เป็นรูปแท่งย้อมติดสีแกรมบวก แกรมลบ และแกรม variable เป็นต้น (Prescott *et al.*, 2002) แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่ก่อให้เกิดโรคในคนหรือสัตว์ ยกเว้นเพียงบางสปีชีส์ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *Bacillus* บางสายพันธุ์เป็นสาเหตุของการเกิดอาหารเป็นพิษ *Bacillus anthraxis* เป็นสาเหตุของการเกิดโรควัวบ้า (anthrax) ที่เป็นอันตรายต่อปศุสัตว์และมนุษย์ (Logan and Vos, 2015) อย่างไรก็ดีมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์เช่น *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตโปรตีน Bt toxin ซึ่งเป็นพิษต่อแมลงศัตรูพืชและถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพตลอดจนมีการตัดต่อยีนจากแบคทีเรียชนิดนี้เข้าสู่พืชด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรมเพื่อให้พืชผลิตโปรตีน Bt toxin ได้เอง (Prescott *et al.*, 2002)

สกุล *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในไฟลัม *Proteobacteria* คลาส *Gammaproteobacteria* ออร์เดอร์ *Pseudomonadales* และวงศ์ *Pseudomonadaceae* (Bergey) สกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นี้ประกอบไปด้วยแบคทีเรียจำนวน 235 สปีชีส์ (http://www.bacterio.net) ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งที่อยู่อาศัยที่หลากหลายเช่น ร่างกายของสัตว์ ต้นพืช ดิน และ น้ำ เป็นต้น (von Neubeck *et al.*, 2015) แบคทีเรีย type species ของสกุล *Pseudomonas* คือ *Pseudomonas aeruginosa* เซลล์มีรูปร่างแบบแท่ง (rods) หรือโค้งงอเล็กน้อย ขนาดของเซลล์อยู่ระหว่าง 0.5-1.0 x 1.5-5.0 μm เมื่อย้อมสีด้วยวิธีแกรมติดสีแบบแกรมลบ แบคทีเรียในสกุลนี้เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาเพียง 1 อัน บางสปีชีส์มีแฟลกเจลลาหลายอันที่เรียงตัวอยู่ทางขั้วใดขั้วหนึ่งของเซลล์ (polar flagella) เจริญเติบโตในที่ๆ มีอากาศ (aerobes) โดยมีแกสออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็คตรอนตัวสุดท้ายในขั้นตอนการถ่ายทอดอิเลคตรอนยกเว้นในบางสภาวะที่ไนเตรตทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลคตรอนซึ่งช่วยให้แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ ลักษณะที่สำคัญของสกุล *Pseudomonas* อีกประการหนึ่งคือแบคทีเรียในสกุลนี้ไม่สร้างสาร xanthomonadin แตกต่างไปจากแบคทีเรียในสกุล *Xanthomonas* ที่เป็นสกุลที่ใกล้เคียงกัน ไม่พบการเจริญเติบโตในสภาวะที่ค่า pH ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 4.5 ชนิดของกรดไขมันที่สำคัญที่พบในแบคทีเรียสกุลนี้คือ $C_{10:0}$3-OH, $C_{12:0}$ และ $C_{12:0}$ 2-OH ชนิดของ ubiquinone ที่พบคือชนิด Q-9 ส่วนดีเอ็นเอมีองค์ประกอบเป็นเบส G และ C อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 58-69 (Logan and Vos, 2015) การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* พบว่ามีบางสปีชีส์เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้แก่ มนุษย์ สัตว์ และพืช ตัวอย่างเช่น ภาวะการติดเชื้อในมนุษย์ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำกว่าปกติโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* บางสายพันธุ์ (Prescott *et al.*, 2002) และแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* ที่ก่อโรคจุดและไหม้ในพืช หลากหลายชนิด (Sarkar and Guttman, 2004) เป็นต้น ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* หลายสายพันธุ์ถูกพบว่ามีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรกรรมด้วย ตัวอย่างเช่นความสามารถในการเพิ่มการละลายของสารประกอบ tricalcium phosphate โดยแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* ที่อาจช่วยเพิ่มปริมาณแร่ธาตุฟอสฟอรัสให้แก่พืชได้ (Pii *et al.*, 2015)

แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในไฟลัม *Proteobacteria* คลาส *Betaproteobacteria* อร์เดอร์ *Burkholderiales* และวงศ์ *Burkholderiaceae* การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในสปีชีส์นี้ทั้งในแง่ของการก่อให้เกิดโรคในพืช ความจำเพาะเจาะจงต่อพืช และการศึกษาสายสัมพันธ์ (phylogeny) จากลำดับเบสบนดีเอ็นเอพบว่าแบคทีเรีย *R. solanacearum* มีความหลากหลายสูง การวิเคราะห์สายสัมพันธ์โดยอาศัยลำดับเบสของบริเวณ 16S-23S intergenic region, ยีน *hrpB* และยีน *egl* รวมไปถึงการวิเคราะห์การเข้าคู่กันของดีเอ็นเอโดยวิธี comparative genomic hybridization แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ต่างๆ ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มที่เรียกว่า Phylotype ประกอบไปด้วย Phylotype I, II, III และ IV โดย Phylotype I, II และ III ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ที่ส่วนใหญ่ถูกพบในทวีปเอชีย, อเมริกา และแอฟริกาตามลำดับ ส่วนกลุ่ม Phylotype IV ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ที่พบในประเทศอินโดนีเซีย, ญี่ปุ่น, ออสเตรเลีย และฟิลิปปินส์ การศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยวิธี multilocus sequence analysis เพิ่มเติมช่วยให้นักจุลชีววิทยาเข้าใจสามารถแบ่งแบคทีเรียในกลุ่ม Phylotypes ต่างๆ ให้เป็นกลุ่มย่อย (clade) ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการลงไปได้อีก โดยกลุ่ม Phylotypes I และ III มีกลุ่มย่อยเพียง 1 กลุ่มย่อย ส่วนกลุ่ม Phylotype II และ IV ประกอบไปด้วยกลุ่มย่อยจำนวน 4 และ 2 กลุ่มย่อยตามลำดับ (Safni *et al.*, 2014) *R. solanacearum* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินและก่อให้เกิดโรคเหี่ยว (bacterial wilt) ในพืชวงศ์ Solanaceae เช่น มะเขือเทศ มันฝรั่ง ยาสูบ เป็นต้น (Agrios, 2005, Safni *et*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

al., 2014) นอกจากนี้แบคทีเรีย *R. solanacearum* ยังสามารถก่อให้เกิดโรคในพืชอื่นๆ ได้ด้วยเช่น กล้วย, ขิง , ยูคาลิปตัส เป็นต้น (Safni *et al.*, 2014) ลักษณะอาการของโรคเหี่ยวที่ปรากฏบนพืชคือการเหี่ยวของพืชอย่างรวดเร็ว ในพืชที่มีอายุมากอาการเหี่ยวจะเกิดขึ้นกับใบที่มีอายุน้อยที่สุดก่อนและการเจริญเติบโตชะงักลง จนกระทั่งต้นพืชเหี่ยวลงทั้งหมดอย่างถาวรและตายลงในที่สุด ถ้าหากต้นอ่อนของพืชถูกบุกรุกโดย *R. solanacearum* ต้นอ่อนจะตายลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ในพืชบางชนิดเช่น มะเขือเทศ การบุกรุกของแบคทีเรียอาจกระตุ้นให้ต้นพืชสร้างรากพิเศษเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อสำรวจลักษณะทางกายวิภาคภายในต้นพืชจะพบว่าเนื้อเยื่อลำเลียงของลำต้น, ราก และหัว ของพืชเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล และการนำชิ้นส่วนของต้นพืชไปแช่น้ำจะพบว่าเกิดลักษณะ bacterial ooze ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียละลายออกมาจากเนื้อเยื่อลำเลียงของพืช การแพร่กระจายของเชื้อโรคมักเกิดขึ้นจากการปลูกต้นพืชลงดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* อาศัยอยู่ หรืออาจเกิดจากการสัมผัสกันระหว่างอุปกรณ์การเพาะปลูกกับต้นพืชที่เป็นโรค แล้วนำอุปกรณ์นั้นไปใช้งานต่อโดยไม่ผ่านการทำความสะอาด วิธีการควบคุมและป้องกันการเกิดโรคเหี่ยวโดยทั่วไปแล้วทำได้โดยใช้ต้นพืชที่เป็นสายพันธุ์ต้านทานโรคและการปลูกพืชแบบหมุนเวียนตลอดจนการใช้อุปกรณ์ที่ไม่มีเชื้อโรคปนเปื้อน เป็นต้น (Agrios, 2005)

