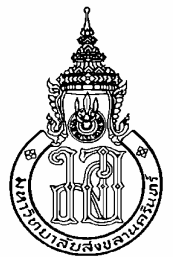


การคัดเลือก *Bacillus* spp. สำหรับใช้ควบคุมโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อราของถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Fruw.) โดยชีววิธี

Screening of *Bacillus* spp. for Biological Control of Yard Long Bean (*Vigna sesquipedalis* Fruw.) Foliar Diseases Caused by Fungi

ศุภลักษณ์ มณีแสง

Suppaluk Maneesang

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University
2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือก *Bacillus* spp. สำหรับใช้ควบคุมโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อรา ของถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Fruw.) โดยชีววิธี

ผู้เขียน นางสาวสุภลักษณ์ มณีแสง

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา ลีละศุภกุล)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ พัลลภา กฤษณีไพบูลย์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา ลีละศุภกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วาริน อินทนา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือก *Bacillus* spp. สำหรับใช้ควบคุมโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อราของถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Fruw.) โดยชีววิธี

ผู้เขียน นางสาวศุภลักษณ์ มณีแสง

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

ได้ทำการแยก *Bacillus* spp. จำนวน 503 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินรอบโคนต้นและใบถั่วฝักยาวจากแปลงปลูกในภาคใต้ของประเทศไทย เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคทางใบของถั่วฝักยาวโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย พบว่า *B. megaterium* ไอโซเลท HT-NK-460 และ *B. brevis* ไอโซเลท TZ-CP-342 ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Cercospora cruenta Uromyces vignae* และ *Oidium* sp. ได้ถึง 97.22-100 % ทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท ให้ต้านยาปฏิชีวนะ rifampicin เพื่อใช้ติดตามจำนวนประชากรที่พ่นลงบนต้นถั่วฝักยาว การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์และสารคลอโรทาโลนิลต่อการควบคุมโรคทางใบของถั่วฝักยาวทั้งในและนอกเรือนทดลอง ในเรือนทดลองพบว่าการพ่นด้วยสารคลอโรทาโลนิลสามารถลดอัตราการเกิดโรคใบจุด และราแป้ง แต่การพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่สามารถลดอัตราการเกิดโรคได้ ผลผลิตที่ได้จากการทดลองในแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สำหรับการทดลองนอกเรือนทดลองซึ่งสภาพแวดล้อมมีความเหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้มากกว่า สารคลอโรทาโลนิลและแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถลดอัตราการเกิดโรคใบจุด ราสนิม และราแป้งของถั่วฝักยาว ผลผลิตเฉลี่ยที่ได้จากแต่ละกรรมวิธีมีปริมาณมากกว่าผลผลิตที่ได้จากกรรมวิธีควบคุม เมื่อใช้สารคลอโรทาโลนิลที่ความเข้มข้น 2,000 ppm โดยพ่นทุก 7 วันให้ผลผลิตสูงสุด (3,674 กก./ไร่) รองลงมาเมื่อใช้ *B. brevis* Rif^{r-} ผสมกับ *B. megaterium* Rif^{r-} (3,196 กก./ไร่) ผลผลิตที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีควบคุม การติดตามจำนวนประชากร *B. brevis* Rif^{r-} และ *B. megaterium* Rif^{r-} บนใบถั่วฝักยาวหลังพ่นลงบนใบถั่วฝักยาวทุก 7 วัน พบว่า *B. brevis* Rif^{r-} และ *B. megaterium*Rif^{r-} มีชีวิตรอดบนใบถั่วฝักยาว แต่ไม่เพิ่มปริมาณบนใบถั่วฝักยาว

Thesis Title	Screening of *Bacillus* spp. for Biological Control of Yard Long Bean (*Vigna sesquipedalis* Fruw.) Foliar Diseases Caused by Fungi
Author	Miss Suppaluk Maneesang
Major Program	Plant Pathology
Academic Year	2008

