แบบการจัดทำบทความ(manuscript)

ชุดโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประจำปี พ.ศ. 2554

ชื่อโครงการ(ภาษาไทย): การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย และรา ในดินบริเวณรอบรากพืชจากพื้นที่เขื่อนสิรินธร จ.อุบลราชธานี

(ภาษาอังกฤษ): Study of diversity of bacteria and fungi in rhizosphere sample from Sirinthorn dam area at Ubonrachatani province

นันทวัน ฤทธิ์เดช* และวรุฒ ปัญญาวิภาส

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

*corresponding author: nunrid@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การควบคุมเชื้อก่อโรคพืชทางชีวภาพ เป็นทางเลือกที่สำคัญที่จะใช้แทนยาปราบศัตรูพืชในการเกษตร โดยอาศัยกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคพืชจากดินบริเวณรอบรากพืช งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกจุลินทรีย์รอบรากพืชด้วยวิธี Spread plate technique ซึ่งจะได้ทั้งแบคทีเรีย, เชื้อราและแอคติโนมัยสีท จากนั้นจึงนำจุลินทรีย์ที่ได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช 3 ชนิดได้แก่ *Collectotrichum* sp., *Corynespora* sp. และ *Sclerotium* sp. ด้วยวี Dual culture method พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 3 ไอโซเลตได้แก่ ไอโซเลต A1R1B11, A1R3B24 และไอโซเลต A2R1B8 ที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชได้หมดทั้ง 3 ชนิด และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *Collectotrichum* sp. ที่ 30.77%, 31.42% และ 40.00% ตามลำดับ และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *Corynespora* sp. ที่ 33.33%, 35.71% และ 46.66% ตามลำดับ และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *Sclerotium* sp. ที่ 28.12%, 34.21% และ 56.25% ตามลำดับ จากนั้นได้นำมาศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต A1R1B11 มีลักษณะโคโลนีขนาดใหญ่ไม่เยิ้ม สีขาว-ชมพูอ่อน ผิวหน้าแบนเรียบ มันวาว ขอบโคโลนีไม่เรียบ ลักษณะเซลล์รูปท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก เรียงตัวแบบกกระจายหรือเรียงต่อกัน 2-4 เซลล์ ส่วนไอโซเลต A1R3B24 มีลักษณะโคโลนีขนาดใหญ่ไม่เยิ้ม สีขาวขุ่น ขอบโคโลนีไม่เรียบ ผิวหน้ามีลักษณะมันวาว ไม่โค้งนูน เซลล์รูปท่อน ติดสีแกรมบวก เรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ และไอโซเลต A2R1B8 มีลักษณะโคโลนีสีขาวครีม มันวาว ไม่เยิ้ม ขอบโคโลนีไม่เรียบ ผิวหน้าไม่โค้งนูน เซลล์รูปท่อน ติดสีแกรมบวก หัวท้ายเซลล์ เรียงตัวกระจัดกระจาย

Abstract

Biological control of plant pathogens is the only major alternative to the use of pesticides in agriculture. The aim of this study was focus on the antagonistic microorganism from rhizosphere against plant pathogenic fungi. Spread plate technique was used for screening of microorganisms from the rhizosphere samples. Bacteria, fungi and actinomycetes were found on the agar plate. Dual culture plate method was used for testing the ability of antagonistic microorganisms against plant pathogens such as *Collectotrichum* sp., *Corynespora* sp. and *Sclerotium* sp. Bacterial isolates A1R1B11, A1R3B24 and isolate A2R1B8. Showed ability to inhibit the growth of three kind of fungal plant pathogens and the percentage inhibition of *Collectotrichum* sp. were 22.85%, 31.42% and 40.00% respectively and the percent inhibition of the *Corynespora* sp. at 39.39%, 35.71% and 46.66% respectively while the percent inhibition of *Sclerotium* sp. were 42.50%, 34.21% and 56.25% respectively. The morphological characterization of three antagonistic bacteria was large colonies and all are Gram-positive rods bacteria.

Keywords: Rhizosphere, antagonistic microorganisms, *Collectotrichum* sp., *Corynespora* sp., *Sclerotium* sp.