เชื้อรา *Rhizoctonia solani* ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม basidiomycetes (plant pathology book) และเป็นเชื้อโรคที่อาศัยอยู่ในดินทั้งในดินที่ใช้ในการเพาะปลูกพืชและดินทั่วๆ ไป เชื้อราชนิดนี้เจริญเติบโตในดินในรูปแบบ sclerotia ซึ่งทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งได้ดี และไม่มีการสร้างสปอร์ที่ไม่อาศัยเพศ เชื้อ *R. solani* สามารถบุกรุกเข้าสู่พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้หลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด มันฝรั่ง เป็นต้น การแพร่ระบาดของโรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อ *R. solani* พบในพื้นที่เพาะปลูกทั่วโลก (Agrios, 2005; Foley *et al.*, 2013) สปีชีส์ *R. solani* มีความหลากหลายสูงทั้งในแง่ของความสามารถในการก่อโรค ลักษณะภายนอกของเชื้อรา และลำดับเบสของดีเอ็นเอ ดังนั้นไอโซเลตต่างๆ ของเชื้อราชนิดนี้จึงถูกจำแนกออกเป็นกลุ่มย่อยที่เรียกว่า anastomois group (AG) จำนวน 13 กลุ่มตัวอย่างเช่น ไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรค bare patch ในกลุ่มธัญพืชและพืชตระกูลถั่วคือไอโซเลตที่อยู่ในกลุ่ม AG8 ในขณะที่ไอโซเลตที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม AG2-1 นั้นทำให้เกิดโรคในคาร์โนลาแต่ไม่สามารถบุกรุกเข้าสู่ข้าวสาลี ข้าวโอตได้ เป็นต้น (Foley *et al.*, 2013) การแพร่กระจายของเชื้อราชนิดนี้เกิดขึ้นได้หลายทางทั้งโดยธรรมชาติและมนุษย์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเข้าบุกรุกของเชื้อราชนิดนี้แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์โดยบางสายพันธุ์อาจบุกรุกพืชได้ดีที่อุณหภูมิในช่วงระหว่าง 15-18 องศาเซลเซียส ในขณะที่บางสายพันธุ์สามารถบุกรุกพืชได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 35 องศาเซลเซียส การควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อรา *R. solani* ทำได้ยาก และเชื้อราสามารถอาศัยอยู่ภายในดินได้เป็นระยะเวลายาวนาน โดยทั่วไปวิธีการป้องกันการเกิดโรคโดยราชนิดนี้ทำได้โดยเพาะปลูกเมล็ดที่ปราศจากเชื้อราในดินที่ไม่มีน้ำขัง นอกจากนี้อาจเติมสารเคมี pentachloronitrobenzene ลงไปในดินเพื่อช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Agrios, 2005) อย่างไรก็ดีวิธีการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ *R. solani* มีประสิทธิภาพไม่สูงนักและการค้นหาสายพันธุ์ของพืชที่มียีนต้านทานการบุกรุกของเชื้อรายังไม่ประสบผลสำเร็จ (Foley *et al.*, 2013)

เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ต่างๆ ที่จัดจำแนกเป็นกลุ่มย่อยที่ไม่เป็นทางการ (*formae specialis*) มากกว่า 120 กลุ่มตามความสามารถในการบุกรุกพืชที่แตกต่างกัน เส้นใยของเชื้อราใช่ช่วงแรกมีสีขาว เมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนสีไปเป็นสีอื่นๆ ตัวอย่างเช่น เส้นใยของ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* เปลี่ยนเป็นสีครีม, เหลืองอ่อน, สีชมพูอ่อน จนถึงสีม่วง เชื้อรา *F.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

oxysporum สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ 3 ประเภทคือ microconidia ที่ประกอบไปด้วยเซลล์เพียง 1 หรือ 2 เซลล์และเป็นประเภทที่ถูกสร้างขึ้นมาได้ในสภาพการเจริญเติบโตทุกสภาพรวมไปถึงในขณะที่เชื้อราอาศัยอยู่ภายในต้นพืช macroconidia ประกอบไปด้วยเซลล์ประมาณ 3-5 เซลล์ บริเวณปลายของสปอร์มีลักษณะแหลมหรือมน สปอร์ประเภทนี้พบได้ที่ผิวของต้นพืชที่ตายลงเนื่องจากการบุกทำลายของเชื้อรา สปอร์ประเภทที่ 3 คือ chlamydospore ที่ประกอบไปด้วยเซลล์ 1 หรือ 2 เซลล์ ผนังเซลล์หนา มีลักษณะเป็นทรงกลม ถูกสร้างขึ้นมาโดยเส้นใยที่มีอายุมาก สปอร์ทั้ง 3 ชนิดถูกสร้างขึ้นมาโดยเส้นใยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยที่อาศัยอยู่ภายในดิน อย่างไรก็ดีสปอร์ที่สามารถอาศัยอยู่ภายในดินเป็นระยะเวลานานได้มีเพียง chlamydospore เท่านั้น เชื้อรา *F. oxysporum* สามารถอาศัยอยู่ภายในดินได้ทั้งในลักษณะที่เป็นเส้นใยหรือสปอร์ เมื่อพืชเจริญเติบโตขึ้นในดินที่มีเชื้อราชนิดนี้อยู่ เส้นใยที่เจริญเติบโตมาจากสปอร์จะเริ่มบุกรุกต้นพืชผ่านทางปลายรากหรือบาดแผลที่อยู่บนรากแล้วเข้าสู่เนื้อเยื่อลำเลียงไซเลมของพืชเพื่อเพิ่มจำนวนของเส้นใยภายในพืชพร้อมๆ กับทำให้เนื้อเยื่อลำเลียงเกิดการอุดตันส่งผลให้ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยวเฉาลง การแพร่กระจายของเชื้อราเกิดขึ้นทั้งจากปัจจัยทางธรรมชาติ เช่น ลม ฝน และปัจจัยทางมนุษย์ เช่นการใช้อุปกรณ์ที่ปนเปื้อนเชื้อรา เป็นต้น การควบคุมการแพร่ระบาดของโรคในไร่ปลูกทำได้โดยการใช้สายพันธุ์พืชที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ตัวควบคุมทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้งที่เป็น *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค หรือการใช้เชื้อราอื่นๆ เช่น *Trichoderma* และแบคทีเรียต่างๆ เช่น *Pseudomonas fluorescens* และ *Burkholderia cepacia* เป็นต้น (Agrios, 2005)

เชื้อรา *Colletotrichum capsici* ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Coelomycetes และก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในพริกและก่อให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตของเกษตรกรในประเทศต่างๆ เป็นอย่างมาก อาการของโรคนี้คือรอยแผลที่เป็นวงกลมซึ่งมีลักษณะยุบลงไปและมีสีดำบนใบ, ลำต้น และผลของพริก รอยแผลนี้คือ fruiting body ของเชื้อราและภายในบรรจุสปอร์ชนิด conidia การแพร่กระจายของเชื้อราเกิดขึ้นผ่านทางลมและฝน นอกจากนี้เชื้อราอาจอาศัยอยู่ภายในเมล็ดและแพร่กระจายต่อไปได้ด้วย การควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อราทำได้โดยการใช้ยากันราเช่น mancozep, propineb และ strobilurin โดยฉีดพ่นยาที่ใบหรือการคลุกยากับเมล็ด อย่างไรก็ดีในปัจจุบันพบว่ามีสายพันธุ์ของ *C. capsici* ที่ต้านทานต่อสารเคมีเพิ่มมากขึ้น (Than *et* al., 2008; Garg *et al.*, 2013; Saxena *et al.*, 2016) วิธีการอื่นที่ถูกนำมาศึกษาเพื่อควบคุมการเกิดโรคคือการใช้ต้นพืชสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อรา (Garg *et al.*, 2013)

การควบคุมโรคพืชทางชีวภาพหรือ biocontrol หมายถึงการใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อก่อโรคในพืชเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคและการเกิดโรคในพืช กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบได้แก่กลไกทางตรงคือการที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีผลต่อการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยการสร้างสารประกอบต่างๆ เช่นสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างเซลล์ของเชื้อก่อโรค การปล่อยสารเคมีที่เป็นพิษต่อเชื้อก่อโรค ตลอดจนการดำรงชีวิตแบบปรสิตในเชื้อก่อโรค กลไกที่สองคือกลไกทางอ้อมซึ่งเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์กระตุ้นให้ต้นพืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคโดยที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไม่มีผลโดยตรงต่อเชื้อก่อโรค นอกจากนี้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยังยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทางอ้อมได้โดยการแข่งขันแย่งสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตได้ด้วย (Pal and Gardener, 2006) การจัดการควบคุมโรคพืชในลักษณะนี้มีข้อดีคือช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชซึ่งอาจตกค้างอยู่ในพืชแล้วส่งผลกระทบทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุขภาพต่อเกษตรกรและผู้บริโภค หรือการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น งานวิจัยที่ศึกษาการใช้แบคทีเรีย *P. fluorescens* and *Pantoea agglomerans* ในการควบคุมการเกิดโรค fire blight ในการเพาะปลูกแพร์และแอปเปิล โดยเชื้อ *Erwinia amylovora* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคดังกล่าว การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Pusey, 2002) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งพบว่าสารประกอบ 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) ที่สร้างโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในสกุล *Pseudomonas* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ที่ก่อให้เกิดโรคขอบใบแห้งในข้าวได้ (Velusamy *et al.*, 2006) ตัวอย่างงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus polymyxa* VLB16 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *Pyricularia grisea* ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยกลไกที่เกี่ยวข้องคือการสร้างโปรตีนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Kavitha *et al.*, 2005) ตัวอย่างงานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* มีศักยภาพสูงในการนำมาพัฒนาเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพสำหรับโรคพืชต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินจะถูกเก็บรวบรวมมาจากแหล่งปลูกพืชที่ต่างกัน 2 แหล่ง จากนั้นนำดินปริมาณ 1 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารละลายดินให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-6} โดยการผสมสารละลายดินเริ่มต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตรแล้วทำต่อไปเป็นลำดับจนได้ความเข้มข้นของสารละลายดินที่ต้องการ สารละลายที่ได้จากการผสมแต่ละครั้งถูกทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการใช้เครื่อง vortex