Abstract

Five hundred and three strains of *Bacillus* were isolated from the rhizosphere and leaf surfaces of yard long bean grown in southern Thailand. *B. megaterium* HT-NK-460 and *B. brevis* TZ-CP-342 showed a high inhibitory effect on spore germination of *Cercospora cruenta*, *Uromyces vignae* and *Oidium* sp. (97.22-100%). Rifampicin-resistant strains of *B. brevis* TZ-CP-342Rif^{r-} and *B. megaterium* HT-NK-460Rif^{r-} were developed and used for monitoring the survival of bacteria on the sprayed plants. The antagonistic bacteria and the chlorothalonyl fungicide were tested for their efficacy in controlling leaf diseases of yard long bean both inside and outside the green house. In green house conditions, chlorothalonyl spraying decreased leaf spot and powdery mildew diseases (but bacterial spraying did not effect the disease incidence on yard long bean). The yields obtained from each treatment were not statistically different. Outside the green house where environmental conditions were more favorable for disease infections, it was found that both chlorothalonyl and bacterial spraying decreased the incidence of leaf diseases on yard long bean. The average yields obtained from each treatment were higher than the controls, although not statistically significantly so. The highest yield (3,674 kg/rai) was obtained when spraying with chlorothalonyl at a rate of 2,000 ppm every 7 days. The second highest (3,196 kg/rai) was obtained when spraying with the mixture of *B. brevis* Rif $^{r-}$ and *B. megaterium* Rif $^{r-}$.The population of *B. brevis* Rif^{r-} and *B. megaterium* Rif^{r-}on yard long bean leaves were counted after 7 days spraying. The results indicated that the bacteria can survive but not multiply on yard long bean leaves.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา ลีละศุภกุล กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง และแก้ไขจุดบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์พัลลภา กฤษณีไพบูลย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วาริน อินทนา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาชี้แนะแนวทางในการเขียนวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์ และ Mr. David Patterson ที่กรุณาแก้ไขจุดบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย และกองทุนการวิจัย คณะทรัพยากรธรรมชาติประจำปีงบประมาณ 2549

ขอขอบคุณ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทดลอง คุณปัทมพร อินสุวรรโณ คุณสุภาพ จันทรัตน์ คุณจำลอง ชูกำเนิด ที่ให้ความช่วยเหลือด้านธุรการ และเอื้ออำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ ผู้เป็นแรงผลักดัน และเป็นกำลังใจที่สำคัญให้ผู้เขียนมีกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ พี่ชาย พี่สาว และหลาน ๆ ตลอดจนพี่ ๆ น้อง ๆ และ เพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ศุภลักษณ์ มณีแสง

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพ	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(9)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	21
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	22
วัสดุ	22
อุปกรณ์	23
วิธีการ	24
3. ผลการทดลอง	31
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	50
5. สรุปผลการทดลอง	54
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	63
ประวัติผู้เขียน	75

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* spp. ตามความแตกต่างทางจุลชีววิทยาและทางชีวเคมี	6
2	ตัวอย่างโรคของพืชต่าง ๆ ที่สามารถควบคุมได้โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.	8
3	จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของบริษัทต่าง ๆ ที่ผลิตและจำหน่ายเพื่อใช้ควบคุมโรคพืช	14
4	จำนวนตัวอย่างใบ และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวในจังหวัดทางภาคใต้	31
5	จำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากใบและดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวในจังหวัดทางภาคใต้	33
6	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลทต่าง ๆ ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Cercospora cruenta Uromyces vignae* และ *Oidium* sp. บนสไลด์หลุม นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C)	37
7	การทดสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* spp.	40
8	ระดับความรุนแรงของโรคใบจุด ราสนิม ราแป้ง และผลผลิตของถั่วฝักยาวในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในเรือนทดลอง	43
9	ระดับความรุนแรงของโรคใบจุด ราสนิม ราแป้ง และผลผลิตของถั่วฝักยาวในแต่ละกรรมวิธีการทดลองนอกเรือนทดลอง	45
10	จำนวนโคโลนีแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ตรวจพบบนใบถั่วฝักยาวหลังพ่นลงบนต้นถั่วฝักยาวทุก ๆ 7 วัน	49

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การงอกของสปอร์เชื้อรา *Cercospora cruenta* *Uromyces vignae* และ *Oidium* sp. ในน้ำเลี้ยง *Bacillus* spp. และในน้ำกลั่น นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C)	38
2	การเจริญร่วมกันโดยไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกันของ *B. brevis* Rif^{r-} และ *B. megaterium* Rif^{r-}	42
3	ต้นถั่วฝักยาวอายุ 40 วัน ที่ปลูกในเรือนทดลอง	44
4	ต้นถั่วฝักยาวอายุ 70 วัน ที่ปลูกนอกเรือนทดลองหลังจาก พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* Rif^{r-} แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} ผสมกับ *B. megaterium* Rif^{r-} สารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm และกรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่น)	46