บทนำ

ปัจจุบันมีความพยายามที่จะใช้การควบคุมโรคทางชีวภาพ(Biological control) เพื่อแก้ไขหรือลดปัญหาจากการใช้สารเคมีในการควบคุมโรค เช่น การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มาควบคุมโรค เช่น การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มาควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคต่างๆ เช่น การนำจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus* spp. และ *Pseudomonas* spp. และในกลุ่มของเชื้อรา ได้แก่ *Chaetomium* sp., *Glioladium* sp., *Penicillium* sp. และ *Trichoderma* spp. มาใช้ควบคุมโรคต่างๆในพืช เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันทั่วโลกได้ตระหนักถึงพิษภัยของสารเคมี ความสนใจในเรื่องเกษตรอินทรีย์จึงมีมากขึ้นการใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการต่อต้านเชื้อโรคจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง และมีชีวภัณฑ์ (Bioproduct) ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดต่างๆออกมาจำหน่ายด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จะทำการคัดแยกแบคทีเรีย และรา จากดินบริเวณรอบรากพืช ที่สามารถต่อต้านเชื้อก่อโรคพืช *Corynespora* sp. *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp

วัตถุประสงค์

1 เพื่อศึกษาคัดแยกแบคทีเรีย และราจากดินบริเวณรอบรากพืช ซึ่งเก็บตัวอย่างในพื้นที่เขื่อน

สิรินธร

2 เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย และราในดินบริเวณรอบรากพืชที่คัดแยกได้ซึ่งสามารถยับยั้ง เชื้อราก่อโรคพืช

3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรีย และราที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคพืช

วิธีการดำเนินงาน

1. การเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ในดินบริเวณรอบรากพืช

เก็บดินที่เกาะอยู่ตามบริเวณรอบรากพืช ซึ่งเป็นพืชที่ขึ้นในป่าเช่น ดอกไม้ป่าเป็นต้น โดยเก็บ 10-20 ตัวอย่างต่อพื้นที่ ที่เขื่อนสิรินธร จ. อุบลราชธานี

2. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย และรา ในดินบริเวณรอบรากพืช

<u>แบคทีเรีย</u>

1.นำดินตัวอย่างบริเวณรอบรากพืช 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ซึ่งมีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มล. จากนั้นเขย่าให้จุลินทรีย์หลุดออกมา ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน

2.ทำการเจือจางน้ำตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}

3. นำสารละลายดินเจือจางมา spread plate technique บน soil extract agar โดยทำความเจือจางละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °c เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมานับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

<u>รา</u>

1.นำดินตัวอย่างบริเวณรอบรากพืช 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ซึ่งมีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มล. จากนั้นเขย่าให้จุลินทรีย์หลุดออกมา ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน

2.ทำการเจือจางน้ำตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}

3.นำสารละลายดินเจือจางมา spread plate technique บน Potato dextrose agar pH 5.0 โดยทำความเจือจางละ 3 ซ้ำบ่มที่อุณหภูมิ 30 °c เป็นเวลา 5 วันนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

3. การทดสอบแบคทีเรีย และราในดินบริเวณรอบรากพืชที่คัดแยกได้ในการควบคุม และยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp., *Sclerotium* sp.

3.1 การทดสอบแบคทีเรียในการควบคุมและยับยั้งต่อเชื้อราก่อโรคพืช

1. นำ Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะเพื่อนำชิ้นวุ้นเชื้อรา *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp. ที่บ่มไว้ 7 วัน วางลงในจานอาหาร PDA ตรงจุดศูนย์กลาง บ่มเชื้อไว้ 48 ซม.