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas*

สารละลายดินความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-6} ที่เตรียมได้ถูกนำมาใช้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* โดยนำสารละลายดังกล่าวปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรมาเกลี่ยให้ทั่วบนผิวหน้าอาหาร Hi Chrome Bacillus agar สำหรับคัดเลือกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และอาหาร Pseudomonas base agar ที่เติมสารคัดเลือก CFC supplement ลงไปแล้ว จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วันโดยสังเกตการเกิดโคโลนีทุกวันแล้วคัดเลือกโคโลนีที่เจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกทั้ง 2 ชนิดมาทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี cross streak บนอาหาร nutrient agar ต่อไป

การย้อมสีแกรมและการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียมาละลายในหยดน้ำบนสไลด์แล้วเกลี่ยให้ทั่วสไลด์เพื่อเตรียมรอยสเมียร์ จากนั้นนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้งเพื่อตรึงเซลล์ให้ติดกับสไลด์แล้วจึงนำไปย้อมสี crystal violet เป็นระยะเวลา 1 นาทีแล้วล้างออกด้วยสารละลายไอโอดีนแล้วหยดไอโอดีนทับรอยสเมียร์ต่อไปทิ้งไว้นาน 1 นาทีจากนั้นล้างสีออกด้วย 95% ethanol ภายใน 20 วินาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นย้อมสีด้วย safranin O นาน 1 นาทีแล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น รอให้สไลด์แห้งแล้วนำไปส่องดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป

การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค *R. solanacearum*

ขีดเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ลงบนอาหาร nutrient agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ระหว่างนี้เขี่ยเชื้อ *R. solanacearum* ลงบนอาหาร nutrient agar จนได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นเขี่ยเชื้อ *R. solanacearum* ลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้อยู่โดยขีดให้รอยของเชื้อโรคตั้งฉากและใกล้กับรอยของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ นำจานเลี้ยงเชื้อนี้ไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วันจากนั้นตรวจผลดูการเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคโดยแบคทีเรียที่แยกได้ต่อไป

การเปรียบเทียบยืนยันผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *R. solanacearum*

เตรียมการทดลองเหมือนกับการทดลองในขั้นตอนการทดสอบ เชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตถูกนำมาทดสอบ 3 ซ้ำ พร้อมๆ กับเตรียมจานควบคุมซึ่งมีแต่เชื้อ *R. solanacearum* จากนั้นบ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วันแล้วนำจานทดสอบกับจานควบคุมมาวัดระยะของรอยเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R. solanacearum จากนั้นคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการเจริญของ *R. solanacearum* โดยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตในแต่ละซ้ำจากสูตรด้านล่าง

ร้อยละของการยับยั้ง = ความยาวของรอยเชื้อ *R. solanacearum* ในจานทดลอง

ความยาวของรอยเชื้อ *R. solanacearum* ในจานควบคุม

การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani, F. oxysporum* และ *C. capsici*

เพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิดบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จนกระทั่งเส้นใยเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจากนั้นใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมากรีดอาหารให้เป็นช่องสี่เหลี่ยมจำนวนมากแล้วนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราอยู่นั้นไปวางบนอาหาร PDA จานใหม่แล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ลงไปโดยรอบเชื้อราโดยให้มีระยะห่างประมาณ 1.5 เซนติเมตร จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาประมาณ 3-5 วันขึ้นกับชนิดและการเจริญเติบโตของเชื้อรา จากนั้นตรวจสอบผลจากการเกิดบริเวณยับยั้งระหว่างเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค

การเปรียบเทียบยืนยันผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค

เตรียมเพาะเลี้ยงเชื้อราดังการทดลองในขั้นตอนการทดสอบโดยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราอยู่ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ลงบนอาหาร PDA โดยที่จานเลี้ยงเชื้อ 1 จานจะใส่เชื้อแบคทีเรียเพียง 1 เชื้อ โดยระยะห่างระหว่างเชื้อราและแบคทีเรียคือ 1.5 เซนติเมตร จานควบคุมคือเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ไม่ได้ใส่เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ลงไป โดยเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตถูกนำมาทดสอบเป็นจำนวน 3 ซ้ำต่อเชื้อ จากนั้นวัดระยะของรัศมีของเชื้อราทางด้านที่อยู่ระหว่างเชื้อรากับแบคทีเรียบนจานทดลองเทียบกับจานควบคุมเพื่อนำมาคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งตามสูตรด้านล่าง

ร้อยละของการยับยั้ง = ความยาวของรอยเชื้อราในจานทดลอง

ความยาวของรอยเชื้อราในจานควบคุม

การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์คะตาเลส

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้และให้ผลบวกกับการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 วันจากนั้นเขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงไปบนกระจกสไลด์แล้วหยดสารละลาย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปทับรอยเชื้อแล้วสังเกตการเกิดฟองอากาศซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงกิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลสในแบคทีเรียดังกล่าว

การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ออกซิเดส

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 วันจากนั้นเขี่ยเชื้อลงไปบนกระดาษกรองที่เปียกสารละลาย 1% *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride ที่ละลายในน้ำกลั่น โดยแบคทีเรียที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ออกซิเดสจะเปลี่ยนสีกระดาษกรองเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อมาแทงลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะเป็น semi-solid agar แล้วเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 วัน ตรวจผลการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียได้จากการแผ่ของรอยการเจริญของเชื้อจากรอยเข็มแทงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

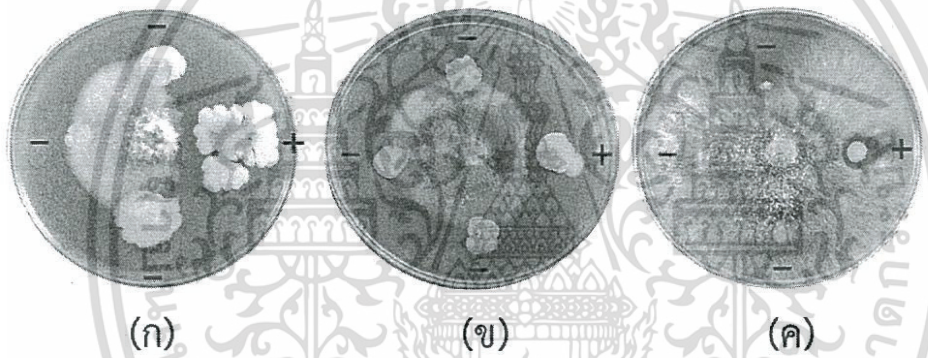
การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในสารละลายกลีเซอรอล

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วันจากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อเขี่ยเอาแบคทีเรียมาละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 600 ไมโครลิตรในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำกลั่นแล้วเติมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 50 % ลงไปผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียจากดินเพาะปลูกพืชทั้ง 8 ชนิดพบว่าคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 227 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อจากเขตกรุงเทพมหานคร จังหวัดนครปฐม และจังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 25, 69 และ 133 สายพันธุ์ ตามลำดับ แบ่งเป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากอาหาร HiCrome Bacillus Agar จำนวน 97 สายพันธุ์ และจากอาหาร Pseudomonas Base Agar จำนวน 130 สายพันธุ์ แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทุกสายพันธุ์ถูกนำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืชด้วยวิธี dual culture ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหาร HiCrome Bacillus Agar จำนวน 9, 10 และ 26 สายพันธุ์ และมีแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหาร Pseudomonas Base Agar จำนวน 9, 7 และ 13 สายพันธุ์ที่แสดงบริเวณยับยั้งเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar ร่วมกับเชื้อรา *C. capsici F. oxysporum* และ *R. solani* ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