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

□	=	alpha
β	=	beta
µg	=	microgram
°C	=	degree Celsius
%	=	percentage
aq	=	aqueous
cfu	=	colony forming unit
g	=	gram
kDa	=	kilo Daltons
KOH	=	potassium hydroxide
M	=	molar
ml	=	milliliter
N	=	normality
NaCl	=	sodium chloride
PCR-based 16S rDNA	=	polymerase chain reaction based 16S ribosomal DNA
pH	=	- log hydrogen ion concentration
ppm	=	parts per million
RAPD	=	random amplified of polymorphic DNA
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
Rif^r	=	rifampicin-resistance
v	=	volume
w	=	weight

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Fruw.) เป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญ ใช้บริโภคสด และนำมาประกอบอาหารได้หลายชนิด ถั่วฝักยาวที่ผลิตได้ส่วนใหญ่ใช้บริโภคภายในประเทศ แต่ปัจจุบันมีการส่งออกมากขึ้นทั้งในรูปถั่วฝักยาวสดและแช่แข็ง ซึ่งจัดเป็นพืชผักที่มีศักยภาพในการส่งออกสูงมากพืชหนึ่ง เป็นที่นิยมปลูกมาก เนื่องจากปลูกง่าย เจริญเติบโตเร็ว มีอายุสั้น ปลูกได้ตลอดปีและทุกภูมิภาคของประเทศ (ขวัญจิตร สันติประชา และวัลลภ สันติประชา, 2535) จากสถิติการเพาะปลูกพืชผักทั่วประเทศ ปีการเพาะปลูก 2548/2549 ของกรมส่งเสริมการเกษตร ระบุว่าทั่วประเทศมีพื้นที่ปลูกถั่วฝักยาวรวม 130,836 ไร่ ให้ผลผลิต 124,002 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2549) ประเทศไทยมีการส่งออกถั่วฝักยาวทั้งในรูปผักสดและแช่แข็งประมาณ 10,785 ตัน คิดเป็นมูลค่า 3,875 ล้านบาท (กรมวิชาการเกษตร, 2550) แต่อย่างไรก็ตามเกษตรกรผู้ปลูกถั่วฝักยาวต้องประสบปัญหาในการปลูกหลายปัญหาด้วยกัน ไม่ว่าจะเป็นปัญหาทางด้านแมลงศัตรูพืช และปัญหาทางด้านโรคของถั่วฝักยาว ปัญหาดังกล่าวเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อปริมาณ และคุณภาพของถั่วฝักยาว

โรคทางใบของถั่วฝักยาวที่พบได้บ่อย ได้แก่ โรคใบจุด (*Cercospora cruenta* Sacc.) โรคราสนิม (*Uromyces vignae* Barley.) และโรคราแป้ง (*Oidium* sp.) (ปริศนา วงค์ล้อม, 2548) ซึ่งโรคดังกล่าวมีสาเหตุมาจากการเข้าทำลายของเชื้อรา หากอาการของโรคมีความรุนแรงจะส่งผลให้ผลผลิตและคุณภาพของถั่วฝักยาวลดลง การเลือกใช้สารเคมีป้องกัน และกำจัดโรคที่เกิดขึ้น สามารถเห็นผลได้อย่างรวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีนั้นส่งผลกระทบและก่อให้เกิดอันตรายในหลายด้าน เช่น อันตรายต่อผู้ใช้สารเคมี ผู้บริโภคซึ่งได้รับจากสารเคมีตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร อันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ จากเหตุผลดังกล่าวทำให้หลายฝ่ายตระหนักถึงอันตรายที่เกิดขึ้นและพยายามค้นคว้าหาวิธีการใหม่ ๆ มาใช้ควบคุมโรคพืชแทนการใช้สารเคมี วิธีการดังกล่าว ได้แก่ การปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานต่อโรคสูงขึ้น และการควบคุมโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยเฉพาะการนำจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคเข้ามาควบคุม เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย จะเห็นได้จากการผลิตจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดต่าง ๆ ในเชิงการค้า (Cook, 1993) สำหรับผลดีของการควบคุมโดยชีว

วิธีนี้ก็คือ ลดอันตรายจากการใช้สารเคมีต่อมนุษย์ สิ่งแวดล้อม การต้านยาของเชื้อสาเหตุโรค ลดต้นทุนในการผลิตและให้ผลการควบคุมในระยะยาว