2. หลังจากนั้นวางแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไว้ 4 จุดในแนวจัตุรัสโดยห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 1.5 ซม. และในชุดควบคุมจะไม่มีการวางแบคทีเรีย

3. จากนั้นบ่มเชื้อไว้ 7 วัน จากนั้นจึงทำการวัดความยาวรัศมีเส้นใยของรา *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp. ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.2 การทดสอบเชื้อราในการควบคุมและยับยั้งต่อเชื้อราก่อโรคพืช

1. นำ Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะเพื่อนำชิ้นวุ้นเชื้อรา *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp. ที่บ่มไว้ 7 วัน วางลงในจานอาหาร PDA ตรงจุดศูนย์กลาง บ่มเชื้อไว้ 3 วัน

2. หลังจากนั้นจึงวางเชื้อราที่คัดแยกได้ไว้ 1 จุดในแนวเดียวกันกับเชื้อราก่อโรคพืช โดยวางห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 1.5 ซม.และในชุดควบคุมจะไม่มีการวางเชื้อราที่คัดแยกได้

3. จากนั้นบ่มเชื้อไว้ 7 วัน จากนั้นจึงทำการวัดความยาวรัศมีเส้นใยของรา *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp. ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

4. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ(Percent inhibition of radial growth-PIRG) คำนวณได้ ดังนี้

$$PIRG = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

เมื่อ R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานทดสอบ

หาค่าเฉลี่ยความยาวรัศมีของโคโลนี แล้วนำมาคำนวณหาค่า PIRG(Korsten et, al., 1995)

5. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียและราในดินบริเวณรอบรากพืช

1. แบคทีเรีย

1.1 ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยทำการศึกษา ขนาดของโคโลนี, รูปร่างของโคโลนี, ขอบหรือริมของโคโลนี, พื้นผิวหน้าของโคโลนี, ความสูงของโคโลนี, ความหนืด, ความขุ่น, การสร้างสีหรือรงควัตถุ

1.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยการย้อมสีแกรม มีวิธีการดังต่อไปนี้

1.2.1 การเตรียมสไลด์ มีวิธีการทำความสะอาดดังนี้ ให้ปราศจากไขมันทำได้ง่ายๆ โดยการใช้นิ้วจุ่มน้ำให้เปียก แตะผงซักฟอกและถูบนสไลด์ให้ทั่วทั้ง 2 ด้าน ทิ้งไว้ให้แห้งพอหมาดๆ แล้วใช้ผ้าแห้งสะอาดหรือกระดาษทิชชู่ เช็ดคราบผงซักฟอกโดยถูแรงๆให้คราบผงซักฟอกออกให้หมดจากสไลด์ทั้ง 2 ด้าน

1.2.2 เตรียมรอยสเมียร์โดยการทำเครื่องหมายวงกลมบริเวณที่จะสเมียร์ด้านหลังสไลด์ ในกรณีที่แบคทีเรียเจริญบนอาหารแข็ง ให้ใช้ loop เขี่ยเชื้อแตะน้ำ 1-2 loop ลงบนสไลด์ แล้วเขี่ยเชื้อเพียงเล็กน้อยแตะลงบนหยดน้ำแล้วทำการสเมียร์เชื้อให้ทั่วในหยดน้ำบริเวณตรงกลาง ทิ้งให้รอยสเมียร์แห้งเอง แล้วทำการ heat fix รอยสเมียร์โดยการลนผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง

1.2.3 หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที

เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วชะด้วยสารละลาบยไอโอดีน โดยหยดสารละลายไอโอดีนและทิ้งไว้นาน 1 นาที

1.2.4 เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95% หรือแอลกอฮอล์อาซีโตน จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำไหลผ่านเบาๆ

1.2.5 ซับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยการหยดสี safranin ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที

1.2.6 เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษทิชชู่ วางทิ้งไว้ให้แห้ง

1.2.7 นำสไลด์ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. รา

2.1 ลักษณะบางชนิดของราที่เจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยศึกษาผิวหน้าของโคโลนี (colony texture), ขอบของโคโลนี(colony margin), เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี(colony diameter(mm.)), สีของโคโลนี(colony color), สีที่เชื้อผลิตออกมาในอาหาร(soluble pigments in agar)

2.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทบยา โดยการศึกษาโครงสร้างของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้เทคนิค slide culture ซึ่งมีวิธีการทำดังต่อไปนี้

2.2.1 เทอาหาร PDA ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อให้ระดับอาหารสูงประมาณ 2 มม. ทิ้งไว้ให้เย็นและให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

2.2.2 ใช้มีดหรือมีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้วจึงกรีดอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างด้านละประมาณ 6 มม.