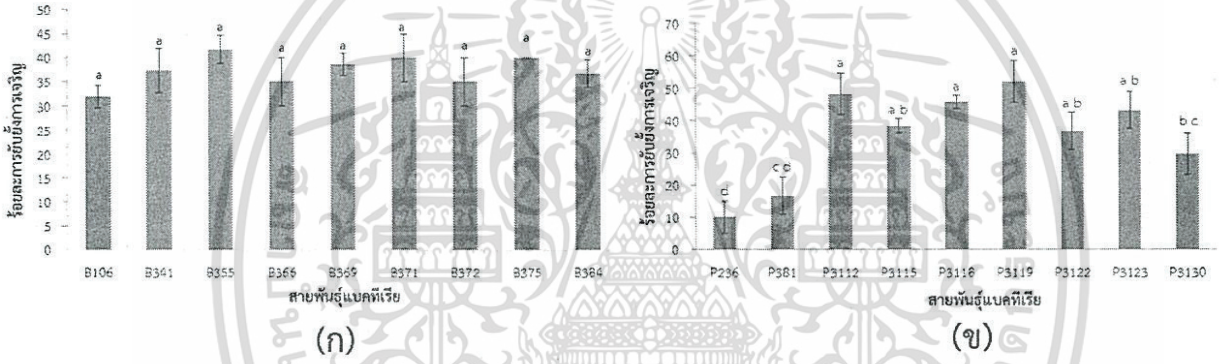
ภาพที่ 4.1 ผลการทดสอบเบื้องต้นในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา รา *C. capsici* (ก), *F. oxysporum* (ข) และ *R. solani* (ค) โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เครื่องหมาย + คือมีการยับยั้ง เครื่องหมาย – คือไม่มีการยับยั้ง

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่า ร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร HiCrome Bacillus Agar มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 31.94 ถึงร้อยละ 41.67 โดยแบคทีเรียที่ให้ค่าร้อยละการยับยั้งดีที่สุดคือสายพันธุ์ B355 (ร้อยละ 41.67±2.89) (ภาพที่ 2 ก) ส่วนแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร Pseudomonas Base Agar มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 10.00 ถึงร้อยละ 51.85 โดยแบคทีเรียที่ให้ค่าร้อยละการยับยั้งสูงที่สุด ได้แก่ P3119 (ร้อยละ 51.85±2.14) (ภาพที่ 2ข) ผลการประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* (ภาพที่ 3) พบว่า แบคทีเรียจากอาหาร HiCrome Bacillus Agar และ Pseudomonas Base Agar แสดงค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อยู่ระหว่างร้อยละ 5.88 ถึงร้อยละ 46.47 และ ร้อยละ 7.94 ถึงร้อยละ 38.10 ตามลำดับ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดจากอาหารแต่ละชนิดคือสายพันธุ์ B397 (ร้อยละ 46.47±6.11) และ P3116 (ร้อยละ 38.10±4.76) ตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* (ภาพที่ 4) พบว่า แบคทีเรียจากอาหาร HiCrome Bacillus Agar มีประสิทธิภาพอยู่ระหว่างร้อยละ 14.29 ถึงร้อยละ 48.15 และสายพันธุ์ที่ยับยั้งได้ดีที่สุดคือ B102 (ร้อยละ 48.15±3.45) ในขณะที่แบคทีเรียจากอาหาร Pseudomonas Base Agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีร้อยละของการยับยั้งอยู่ระหว่างร้อยละ 28.40 ถึงร้อยละ 48.15 โดยสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดคือสายพันธุ์ P3112 (ร้อยละ 48.15±0.17)

สายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสูงที่สุดจากอาหารแต่ละชนิดรวมทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ถูกนำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้น แบคทีเรียสายพันธุ์ B355 และ B397 ติดสีแกรมบวก เซลล์เป็นรูปท่อน สร้างสปอร์ และมีกิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลส ลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* (9) ดังนั้นแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะอยู่ในสกุลดังกล่าว ในขณะที่สายพันธุ์ B102 ติดสีแกรมลบ เซลล์เป็นรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ และตรวจไม่พบเอนไซม์คะตาเลส แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์นี้อาจไม่อยู่ในสกุล *Bacillus* เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ P3112 P3116 และ P3119 มาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นแล้วพบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ย้อมติดสีแบบแกรมลบ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน เคลื่อนที่ได้ สร้างเอนไซม์คะตาเลส และสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดสตรงกับลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* (10)



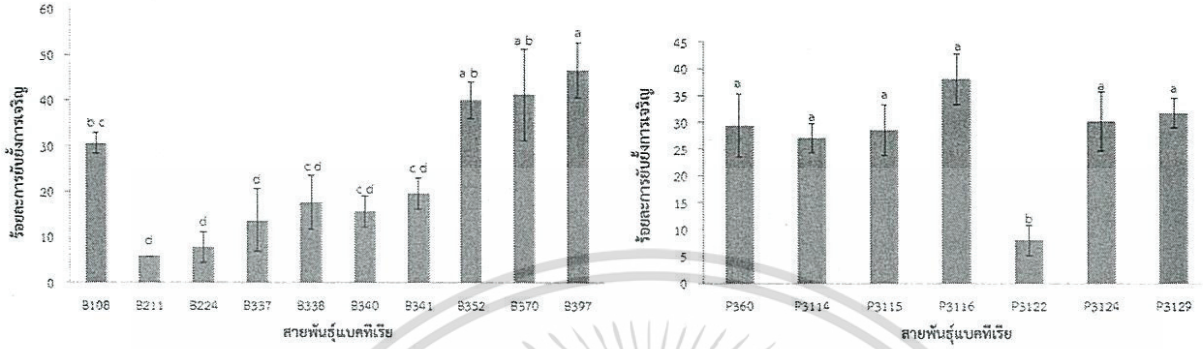
ภาพที่ 4.2 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* โดยแบคทีเรียจากอาหาร HiCrome Bacillus Agar (ก) และอาหาร Pseudomonas Base Agar (ข) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการทดลองในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่แสดงให้เห็นว่าสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* ประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืช ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *Bacillus atrophaeus* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ที่แยกได้จากดินและสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* (11) การยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* และ *R. solani* โดยแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ Q-426 (12) การยับยั้งเชื้อรา *Magnaporthe grisea, R. solani. C. capsici, F. oxysporum* โดยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PUPa3 (13)

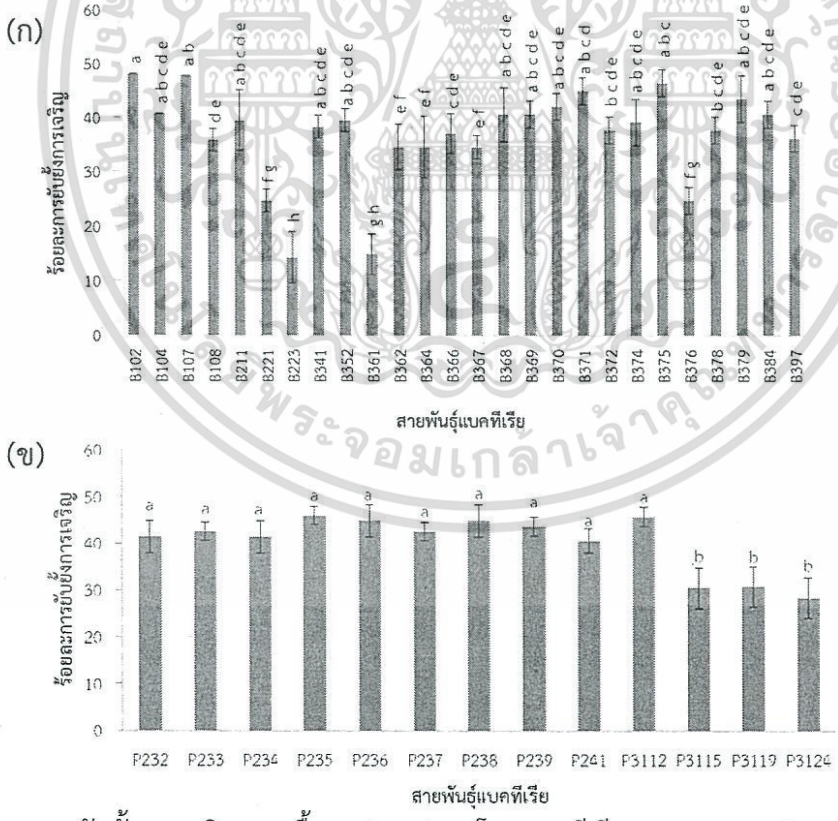
กลไกการยับยั้งเชื้อราก่อโรคของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สำคัญและมีความน่าสนใจคือการสร้างสารปฏิชีวนะ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ค่อนข้างหลากหลาย ตัวอย่างเช่น สารปฏิชีวนะ fengycin, bacilysin, difficidin ที่สร้างโดยแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* (2, 14-16) และสารปฏิชีวนะ phenazine, amphisin, 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) ที่พบในแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* เป็นต้น (17-18) อย่างไรก็ดีการจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสกุลในงานวิจัยนี้เป็นเพียงการจัดจำแนกในระดับเบื้องต้นเท่านั้น เพื่อให้ได้ข้อมูลการจัดจำแนกที่ถูกต้องจำเป็นต้องนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์มาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนที่นิยมใช้ในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย (19) เพื่อให้สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสกุลได้อย่างมีประสิทธิภาพขึ้น