การตรวจเอกสาร

1. โรคของถั่วฝักยาว

โรคใบจุด (*C. cruenta*) โรคราสนิม (*U. vignae*) และโรคราแป้ง (*Oidium* sp.) เป็นโรคของถั่วฝักยาวที่มีสาเหตุจากเชื้อรา เชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าวจะเข้าทำลายบริเวณส่วนของใบ และฝัก ความเสียหายของพืชจะรุนแรงมากหากสภาพแวดล้อมมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา เชื้อราทั้ง 3 ชนิด สร้างสปอร์จำนวนมาก สปอร์ที่สร้างขึ้นมานั้นสามารถแพร่กระจายไปกับลม น้ำ ติดไปกับสัตว์ มนุษย์หรืออุปกรณ์การเกษตรส่งผลให้เกิดการระบาดของโรค และการเข้าทำลายพืชจากเชื้อรา เกิดขึ้นซ้ำ ๆในระหว่างฤดูปลูก ทำให้ผลผลิต และคุณภาพของถั่วฝักยาวลดลง

1.1 โรคใบจุด (Leaf spot)

ระยะแรกปรากฏจุดสีน้ำตาลปนแดงขนาดเล็ก ๆ ในใบล่างที่อยู่ใกล้ดิน ระยะต่อมาแผลขยายใหญ่กลายเป็นสีน้ำตาลแดง อาการรุนแรงแผลกระจายทั่วไปบนใบ จะพบเชื้อราเจริญคลุมแผลเป็นปุยสีน้ำตาลเข้ม โดยเฉพาะด้านหลังใบ ทำให้ใบไหม้แห้งกรอบ และร่วง ต้นชะงักการเจริญ ผลผลิตต่ำ (สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8, 2548)

เชื้อราสาเหตุ *C. cruenta*

เชื้อรา *C. cruenta* อยู่ใน Phylum Ascomycota จัดเป็นเชื้อปรสิตอย่างอ่อน (weak parasite) เข้าทำลายพืชที่อ่อนแอ และทำให้เกิดแผลตายกับพืชได้ โคโลนีมีสีน้ำตาล โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) มีลักษณะผอมเรียวยาวตรง หรือโค้งเล็กน้อย ไม่แตกกิ่งก้านสาขา มีส่วนปลาย (apex) เป็นหนามแหลมยาวประมาณ 1- 2 ไมโครเมตร ไม่มีสี ผิวเรียบ สปอร์มีความยาวประมาณ 60 - 200 ไมโครเมตร หรืออาจมีความยาวมากว่านี้ ในแต่ละสปอร์มี 9-17 ผนังกั้น มี hilum เล็กน้อย เป็นสีดำเข้มกว้างประมาณ 2.5 - 3.5 ไมโครเมตร (Ellis, 1971)

การป้องกันกำจัด

ควรเว้นระยะปลูกให้เหมาะสมเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรค เมื่อเริ่มพบพืชแสดงอาการโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่ฝนตกชุก ควรตัดแต่งบริเวณโคนต้นให้โปร่ง นำส่วนของพืชที่เป็นโรคเผาทิ้งนอกแปลง แล้วฉีดพ่นด้วยสารเคมีควบคุมเชื้อรา เช่น แมนโคเซ็บ หรือคลอโรทาโลนิล เพื่อป้องกันการแพร่ระบาด กำจัดวัชพืชในแปลง และบริเวณรอบ ๆ อย่างสม่ำเสมอ ควรหลีกเลี่ยงการให้น้ำในระบบพ่นฝอย และการให้น้ำในตอนเย็น หรือใกล้ค่ำ

1.2 โรคราสนิม (Rust)

เกิดตุ่มนูนเล็ก ๆ สีสนิมบนใบ ก้านใบ และฝัก ภายในตุ่มนูนเต็มไปด้วยสปอร์ของเชื้อรา เมื่อเจริญเต็มที่จะดันให้ผิวพืชปริออก เห็นกลุ่มสปอร์สีน้ำตาลแดง เมื่อเกิดตุ่มแผลที่ก้านใบมาก ๆ จะทำให้ใบร่วง ต้นทรุดโทรม หากโรคระบาดรุนแรงในระยะที่ถั่วฝักยาวกำลังออกฝัก และเกิดตุ่มแผลที่ฝักเป็นจำนวนมากจะทำให้ฝักไหม้ ฝักและเมล็ดในฝักจะเสียหายเป็นจำนวนมาก (ศศิธร วุฒิวณิชย์, 2549)