2.2.3 ใช้ปากคีบๆสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95% แล้วเผาไฟ 2 ครั้งแล้วจึงวางลงบนแท่งแก้วซึ่งงอเป็นข้อศอกในจานเพาะเชื้อ

2.2.4 ใช้มีดยกชิ้นวุ้น ที่ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส มาวางตรงกลางสไลด์ในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้

2.2.5 ใช้เข็มเขี่ยเขี่ยรามาแตะที่ส่วนหนาทั้ง 4 ด้านของชิ้นวุ้น

2.2.6 นำกระจกปิดสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95% และเผาไฟแล้ว ค่อยๆวางปิดชิ้นวุ้นซึ่งปลูกเชื้อแล้ว

2.2.7 เทน้ำกลั่นซึ่งมี 20% glycerol ลงไปให้ชุ่มกระดาษ หรืออาจจะใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออย่างเดียว

2.2.8 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเส้นใยของราเจริญจนถึงขอบของกระจกปิดสไลด์

2.2.9 ยกกระจกปิดสไลด์ขึ้น หยดแอลกอฮอล์ 95% ลงไปที่ตรงกลางของกระจกปิดสไลด์ด้านในซึ่งมีเส้นใยเชื้อราเจริญอยู่ เพื่อให้แอลกอฮอล์กระจายเข้าสู่เส้นใยรา

2.2.10 ก่อนที่แอลกอฮอล์จะแห้ง นำกระจกปิดสไลด์วางลงบนน้ำยา lactophenol cotton blue ซึ่งหยดตรงกลางสไลด์แผ่นใหม่

2.2.11 เขี่ยชิ้นวุ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสออกทิ้งไป และหยดแอลกอฮอล์ 95% ลงบนแผ่นสไลด์แล้วหยดน้ำยา lactophenol cotton blue ลงไปตรงกลางแผ่นสไลด์ก่อนแอลกอฮอล์แห้งสนิท ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์แผ่นใหม่

2.2.12 นำสไลด์ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ทั้งสองแผ่น มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

6. การจัดจำแนกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระดับเบื้องต้น

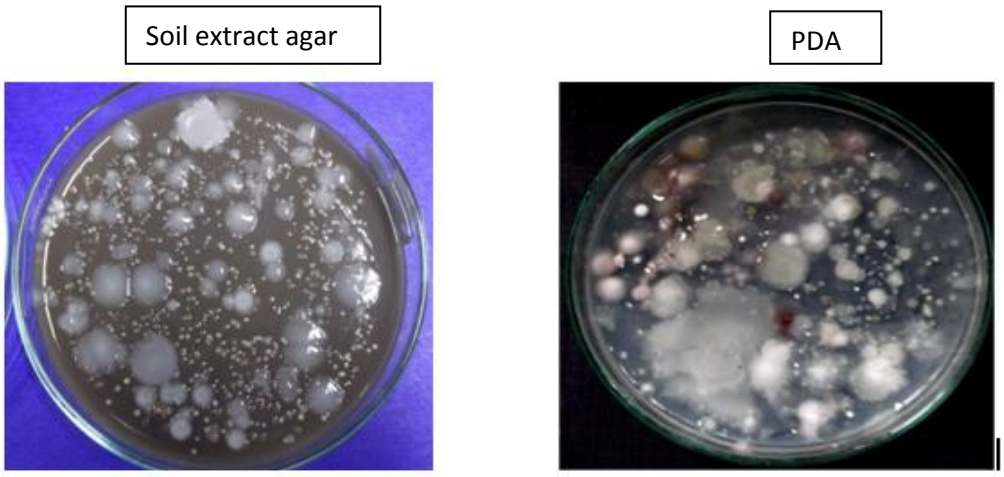
แบคทีเรีย: ศึกษาชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ระดับจีนัสโดยทำการทดลองและทดสอบคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบลักษณะกับในหนังสือ Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, volume 4 ปี 1989