ภาพที่ 4.3 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* โดยแบคทีเรียจากอาหาร HiCrome Bacillus Agar (ก) และอาหาร Pseudomonas Base Agar (ข) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.4 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* โดยแบคทีเรียจากอาหาร HiCrome Bacillus Agar (ก) และอาหาร Pseudomonas Base Agar (ข) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรียที่อยู่ในดินที่ใช้ปลูกพืชชนิดต่างๆ ได้ทั้งสิ้น 227 สายพันธุ์ด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ HiCrome Bacillus Agar และ Pseudomonas Base Agar ในจำนวนนี้มีแบคทีเรียที่ยับยั้งราก่อโรคพืช *C. capsici* จำนวน 18 สายพันธุ์ ยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 17 สายพันธุ์ และยับยั้งเชื้อรา *R. solani* จำนวน 39 สายพันธุ์ ร้อยละการยับยั้งการเจริญที่สูงที่สุดมีค่าเกินร้อยละ 40 ยกเว้นแบคทีเรียปฏิปักษ์จากอาหาร Pseudomonas Base Agar ที่ให้ค่าสูงสุดเพียงร้อยละ 38.10 เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *F. oxysporum* เมื่อนำสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราสูงที่สุดที่แยกได้จากอาหารแต่ละชนิดมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นแล้วพบว่าสายพันธุ์ B355 และ B397 มีลักษณะสอดคล้องกับสกุล *Bacillus* แต่เชื้อ B102 มีลักษณะที่ไม่สอดคล้องกับสกุลดังกล่าว และสายพันธุ์ P3112, P3116 และ P3119 มีลักษณะสอดคล้องกับสกุล *Pseudomonas*

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดแยกได้มาศึกษาผลของชนิดอาหารต่อการสร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้

6.1.1 การนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง "กิจกรรมปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืชของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และ *Pseudomonas* spp. ที่แยกจากดิน" ในการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 6 ณ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

6.1.2 บทความวิจัยเรื่อง "กิจกรรมปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืชของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และ *Pseudomonas* spp. ที่แยกจากดิน" ในรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 6 ณ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BS-P18

กิจกรรมปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืชของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และ *Pseudomonas* spp. ที่แยกจากดิน
Antagonism against phytopathogenic fungi of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. isolated from soil

เพ็ญประภา สุขเจริญ[1] ภัทราพร ศรีประสงค์[1] สุชานันท์ ทองมีศรี[1] ปิลันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล[2] และโชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา[1*]
Penprapa Sukjaroen[1], Pattaraporn Sriprasong[2], Suchanun Thongmesri, Pilunthana Thapanapongworakul[2] and Chokchai Kittiwongwattana[1*]
[1]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*
[2] *ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*
**ผู้ประสานงานหลัก อีเมล: chokchai.ki@kmitl.ac.th*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยชิ้นนี้มีคือการคัดแยกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคในพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* แบคทีเรียจำนวน 227 สายพันธุ์คัดแยกได้จากดินที่โคนต้นพืช 8 ชนิดในกรุงเทพมหานครฯ นครปฐม และสุพรรณบุรี โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Hicrome Bacillus Agar และ Pseudomonas Agar Base ในแบคทีเรียจำนวนนี้พบว่า มีแบคทีเรีย 18, 17 และ 39 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici F. oxysporum* และ *R. solani* ได้ ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Dual Test การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์พบว่า ร้อยละการยับยั้งการเจริญสูงที่สุดมีค่าสูงกว่าร้อยละ 40 ในการทดสอบกับเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ยกเว้นการทดสอบระหว่างแบคทีเรียจากอาหาร Pseudomonas Base Agar กับเชื้อรา *F. oxysporum* ที่มีค่าสูงสุดอยู่ที่ร้อยละ 38.10 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสูงที่สุดจำนวน 6 สายพันธุ์พบว่า แบคทีเรียจากอาหาร HiCrome Bacillus Agar ได้แก่ สายพันธุ์ B355 และ B397 มีลักษณะเบื้องต้นสอดคล้องกับลักษณะของสกุล *Bacillus* และสายพันธุ์ B102 ไม่สอดคล้อง ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียจากอาหาร Pseudomonas Base Agar ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ P3112, P3115 และ P3119 มีลักษณะสอดคล้องกับสกุล *Pseudomonas*
คำสำคัญ: *Pseudomonas, Bacillus, แบคทีเรียปฏิปักษ์, เชื้อราก่อโรคพืช*

Abstract

The main objective of this study was to isolate bacteria of genera *Bacillus* and *Pseudomonas* that harbored the antagonistic activity against three phytopathogenic fungi including *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. The total number of 227 bacterial strains was isolated from soil used for growing eight different plant species in Bangkok, Nakonpathom and Supanburi. HiCrome Bacillus Agar and Pseudomonas Base Agar were used for the isolation. The dual-culture test revealed that there were 18, 17 and 39 bacterial strains with the antagonistic activity against *C. capsici*, *F. oxysporum* and *R. solani*, respectively. The inhibition efficiency was determined. The highest inhibition percentages of antagonistic bacteria were over 40% when tested with the three fungi. The only exception was 38.10% that was found between antagonistic bacteria from Pseudomonas Base Agar and *F. oxysporum*. Preliminary morphological and biochemical characteristics of six bacterial strains with the highest inhibition percentage were determined. Strains B355 and B397 from HiCrome Bacillus Agar showed morphological and biochemical characteristics that were consistent with those of the genus *Bacillus* while strain B102 from the same medium did not. In contrast, all three strains from Pseudomonas Base Agar including P3112, P3115 and P3119 displayed the characteristics of the genus *Pseudomonas*.
Keywords: *Bacillus, Pseudomonas, Antagonistic bacteria, Phytopathogenic fungi*

บทนำ

แบคทีเรียจัดเป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่เป็นปัจจัยทางชีวภาพและมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชเป็นอย่างมาก ในธรรมชาติสามารถพบกลุ่มแบคทีเรียที่มีกิจกรรมส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plan-growth-promoting activities) ผ่านทางกลไกที่แตกต่างกัน กลไกทางตรงที่แบคทีเรียใช้ส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น การกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยใช้สารประกอบฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน, การลดปริมาณฮอร์โมนเอธิลีนในพืชโดยการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นของฮอร์โมนดังกล่าว, การเพิ่มปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบไนโตรเจนให้แก่พืชโดยการตรึงแกสไนโตรเจน และการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ เป็นต้น (1) กลไกอีกรูปแบบหนึ่งที่แบคทีเรียใช้และส่งเสริมการเจริญของพืชคือกลไกทางอ้อม รูปแบบที่สำคัญของกลไกนี้คือแบคทีเรียมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria) และสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชทั้งในกลุ่มที่เป็นแบคทีเรีย (phytopathogenic bacteria) และฟังไจ (phytopathogenic fungi) ได้ รูปแบบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชโดยแบคทีเรียมีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 3 รูปแบบได้แก่ การสร้างสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ที่มีผลทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โรคพืช (2,3) การแก่งแย่งแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคพืชเพื่อให้ได้รับสารอาหาร และ การกระตุ้นให้กลไกการป้องกันตัวเองของพืชทำงานเพื่อยับยั้งและลดความรุนแรงของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช (1)

แบคทีเรียปฏิปักษ์กำลังได้รับความสนใจศึกษาเป็นอย่างมาก และมีแบคทีเรียจำนวนหลายสายพันธุ์ที่มีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol agent) เพื่อป้องกันและควบคุมการเกิดโรคในพืช การจัดการควบคุมโรคพืชในลักษณะนี้มีข้อได้เปรียบบางประการเมื่อเทียบกับวิธีการใช้สารเคมีและวิธีเขตกรรม เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสารเคมีที่อาจก่อให้เกิดอันตรายกับเกษตรกรผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม และการใช้งานทำได้สะดวก ไม่ยุ่งยาก ต่างจากการใช้วิธีทางเขตกรรม ตัวอย่างของการควบคุมโรคพืชโดยการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น การควบคุมโรค fire blight ในแพร์และแอปเปิลที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Erwinia amylovora* ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* และ *Pantoea agglomerans* (4) สอดคล้องกับงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งที่ใช้แบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Klebsiella*, *Microbacterium* และ *Paenibacillus* เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. oxysporum* และ *R. solani* (5) อย่างไรก็ดี การค้นหาสายพันธุ์แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ๆ ยังคงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเพิ่มความหลากหลายของสายพันธุ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์และป้องกันการเกิดสายพันธุ์ต้านทานของจุลินทรีย์โรคพืช งานวิจัยชิ้นนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาคัดแยกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* จากดินเพื่อนำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *C. capsici* ที่ก่อโรค anthracnose, *F. oxysporum* ที่ก่อโรคเหี่ยว และ *R. solani* ที่ก่อโรคโคนเน่าคอดิน (6-8)

วิธีดำเนินการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียจากดินรอบรากพืช

ตัวอย่างดินเก็บรวบรวมโดยสุ่มเก็บตัวอย่างดิน 5 บริเวณที่โคนต้นพืช และเก็บตัวอย่างดินที่ความลึกตั้งแต่ 0 ถึง 10 เซนติเมตร ดินตัวอย่างใช้ปลูกต้นพืชที่แตกต่างกัน 8 ชนิด ได้แก่ ต้นทองหลาง ต้นไผ่ และต้นสะเดาในเขตพื้นที่กรุงเทพมหานครฯ ต้นมะนาว ต้นมะม่วง และต้นอ้อย ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม และต้นกล้วย ต้นน้อยหน่า และต้นมะม่วง จากพื้นที่เพาะปลูกจังหวัดสุพรรณบุรี เจือจางตัวอย่างดินปริมาณ 1 กรัมในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตรแล้วนำไปเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเจือจางสารละลายดินเป็นลำดับ (serial dilution) ให้ได้ระดับความเจือจางระหว่าง 10^{-6} ถึง 10^{-9} นำสารแขวนลอยเชื้อมาเพาะด้วยวิธี spread plate บนอาหารที่ใช้มี 2 ชนิดได้แก่ HiCrome Bacillus Agar (Himedia, India) และ Pseudomonas Base Agar (Oxoid, USA) ที่เติมสาร pseudomonas c-f-c supplement บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญเติบโตมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak บนอาหาร Nutrient Agar (Himedia, India)

การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืชด้วยวิธี dual culture

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. capsici*, *F. oxysporum* และ *R. solani* บนอาหาร Potato Dextrose Agar (Himedia, India) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร เจาะรูอาหารที่มีเส้นใยเชื้อราปกคลุมอยู่ แล้วนำมาวางไว้ตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar จานใหม่ เขี่ยเชื้อแบคทีเรียอายุประมาณ 24-48 ชั่วโมงมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานดังกล่าว ให้มีระยะห่างจากเชื้อราประมาณ 2 เซนติเมตร ทดสอบเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนานเป็นระยะเวลา 6 วัน ตรวจสอบผลการยับยั้งจากการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เปรียบเทียบกับจานควบคุมที่เพาะเชื้อราเพียงอย่างเดียว

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์

เตรียมเชื้อราบนอาหาร Potato Dextrose Agar ตามวิธีการข้างต้น ในจานทดลอง เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาเพาะให้ห่างจากเส้นใยของเชื้อรา 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 6 วัน วัดระยะรัศมีของเชื้อราก่อโรคเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เพาะเส้นใยเชื้อราอย่างเดียว คำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังนี้

$$\text{ร้อยละการยับยั้งการเจริญ} = 100 - [(R_1/R_2) \times 100]$$

โดยที่ R_1 คือรัศมี (มิลลิเมตร) ของโคโลนีของเชื้อราในจานทดลอง และ R_2 คือรัศมี (มิลลิเมตร) ของโคโลนีของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงในจานควบคุม การทดลองนี้ทำ 3 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยของร้อยละการยับยั้งการเจริญและวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) แบบ one-way และเปรียบเทียบจัดกลุ่มด้วยวิธี Tukey

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์

ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี Gram's Staining จากนั้นตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า แบคทีเรียที่ย้อมติดสี crystal violet จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียที่ย้อมติดสี safranin จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และย้อมสปอร์ของแบคทีเรียโดยใช้สี malachite green ร่วมกับสี safranin

การศึกษาการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียปฏิปักษ์

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อลงเชื้อในอาหาร semisolid medium ด้วยวิธีการแทง (stab inoculation) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง แบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้จะแสดงรอยของเชื้อที่แผ่ออกมาจากบริเวณที่เข็มแทงลงในอาหาร

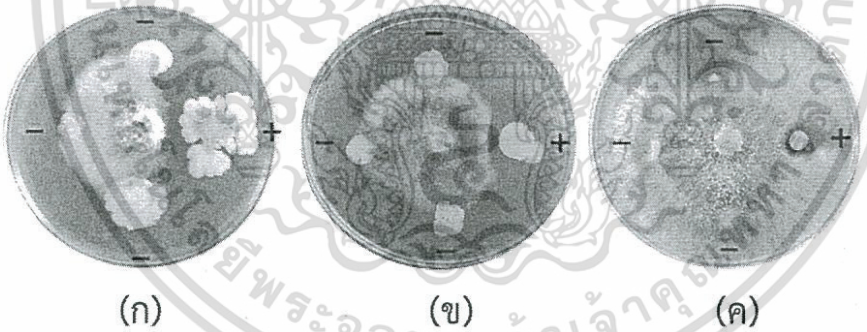
การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียปฏิปักษ์

ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลสของแบคทีเรียโดยการเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงบนกระจกสไลด์ หยดสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้นร้อยละ 3 ทับลงบนแบคทีเรีย แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์คะตาเลสจะเกิดฟองขึ้นทันทีที่โดนสารละลาย แบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์นี้จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดสโดยการหยดสารละลาย Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride ความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงบนกระดาษกรอง แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ดังกล่าวจะเปลี่ยนสีกระดาษกรองเป็นสีม่วง ในขณะที่แบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การคัดแยกแบคทีเรียจากดินเพาะปลูกพืชทั้ง 8 ชนิดพบว่าคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 227 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อจากเขตกรุงเทพมหานคร จังหวัดนครปฐม และจังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 25, 69 และ 133 สายพันธุ์ ตามลำดับ แบ่งเป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากอาหาร HiCrome Bacillus Agar จำนวน 97 สายพันธุ์ และจากอาหาร Pseudomonas Base Agar จำนวน 130 สายพันธุ์ การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืชด้วยวิธี dual culture กับแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทุกสายพันธุ์แสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหาร HiCrome Bacillus Agar จำนวน 9, 10 และ 26 สายพันธุ์ และมีแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหาร Pseudomonas Base Agar จำนวน 9, 7 และ 13 สายพันธุ์ที่แสดงบริเวณยับยั้งเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar ร่วมกับเชื้อรา *C. capsici F. oxysporum* และ *R. solani* ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

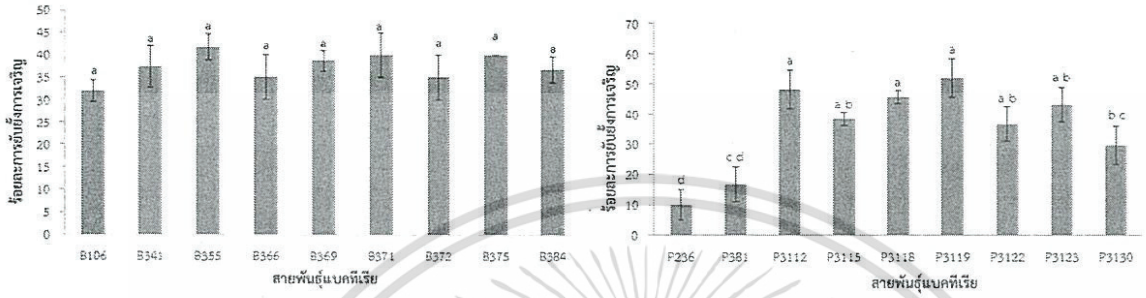


ภาพที่ 1 ผลการทดสอบเบื้องต้นในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา รา *C. capsici* (ก), *F. oxysporum* (ข) และ *R. solani* (ค) โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เครื่องหมาย + คือมีการยับยั้ง เครื่องหมาย – คือไม่มีการยับยั้ง

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่า ร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร HiCrome Bacillus Agar มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 31.94 ถึงร้อยละ 41.67 โดยแบคทีเรียที่ให้ค่าร้อยละการยับยั้งดีที่สุดคือสายพันธุ์ B355 (ร้อยละ 41.67±2.89) (ภาพที่ 2ก) ส่วนแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร Pseudomonas Base Agar มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 10.00 ถึงร้อยละ 51.85 โดยแบคทีเรียที่ให้ค่าร้อยละการยับยั้งสูงที่สุด ได้แก่ P3119 (ร้อยละ 51.85±2.14) (ภาพที่ 2ข) ผลการประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* (ภาพที่ 3) พบว่า แบคทีเรียจากอาหาร HiCrome Bacillus Agar และ Pseudomonas Base Agar แสดงค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อยู่ระหว่างร้อยละ 5.88 ถึงร้อยละ 46.47 และ ร้อยละ 7.94 ถึงร้อยละ 38.10 ตามลำดับ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดจากอาหารแต่ละชนิดคือสายพันธุ์ B397 (ร้อยละ 46.47±6.11) และ P3116 (ร้อยละ 38.10±4.76) ตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* (ภาพที่ 4) พบว่า แบคทีเรียจากอาหาร HiCrome Bacillus Agar มีประสิทธิภาพอยู่ระหว่างร้อยละ 14.29 ถึงร้อยละ 48.15 และสายพันธุ์ที่ยับยั้งได้ดีที่สุดคือ B102 (ร้อยละ 48.15±3.45) ในขณะที่แบคทีเรียจากอาหาร Pseudomonas Base Agar มีร้อยละของการยับยั้งอยู่ระหว่างร้อยละ 28.40 ถึงร้อยละ 48.15 โดยสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดคือสายพันธุ์ P3112 (ร้อยละ 48.15±0.17)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นกับสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสูงที่สุดจากอาหารแต่ละชนิดรวมทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ B355 และ B397 ติดสีแกรมบวก เซลล์เป็นรูปท่อน สร้างสปอร์ และมีกิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลส ลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* (9) ดังนั้นแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะอยู่ในสกุลดังกล่าว ในขณะที่สายพันธุ์ B102 ติดสีแกรมลบ เซลล์เป็นรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ และตรวจไม่พบเอนไซม์คะตาเลส แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์นี้อาจไม่อยู่ในสกุล *Bacillus* เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์ P3112 P3116 และ P3119 มาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นแล้วพบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ย้อมติดสีแบบแกรมลบ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน เคลื่อนที่ได้ สร้างเอนไซม์คะตาเลส และสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส ตรงกับลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* (10)