เชื้อราสาเหตุ *U. vignae*

เชื้อรา *U. vignae* จัดอยู่ใน Phylum Basidiomycota พบการสร้างสปอร์ในระยะ uredinium และ telium โดย uredinium เกิดด้านบนใบมากกว่าด้านใต้ใบ สปอร์เกิดใต้ผิวใบ (epidermis) ของพืช และเมื่อแก่จะดันผิวใบให้แตกออกมา urediniospore มี 1 เซลล์ เกิดบนก้าน ผนังบางใสไม่มีสี รูปร่างส่วนใหญ่มีลักษณะแบบรูปไข่ (obovoid) และมีบางสปอร์รูปร่างค่อนข้างรี (broadly ellipsoid) ขนาด 21.25 - 28.75 × 18.75 - 22.50 ไมโครเมตร ขนาดเฉลี่ย 25.45 × 20.88 ไมโครเมตร ผนังหนาสม่ำเสมอ 1.25 - 1.88 ไมโครเมตร สีเหลืองทองอ่อน ผนังไม่เรียบมีหนาม (echinulate) มีจุดงอก 2 จุดต่อสปอร์อยู่ด้านตรงข้ามกัน เหนือขึ้นไปจากเส้นศูนย์สูตรมาก telium เกิดด้านบนใบมากกว่าด้านใต้ใบ มีลักษณะเป็นผงฝุ่นสีน้ำตาลดำ การเกิดเหมือน uredinium นอกจากนี้ยังเกิดใน uredinium เก่าด้วย teliospore มี 1 เซลล์ รูปร่างแบบรูปไข่ (obovoid) กลมรี (ellipsoid) จนถึงเกือบกลม ขนาด 26.25 - 35.00 × 23.75 - 27.50 ไมโครเมตร ขนาดเฉลี่ย 31.50 × 25.31 ไมโครเมตร บริเวณส่วนปลาย (apex) ยื่นออกไปเป็นติ่งใสไม่มีสี หรือมีสีน้ำตาลอ่อน มีความหนา 5.00 -7.50 ไมโครเมตร ผนังด้านข้างหนา 2.50 - 3.75 ไมโครเมตร มีสีน้ำตาล ผิวผนังเรียบ มีจุดงอก 1 จุดต่อสปอร์อยู่บริเวณตรงกลางส่วนปลาย สปอร์เกิดบนก้าน ผนังบางใสไม่มีสี หรือแกมเหลืองเล็กน้อย ยาวได้ถึง 37.50 ไมโครเมตร (พงษ์วิภา, 2529)

การป้องกันกำจัด

กำจัดเศษซากพืชรุ่นที่แล้ว วัชพืชในแปลง และบริเวณรอบ ๆ เพื่อไม่ให้เป็นแหล่งอาศัยอยู่ข้ามฤดู ไถพลิกกลับดินตากแดดนาน ๆ เว้นระยะปลูกให้เหมาะสม การปลูกถั่วฝักยาวในช่วงฤดูฝนควรทำค้างให้มีช่องว่างระหว่างแถวกว้างกว่าปกติ เพื่อให้สามารถระบายความชื้นในแปลงได้เร็ว หมั่นสำรวจแปลง เมื่อเริ่มพบต้นเป็นโรคควรรีบตัดแต่ง เก็บส่วนของพืชที่เป็นโรคนำไปเผาทำลาย ในช่วงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค ควรใช้สารเคมีควบคุมเชื้อรา เช่น แมนโคเซ็บ คลอโรทาโลนิล หรือเบนโนมิล ฉีดพ่นเป็นครั้งคราวเพื่อป้องกันโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งระยะเริ่มติดฝักควรดูแลเป็นพิเศษ

1.3 โรคราแป้ง (Powdery mildew)

เกิดได้กับทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็นใบ ลำต้น หรือฝัก พบอาการเริ่มแรกที่ใบโดยเฉพาะใบล่าง (กรมวิชาการเกษตร ข, 2545) เส้นใยและโคนิเดียของเชื้อรามีลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาวหรือเทาอ่อนปกคลุมตามใบ และส่วนต่าง ๆ ของพืชเป็นหย่อม ๆ โดยปกติเชื้อราพวกนี้จะสร้างเส้นใยเจริญอยู่ที่ผิวนอกของพืชแล้วสร้าง haustorium ดูดน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชบริเวณที่เชื้อราปกคลุมอยู่ ทำให้เซลล์ตาย เกิดอาการใบแห้งกรอบ ส่วนอ่อน ๆ ของพืชที่ถูกเชื้อราปกคลุมจะบิดเบี้ยว และไม่เจริญเติบโตต่อไป ถ้าโรคนี้ระบาดในระยะที่ถั่วฝักยาวกำลังแตกยอดอ่อน ระยะออกดอก หรือติดฝักอ่อน จะเสียหายอย่างมาก แทบไม่ให้ผลผลิตเลย

เชื้อราสาเหตุ *Oidium* sp.