รา: ศึกษาชนิดของราปฏิปักษ์ในระดับจีนัสโดยทำการทดลองและเปรียบเทียบกับในหนังสือ Compendium of soil fungi

ผลการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย และรา ในดินบริเวณรอบรากพืช

ตัวอย่างดินรอบรากพืชที่เก็บมาทั้งหมด เมื่อนำมาศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ Soil extract agar และ Potato dextrose agar ดังรูปที่ 1 ซึ่งสามารถคัดเลือกโคโลนีจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันจากตัวอย่างดินรอบรากพืชทั้ง 2 รอบ ได้โคโลนีที่แตกต่างกันทั้งหมด 228 ไอโซเลท โดยในรอบที่ 1 สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 128 ไอโซเลท ดังนี้ เส้นทางที่ 1 คัดแยกได้จุลินทรีย์ทั้งหมด 18 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรีย 15 ไอโซเลท และเชื้อรา 3 ไอโซเลท เส้นทางที่ 2 คัดแยกได้จุลินทรีย์ทั้งหมด 64 ไอโซเลท ประกอบด้วย แบคทีเรีย 27 ไอโซเลท เชื้อรา 8 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 29 ไอโซเลท เส้นทางที่ 3 คัดแยกได้ทั้งหมด 46 ไอโซเลท ประกอบด้วย แบคทีเรีย 27 ไอโซเลท เชื้อรา 14 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 45 ไอโซเลท และในรอบที่ 2 สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลท ดังนี้ เส้นทางที่ 1 คัดแยกได้ 70 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรีย 45 ไอโซเลท และเชื้อรา 25 ไอโซเลท เส้นทางที่ 2 ได้ 20 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรีย 9 ไอโซเลท และเชื้อรา 11 ไอโซเลท และเส้นทางที่ 3 คัดแยกได้ 10 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทและเชื้อรา 5 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 1 ความหลากหลายของโคโลนีจุลินทรีย์ที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด

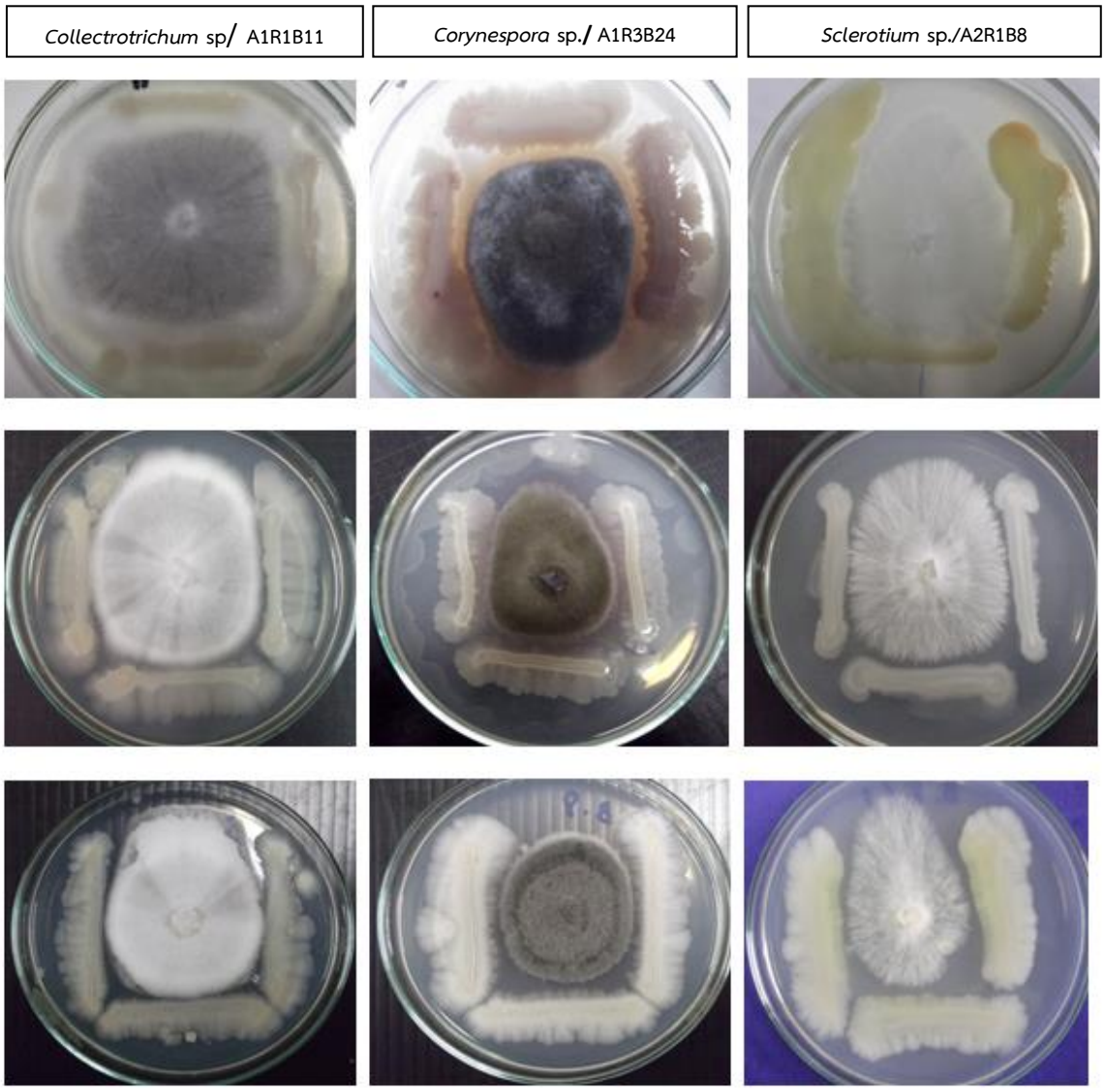
ตารางที่ 1 จำนวนไอโซเลทจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินรอบรากพืช

เส้นทางที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้					
	รอบที่ 1			รอบที่ 2		
	แบคทีเรีย	เชื้อรา	แอคติโนมัยสีท	แบคทีเรีย	เชื้อรา	แอคติโนมัยสีท
1	15	3	-	45	25	-
2	27	8	29	9	11	-
3	27	3	16	5	5	-
รวมทั้งหมด	69	14	45	59	41	-
	128			100		
	228 ไอโซเลท					

การทดสอบแบคทีเรีย และราในดินบริเวณรอบรากพืชที่คัดแยกได้ในการควบคุม และยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp.

ทุกไอโซเลทได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp. ในการบันทึกผลจะดูผลบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะเห็นการต่อต้านการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยเห็นเป็นโซนใสกั้นแบ่งระหว่างเชื้อสองชนิดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมจะเห็นโคโลนีของเชื้อราสามารถเจริญได้ปกติ ซึ่งผลที่ได้พบว่าจากไอโซเลทเชื้อทั้งหมด 228 ไอโซเลท มีเพียง 40 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Collectrotrichum* sp. ได้ ประกอบด้วยแบคทีเรีย 19 ไอโซเลท รา 16 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 5 ไอโซเลท ส่วนไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Corynespora* sp. ได้มีทั้งหมด 48 ไอโซเลทได้แก่ แบคทีเรีย 27 ไอโซเลท รา 18 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 3 ไอโซเลท และมีเพียง 27 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sclerotium* sp. ได้ประกอบด้วยแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 19 ไอโซเลท ซึ่งในจำนวนนี้สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามรถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปได้ทั้งสิ้น 32 ไอโซเลท ดังนี้ ในรอบที่ 1 จากเส้นทางที่ 1 มี 9 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้ ได้แก่ แบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท A1R1B2, A1R1B3, A1R1B6, A1R1B9, A1R1B10, A1R1B11, A1R1B12 และไอโซเลท A1R1B14 และเชื้อรา 1 ไอโซเลทคือไอโซเลท A1R1F1 ในเส้นทางที่ 2 มี 8 ไอโซเลท