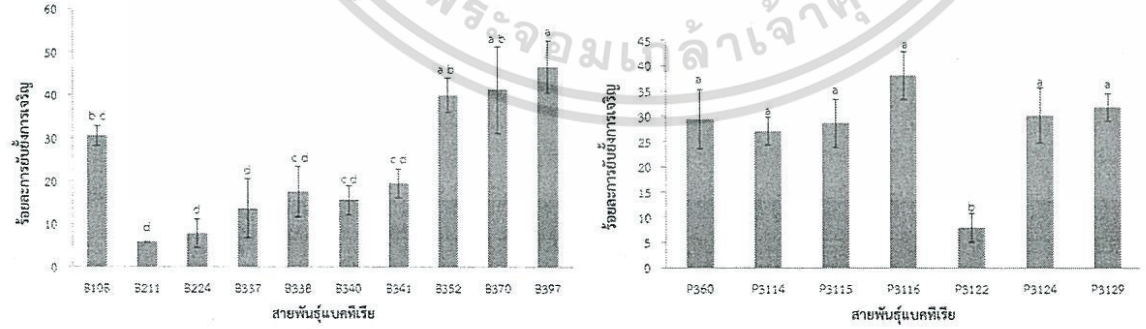


(ก) (ข)

ภาพที่ 2 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* โดยแบคทีเรียจากอาหาร HiCrome Bacillus Agar (ก) และอาหาร Pseudomonas Base Agar (ข) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการทดลองในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่แสดงให้เห็นว่าสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* ประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืช ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *Bacillus atrophaeus* และ *Bacillus amyloliquefaciens* ที่แยกได้จากดินและสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* (11) การยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* และ *R. solani* โดยแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ Q-426 (12) การยับยั้งเชื้อรา *Magnaporthe grisea*, *R. solani*. *C. capsici*, *F. oxysporum* โดยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PUPa3 (13)

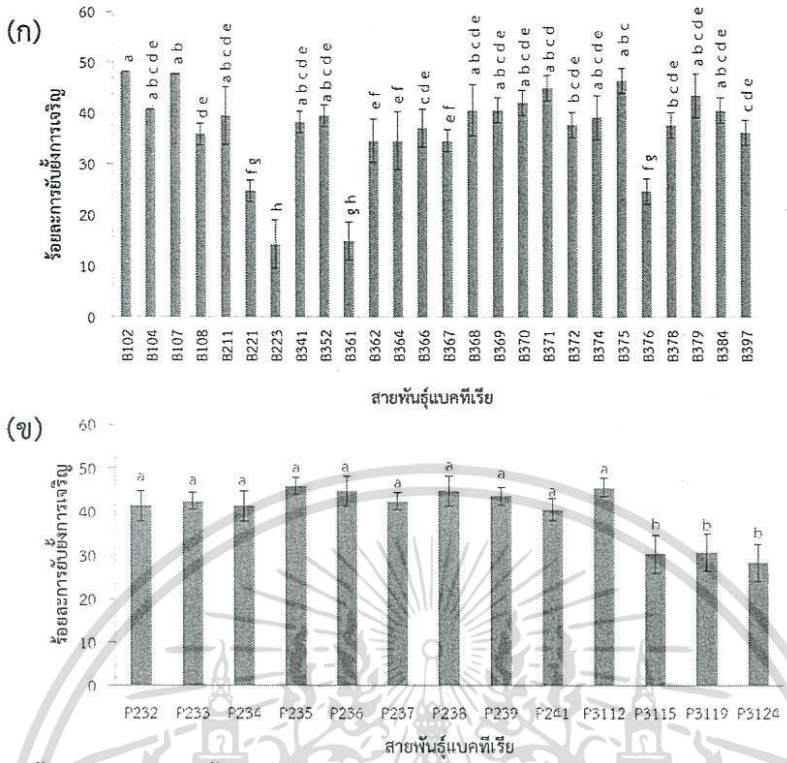
กลไกการยับยั้งเชื้อราก่อโรคของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สำคัญและมีความน่าสนใจคือการสร้างสารปฏิชีวนะ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ค่อนข้างหลากหลาย ตัวอย่างเช่น สารปฏิชีวนะ fengycin, bacilysin, difficidin ที่สร้างโดยแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* (2, 14-16) และสารปฏิชีวนะ phenazine, amphisin, 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) ที่พบในแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* เป็นต้น (17-18) อย่างไรก็ดีการจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสกุลในงานวิจัยนี้เป็นเพียงการจัดจำแนกในระดับเบื้องต้นเท่านั้น เพื่อให้ได้ข้อมูลการจัดจำแนกที่ถูกต้องจำเป็นต้องนำแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์มาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนที่นิยมใช้ในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย (19) เพื่อให้สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสกุลได้อย่างมีประสิทธิภาพขึ้น



(ก) (ข)

ภาพที่ 3 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* โดยแบคทีเรียจากอาหาร HiCrome Bacillus Agar (ก) และอาหาร Pseudomonas Base Agar (ข) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 ร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* โดยแบคทีเรียจากอาหาร HiCrome Bacillus Agar (ก) และอาหาร Pseudomonas Base Agar (ข) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

สรุป

งานวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรียที่อยู่ในดินที่ใช้ปลูกพืชชนิดต่างๆ ได้ทั้งสิ้น 227 สายพันธุ์ด้วยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ HiCrome Bacillus Agar และ Pseudomonas Base Agar ในจำนวนนี้มีแบคทีเรียที่ยับยั้งรา ก่อโรคพืช *C. capsici* จำนวน 18 สายพันธุ์ ยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 17 สายพันธุ์ และยับยั้งเชื้อรา *R. solani* จำนวน 39 สายพันธุ์ ร้อยละการยับยั้งการเจริญที่สูงที่สุดมีค่าเกินร้อยละ 40 ยกเว้นแบคทีเรียปฏิปักษ์จากอาหาร Pseudomonas Base Agar ที่ให้ค่าสูงสุดเพียงร้อยละ 38.10 เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *F. oxysporum* เมื่อนำสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราสูงที่สุดที่แยกได้จากอาหารแต่ละชนิดมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นแล้วพบว่าสายพันธุ์ B355 และ B397 มีลักษณะสอดคล้องกับสกุล *Bacillus* แต่เชื้อ B102 มีลักษณะที่ไม่สอดคล้องกับสกุลดังกล่าว และสายพันธุ์ P3112, P3116 และ P3119 มีลักษณะสอดคล้องกับสกุล *Pseudomonas*

เอกสารอ้างอิง

1. Glick BR. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. Scientifica. 2012;doi:10.6064/2012/963401.
2. Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, Dufour SE, Veening JW, Arrebola E, Cazorla FM, Kuipers OP, Paquot M, Pérez-Garcia A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. Mol Plant-Mic Interact. 2007;20:430-40.
3. Singh PP, Shin YC, Park CS, Chung YR. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathol. 1999;89:92-9.
4. Pusey PL. Biological control agents for fire blight of apple compared under conditions limiting natural dispersal. Plant Dis. 2002;86:639-44.
5. Ji SH, Gururani MA, Chun SC. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbio Res. 2014;169: 83-98.
6. Pakdeevaraporn P, Wasee S, Taylor PWJ, Mongkolporn O. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. Plant Breed. 2005;124:206-8.
7. Fuchs JG, Moënne-Loccoz Y, Défago G. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to fusarium wilt in tomato. Plant Dis. 1997;81:492-6.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. Howell CR, Stipanovic RD. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedling with *Pseudomonas fluorescens* and with and antibiotic produced by the bacterium. Phytopathol. 1979;69:480-2.
9. Logan NL, Vos PD. *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. New Jersey: John Wiley & Sons. 2015. pp. 1-163.
10. Palleroni NJ. *Pseudomonas*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. New Jersey: John Wiley & Sons. 2015. pp. 1-105.
11. Han J, Shim H, Shin J, Kim KS. Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. 2009;31:165-75.
12. Zhao P, Quan C, Wang Y, Wang J, Fan S. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. J Basic Microbiol. 2014;54:448-56.
13. Kumar RS, Ayyadurai N, Pandiaraja P, Reddy AV, Venkateswarlu Y, Prakash O, et al. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa*PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. J Appl Microbiol. 2005;98:145-54.
14. Koumoutsi A, Chen X, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Fanke P, Vater J, Borriss R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. J Bacteriol. 2004;186:1084-96.
15. Chen XH, Vater J, Piel J, Franke P, Scholz R, Schneider K, Koumoutsi A, Hitzeroth G, Grammel N, Strittmatter AW, Gottschalk G, Süssmuth RD, Borriss R. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. J Bacteriol. 2006;188:4024-36.
16. Wu L, Wu H, Chen L, Yu X, Borriss R, Gao X. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. Sci Rep. 2015;doi: 10.1038/srep12975.
17. Dowling D, O'Gara F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. Trends Biotechnol. 1994;12:133-141.
18. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action and future prospect. App Envi Microbiol. 2005;71:4951-9.
19. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. J Microbiol. 2007;45:2761-4.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5th edition. Elsevier Academic Press. London. UK.