เชื้อรา *Oidium* sp. อยู่ใน Phylum Ascomycota จัดเป็นปรสิตกับพืชชั้นสูงโดยการสร้างเส้นใยสีขาวคล้ายผงแป้งอยู่บริเวณผิวด้านนอกของพืชอาศัย เชื้อราสร้าง haustorium สำหรับดูดอาหารจากเซลล์พืช (Barnett and Barry, 1972) เส้นใยของเชื้อรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6-6.9 ไมโครเมตร conidiophore foot cell ตั้งตรงมีรูปร่างทรงกระบอก (cylindrical) หรือโค้ง (flexuous) foot cell มีขนาด 30.0 - 46.2 x 5.8-6.9 ไมโครเมตร โคนิเดียมีรูปร่างทรงกระบอก (cylindrical) หรือ รูปแท่ง (doliiform) มีขนาด 25.4 - 32.3 x 11.6 - 18.5 ไมโครเมตร (Koike and Saenz, 1998)

การป้องกันและกำจัด

การป้องกันสามารถทำได้โดยเลือกปลูกถั่วฝักยาวพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคสูง เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรค กำจัดวัชพืชในแปลง และบริเวณรอบ ๆ ซึ่งอาจเป็นแหล่งที่อาศัยอยู่ข้ามฤดูของเชื้อราสาเหตุโรคได้ ในช่วงที่สภาพแวดล้อมเหมาะต่อการเกิดโรค ควรใช้สารเคมี เช่น ไดโนแคป ไตรโฟรีน เบนโนมิล หรือชีวภัณฑ์ควบคุมเชื้อราชนิดอื่น ๆ ฉีดพ่นคลุมต้นพืชเพื่อป้องกันโรคไว้ก่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในระยะออกดอก และเริ่มติดฝักอ่อน เพราะถ้าเป็นโรครุนแรงในระยะนี้ อาจไม่ได้ผลผลิต หรือผลผลิตคุณภาพต่ำ ฝักมีขนาดเล็กบิดเบี้ยว

2. *Bacillus* sp.

การจัดจำแนกหมวดหมู่ทางวิทยาศาสตร์ (Classification) ตาม Bergey's manual (Krieg and Holt, 1984)

Kingdom Prokaryote

Division Bacteria

Order Cytophagaceae

Family Bacillaceae

Genus *Bacillus*

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติไม่ก่ออันตรายหรือทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อคน สัตว์ หรือพืช (Boer and Diderichsen, 1991) โดยมีคุณสมบัติเป็นแกรมบวก รูปร่างแท่ง มีขนาดกว้าง 0.5 - 2.5 x 1.2 - 10 ไมโครเมตร สร้างเอนโดสปอร์เมื่ออายุมากขึ้น เอนโดสปอร์ที่สร้างขึ้นมีรูปร่างแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อ สำหรับประโยชน์ของเอนโด-สปอร์ คือ ส่งผลให้ *Bacillus* spp. ดำรงชีวิตอยู่ได้ยาวนานในหลายสภาวะ (Blakeman and Fokkema, 1982) ทนทานต่อความแห้งแล้ง ความร้อน รังสี UV และตัวทำละลายอินทรีย์ (Obagwu and Korsten, 2003) *Bacillus* spp. สามารถเคลื่อนที่ได้โดยแฟลเจลลาแบบรอบตัว สามารถทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ในดิน (Emmert and Handelsman, 1999) *Bacillus* spp. สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิปกติ และ pH เป็นกลาง ดำรงชีวิตแบบใช้ และไม่ใช้ออกซิเจน สำหรับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารแข็ง โคโลนีมักมีรูปกลม ผิวด้านหน้าทึบแสง มีสีครีมถึงสีน้ำตาล การเลี้ยงในอาหารเหลวจะทำให้อาหารสีคล้ำขึ้น นอกจากนี้การจัดจำแนก *Bacillus* spp. นั้นสามารถอาศัยลักษณะทางจุลชีววิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี (ตารางที่ 1) เนื่องด้วย *Bacillus* spp. ดำรงชีวิตอยู่ได้ยาวนานในหลายสภาวะ (Blakeman and Fokkema, 1982) อีกทั้งยังสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Botrytis cinerea, Monilinia fructicola, Phytophthora cactorum, Sclerotium rolfsii , Pythium irregulare* เป็นต้น (McKeen *et al*.,1986 ; Phae *et al*., 1990) ทำให้ได้รับความสนใจในการนำเอา *Bacillus* spp. มาควบคุมโรคพืชหลายชนิด (ตารางที่ 2) ทั้งใน และต่างประเทศ

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกสปีชีส์ *Bacillus* spp. ตามความแตกต่างทางจุลชีววิทยาและทางชีวเคมี