ประกอบด้วยแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท A1R2B13, A1R2B15, A1R2B16 และไอโซเลท A1R2B19 เชื้อรา 4 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท A1R2F3, A1R2F4, A1R2F5 และไอโซเลท A1R2F7 ในเส้นทางที่ 3 มี 5 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคด้วยแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท A1R3B12, A1R3B15 และ A1R3B24 และ แอคติโนมัยสีท 2 ไอโซเลท คือไอโซเลท A1R3A4 และไอโซเลท A1R3A6 และในส่วนของรอบที่ 2 จากเส้นทางที่ 1 มีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ได้แก่แบคทีเรีย 1 ไอโซเลทคือไอโซเลท A2R1B8 เชื้อรา 6 ไอโซเลท A2R1F3, A2R1F8, A2R1F11, A2R1F18, A2R1F20 และไอโซเลท A2R1F23 ในส่วนของเส้นทางที่ 2 มีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 3 ไอโซเลทซึ่งพบเพียงเชื้อราเท่านั้น ได้แก่ไอโซเลท A2R2F3, A2R2F6 และไอโซเลท A2R2F7 ดังแสดงผลในตารางที่ 3 และ 4 ซึ่งในจำนวนนี้มีเพียงแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชได้ทั้ง 3 ชนิด คือไอโซเลท A1R1B11, A1R3B24 และไอโซเลท A2R1B8 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชได้ทั้ง 3 ชนิด

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชที่ได้เก็บมาศึกษาทัง 2 รอบนั้น สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันได้ถึง 228 ไอโซเลท โดยพบว่าจุลินทรีย์ในรอบที่ 2 (เดือนกรกฎาคม) มีความหลากหลายมากกว่าในรอบที่ 1 (เดือนมกราคม) เนื่องจากในช่วงเดือนกรกฎาคมเป็นช่วงฤดูฝน ซึ่งเป็นช่วงที่สภาวะแวดล้อมต่างๆมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งในจำนวนนี้เมื่อนำมาทดสอบถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 32 ไอโซเลท ประกอบไปด้วยแบคทีเรียทั้งหมด 16 ไอโซเลท เชื้อรา 14 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 2 ไอโซเลท ซึ่งจะเห็นว่าไอโซเลตส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Collectotrichum* sp. และ *Corynespora* sp. ได้ดีกว่า *Sclerotium* sp. อาจเนื่องมาจาก *Sclerotium* sp. เจริญได้เร็วกว่าเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจำนวนนี้มีแบคทีเรียเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่แบคทีเรียไอโซเลท A1R1B11, A1R3B24 และไอโซเลท A2R1B8 ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลทนี้จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Collectotrichum* sp. ที่ 22.85%, 31.42% และ 40.00% ตามลำดับ และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *Corynespora* sp. ที่ 39.39%, 35.71% และ 46.66% ตามลำดับ และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *Sclerotium* sp. ที่ 42.50%, 34.21% และ 56.25% ตามลำดับ และเมื่อนำมาศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่า โคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท A1R1B11 จะมีลักษณะสีขาว-ชมพูอ่อน มีขนาดใหญ่ ผิวหน้าเรียบมัน ขอบไม่เรียบ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเซลล์รูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก การเรียงตัวของเซลล์จะเรียงตัวแบบเซลล์เดี่ยวหรือเรียงกัน 2-4 เซลล์ ไม่พบการสร้างสปอร์ ส่วนลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท A1R3B24 จะมีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ผิวหน้าแบบเรียบมัน ขอบโคโลนีไม่เรียบ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเซลล์รูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก เรียงตัวเซลล์เดี่ยวหรือเรียงต่อกัน ไม่พบการสร้างสปอร์ และไอโซเลท A2R1B8 ลักษณะโคโลนีสีขาวครีม ขอบของโคโลนีไม่เรียบ ผิวหน้าแบนไม่โค้งนูน มันวาว ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์แบคทีเรียรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวกที่หัวท้ายเซลล์ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวเรียงตัวกระจัดกระจาย

เอกสารอ้างอิง

Korsten, L. and E.S. De Jager, (1995). Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. S.Afr. Avocado Growers Assoc. Yearb, 18, 124-130.