Chen, X.H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsi, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A.W., Gottschalk, G., Süssmuth, R.D. and Borriss, R. 2006. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. J Bacteriol. 188:4024-36.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Barka, E.A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action and future prospect. App Envi Microbiol. 71:4951-9.

Dowling, D. and O'Gara, F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. Trends Biotechnol. 12:133-141.

Foley, R.C., Gleason, C.A., Anderson, J.P., Hamann, T. and Singh, K.B. 2013 Genetic and genomic analysis of *Rhizoctonia solani* interactions with Arabidopsis; Evidence of resistance mediated through NADPH oxidases. doi: 10.1371/journal.pone.0056814.

Fuchs, J.G., Moënne-Loccoz, Y. and Défago, G. 1997. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to fusarium wilt in tomato. Plant Dis. 81:492-6.

Garg, R., Kumar, S., Kumar, R. Loganathan, M., Saha, S., Kumar, S., Rai, A.B. and Roy, B.K. 2012. Novel source of resistance and differential reactions on chilli fruit infected by *Colletotrichum capsici*. Australian Plant Pathology. 42: 227-233.

Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. Scientifica. doi:10.6064/2012/963401.

Han, J., Shim, H., Shin, J. and Kim, K.S. 2009. Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. 31:165-75.

Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedling with *Pseudomonas fluorescens* and with and antibiotic produced by the bacterium. Phytopathol. 69:480-2.

Janda, J.M. and Abbott, S.L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. J Microbiol. 45:2761-4.

Ji, S.H., Gururani, M.A. and Chun, S.C. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbio Res. 169: 83-98.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kavitha, S. Senthilkumar, S., Gnanamanickam, S., Inayathullah, M. and Jayakumar, R. 2005. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. Process Biochemistry. 40:3236-3243.

Koumoutsi, A., Chen, X., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Fanke, P., Vater, J. and Borriss, R. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. J Bacteriol.186:1084-96.

Kumar, R.M., Kaur, G., Kumar, A., Bala, M., Singh, N.K., Kaur, N., Kumar, N. and Mayilraj, S. 2015 Taxonomic description and genome sequence of *Bacillus campisalis* sp. nov., a member of the genus *Bacillus* isolated from a solar saltern. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 65: 3235-3240.

Kumar, R.S., Ayyadurai, N., Pandiaraja, P., Reddy, A.V., Venkateswarlu, Y., Prakash, O., et al. 2005. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa*PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. J Appl Microbiol. 98:145-54.

Logan, N. A. and Vos, P. D. 2015. *Bacillus* . Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 1–163.

Pakdeevaraporn, P., Wasee, S., Taylor, P.W.J. and Mongkolporn, O. 2005. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. Plant Breed. 124:206-8.

Pal, K.K. and Gardener, B.M. 2006. Biological control of plant pathogens. In The Plant Health Instructor. doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

Palleroni, N.J. 2015 *Pseudomonas*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. New Jersey: John Wiley & Sons. pp. 1-105.

Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S. and Crecchio, C. 2015. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. Biology and Fertility of Soil. 51: 403-415.

Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. 2002. Microbiology. 5th edition. McGraw-Hill Higher Education. New York. USA.

Pusey, P.L. 2002. Biological control agents for fire blight of apple compared under conditions limiting natural dispersal. Plant Disease 86, 639-644.

Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M. and Pérez-García, A. 2007. The iturin and fengycin families

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. Mol Plant-Mic Interact. 2007;20:430-40.

Safni, I., Cleenwerck, I., Vos, P.D., Fegan, M., Sly, L. and Kappler, U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstoniapseudosolanacearum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 64: 3087-3103.

Sakar, S.F. and Guttman, D.S. 2004. Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas syringae*, a Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen. Applied and Environmental Microbiology. 70: 1999-2012.

Saxena, A., Raghuwanshi, R. and Singh, H.B. 2016. Elevation of Defense Network in Chilli Against *Colletotrichum capsici* by Phyllospheric *Trichoderma* Strain. Journal of Plant Growth Regulation. 35: 377-389.

Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S. and Chung, Y.R. 1999. Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathol. 89:92-9.

Than, P.P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P.J. and Hyde, K.D. 2008. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. Journal of Zhejiang University SCIENCE B. 9: 764-778.

Velusamy, P., Immanuel, J. E., Gnanamanickam, S. S. and Thomashow, L. (2006). Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. Canadian Journal of Microbiology 52, 56-65.

von Neubeck, M., Huptas, C., Glück, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S. and Wenning, M. 2015. *Pseudomonas helleri* sp. nov. and *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov., isolated from raw cow's milk. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 66: 1163-1173.

Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R. and Gao, X. 2015. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. Sci Rep. doi: 10.1038/srep12975.

Zhao, P., Quan, C., Wang, Y., Wang, J. and Fan, S. 2014. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. J Basic Microbiol. 2014;54:448-56.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย

รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
1. งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติ	
1.1 จำนวนเงินที่ได้รับงวดที่ 1	42,500
1.2 จำนวนเงินที่ได้รับงวดที่ 2	7,500
1.3 ดอกเบี้ยรายรับ	70.99
รวม	**50,070.99**
2. ค่าใช้จ่าย	
2.1 ค่าใช้สอย	8,689.62
2.1 ค่าวัสดุ	41382.57
รวม	**50,072.19**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Chokchai Kittiwongwattana
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผศ.ดร.
3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง
ถ.ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
โทรศัพท์ 0-2329-8400 ต่อ 3600
โทรสาร 0-329-8427
E-mail: kkchokch@kmitl.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	ชีววิทยา	ม. เกษตรศาสตร์	2546
วท.ม.	พันธุศาสตร์	ม. เกษตรศาสตร์	2548
Ph.D.	Plant Biology	Rutgers University, USA	2553

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
พันธุศาสตร์ของพืชและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางชีววิทยาของพืชทั้งในเชิงพื้นฐานและเชิงประยุกต์ เช่น การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การทำพันธุวิศวกรรม เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในการถ่ายฝากยีน

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

3.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

3.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

-การคัดแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในพืชวงศ์ Lemnaceae (1 กุมภาพันธ์ 2555 - 31 มกราคม 2557; กองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

-การศึกษาการผลิตเอธานอลจาก *Spirodela polyrrhiza* (1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556; ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556)

3.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kittiwongwattana C., Lutz K., Clark M., Maliga, P. (2007) Plastid marker gene excision by the phi C31 phage sitespecific recombinase. Plant Molecular Biology. 64: 137-143

สถานภาพ: ผู้ร่วมวิจัยระหว่างการศึกษาระดับปริญญาเอก

Kittiwongwattana C. and Vuttipongchaikij S. (2013). Effects of nutrient media on vegetative growth of *Lemna minor* and *Landoltia punctata*. Maejo International Journal of Science and Technology. 7: 60-69. (impact factor = 0.456)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2013). *Rhizobium paknamense* sp. nov., isolated from lesser duckweed (*Lemna aequinoctialis*). International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology. (impact factor = 2.112)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2013). Biodiversity assessment of endophytic bacteria isolated from duckweed (*Lemna aequinoctialis*). Proceedings of the 3rd International Conference on Engineering, Applied Sciences, and Technology (ICEAST). (Accepted)

Kittiwongwattana C. and Thawai C. (2014). *Rhizobium lemae* sp. nov., a bacterial endophyte of *Lemna aequinoctialis*. International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology. (impact factor = 2.112)

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

3.4 งานวิจัย:

-การคัดแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย endophytes ที่พบในพืชวงศ์ Lemnaceae

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ก.พ. 2555 - 31 ม.ค. 2557

-การศึกษาการผลิตเอธานอลจาก *Spirodela polyrrhiza*

สถานภาพ: หัวหน้าโครงการวิจัย

แหล่งทุน: ทุนวิจัย วช. ประจำปีงบประมาณ 2556

ระยะเวลาโครงการวิจัย: 1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้