(Macfaddin, 1980)

	Gram stain	Capsule	Motile	OF-G	Indole	Gelatin	Citrate	VP	Urea	Glucose	Arabinose	Manitol	Xylose	7.5 % NaCl	Starch A
B. anthracis	+	+	-	F	-	+[4]	V	+	-	A	-	-	-	G	+[7]
B. cereus	+	-	V[+2]	F	-	+	+	+	V	A	-	-	-	G	+[7]
B. megaterium	+	NR	+[3,4]	O	-	+[5]	+	-	V	A	V[+]	V[+]	V[+]	G	+
B. subtilis	+	-	+	O	-	+[4]	+	+	V	A	A	A	A	G	+[7]
B. pumilus	+	-	+	O	-	+	+	+	-	A	A	A	A	G	-
B. licheniformis	+	-	+	F	-	+[4]	+	+	V	A	A	A	A	G	+[9]
B. polymyxa	V	+	+	F	-	+	-	+	-	A	A	A	A	NG	+
B. macerans	V	NR	+	F	-	+	-	-	-	A	A	A	A	NG	+
B. circulans	V	+	V[+]	F/O	-	+[w]	-	-	-	A	-	-	-	V	+
B. stearothermophilis	V	NR	+	F/O	-	+	-	-	V	A	V	V	V	NG	+[10]
B. coagulans	+	NR	+	F	-	-	-	V	-	A	V	V	V	NG	+
B. alvei	V	NR	V[+]	F	+	+	-	+	-	A	-	-	-	NG	+
B. firmus	V	NR	V	O	-	+	-	-	-	A	V	A	V	G	+
B. laterosporus	V	NR	+	F	V	+	-	-	-	A	-	A	-	NG	-
B. brevis	V	-	+	O	-	+	V	-	-	V	-	V	-	NG	-
B. sphaericus	V	NR	+	O	-	V	-	-	V	-	-	-	-	V	-
B. badis	+	NR	+	O	-	+	-	-	-	-	-	-	NR	NR	-
B. lentus	+	NR	+	O	-	-	-	-	+	A	-	-	NR	NR	+
B. pentothenticus	+	NR	+	F	-	+	V	-	-	A	V	-	NR	G	+
B. pulvifaciens	+	NR	+	F	-	-	-	-	-	A	NR	NR	NR	NR	-[11]

สัญลักษณ์แสดง :

+ 90 % or greater positive results

- 90 % or greater negative results

V variable result

V^{+} variable result major positive

A acid

G growth

F fermentation

O oxidative

NR no results available

NG no growth

$+^{1}$ virulent strains

$+^{2}$ *B. cereus* var. *mycoides* usually nonmotile

$+^{3}$ free aeration required for a positive motility

$+^{4}$ slow

$+^{5}$ rapid

$+^{6}$ VP : incubate an additional 24 hrs. at 37 °C

$+^{7}$ 5 % SBA *B. anthacis*, nonhemolytic ; *B. cereus,* β – hemolytic, *B. subtilis*, variable

$+^{8}$ *B. pumilus*, positive hippurat hydrolysis

$+^{9}$ *B. licheniformis* usually positive for arginine dihydrolase : NH3

$+^{10}$ *B. stearothermophilus*, catalase variable

$-^{11}$ *B. amyloliquefaciens*, catalase negative

ตารางที่ 2 ตัวอย่างโรคของพืชต่าง ๆ ที่สามารถควบคุมได้โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

โรค	เชื้อที่ทำให้เกิดโรค	พืช	เอกสารอ้างอิง
รากและโคนเน่า	*Phytophthora cactorum*	แอปเปิ้ล	Utkhede and Smith, 1991
รากและโคนเน่า	*P. cambivora*	แอปเปิ้ล	Utkhede and Smith,1991
เหี่ยว	*Fusarium moniliforme*	ข้าวโพด	Hebber *et al*., 1992
เหี่ยว	*F. oxysporum*	ฝ้าย	จิระเดชและบรรเจิด,2539
เน่าคอดิน	*Rhizoctonia solani*	ฝ้าย	จิระเดชและบรรเจิด,2539
รากและโคนเน่า	*S. cepivorum*	หอม	Utkhede and Rahe,1983
โรคกาบใบแห้ง	*R. solani*	ข้าว	กรมวิชาการเกษตร ก, 2545
รากเน่าโคนเน่า	*R. oryzae*	ข้าว	กรมวิชาการเกษตร ก, 2545
รากและโคนเน่า	*P. palmivora*	ทุเรียน	มณจันทร์ เมฑธน, 2536
โรคราสนิม	*Puccinia pelargonii-zonalis*	หญ้าเจอเรเนียม	Rytter *et a*l., 1989
โรคแอนแทรคโนส	*Colletotrichum dematium*	หม่อน	Yoshida *et al*., 2000
โรคใบจุด	*Cercospora beticola*	ซูการ์บีท	Douglas and Barry, 2002
โรคแอนแทรคโนส	*Coll. gloeosporioides*	พริก	จิรัสสา มีกลิ่นหอม, 2547
โรคใบจุด	*C. capsici*	พริก	จิรัสสา มีกลิ่นหอม, 2547
โรคใบจุดดำ	*Phaeoisariopsis personata*	ถั่วลิสง	Kishore *et al*., 2005

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. เหมาะสำหรับการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเนื่องจาก

1. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปตามส่วนต่าง ๆ ของพืช ดิน น้ำ อากาศ โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อพืช

2. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถใช้ควบคุมเชื้อรา และแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด (Helisto *et al*., 2001; Gong *et al*., 2006) และสามารถแก่งแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน (Sinclair, 1989)

3. สามารถเจริญในสภาพแวดล้อมที่แปรปรวนเนื่องจากสามารถสร้างเอนโดสปอร์

4. สารที่ผลิตโดย *Bacillus* spp. เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในบริเวณราก พืช และยังสามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคได้ จากการศึกษาพบว่า *Bacillus* spp. สามารถผลิตสารเมตาบอไลท์บางชนิด ที่เป็นประโยชน์ในการนำมาใช้กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค (Miyanishi *et al*., 2002)

5. *Bacillus* spp. สามารถใช้ผนังเซลล์เชื้อราที่ประกอบด้วยไคติน และเบต้ากลูเคน เป็นแหล่งอาหารได้ (Collins *et al*., 2003)

2.1 *Bacillus* spp. ที่นำมาควบคุมโรคพืชได้แก่

2.1.1 *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง มีการสร้างสปอร์ มีขนาดของเซลล์ 0.5 x 1.2 – 2.5 x 10 ไมโครเมตร สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด 5 - 20 ^{o}C และสูงสุดที่ 40-55 ^{o}C (Krieg and Holt, 1984) มีเอนโดสปอร์ซึ่งมีรูปร่างแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ พบได้ทั่วไปตามพื้นดิน ในลำต้น และบริเวณรากพืช สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่ อะไมเลส และ โปรติเอส เป็นต้น (Boer and Diderichsen, 1991) สามารถใช้ควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด เช่น โรคใบจุดของซูการ์บีท โรคใบจุดของพริก เป็นต้น

2.1.2 *B. megaterium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่ง มีขนาดของเซลล์ 0.5 x 2.5 - 0.7 x 5 ไมโครเมตร สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด 3 - 20 ^{o}C และสูงสุดที่ 40 - 50 ^{o}C (Krieg and Holt, 1984) เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ สามารถเจริญและเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในสภาพที่ไม่เหมาะต่อการเจริญ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทางรากของถั่วได้หลายชนิด และสามารถลดความรุนแรงของอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา เช่น โรครากเน่าของถั่วเหลือง (Zheng and Sinclair, 2000) *B. megaterium* อาศัยอยู่บริเวณรอบ ๆ รากส่งเสริมการสร้างปมของรากถั่ว สามารถอยู่ในดินและเจริญได้ทุกฤดู อีกทั้งยังส่งเสริมให้ผลผลิตของพืชเพิ่มมากขึ้น (Liu and Sinclair, 1995)

2.1.3 *B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่งโดยมีขนาดของเซลล์ 0.6 x 1.5 - 0.8 x 3 ไมโครเมตร สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด 15 ^{o}C และอุณหภูมิสูงสุด 50 - 55 ^{o}C สร้างสปอร์มีรูปไข่อยู่บริเวณตรงกลางของเซลล์ Saito (1973) รายงานว่า *B. licheniformis* สามารถใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช เช่น โรคราสีเทาของสตรอเบอร์รี่ นอกจากนี้ *B. licheniformis* สามารถผลิต α- amylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถทนต่อความร้อน และยังเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญ ในด้านอุตสาหกรรม *B. licheniformis* สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะต่อการเจริญ เช่น สภาพที่ขาดออกซิเจน และอุณหภูมิสูงอีกทั้ง

B. licheniformis สามารถสร้างสารปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น bacillomycin, bacitracin, licheniformin และ proticin (Katz and Demain, 1977)

2.2 สารที่ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.

2.2.1 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.

จากรายงานการศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบว่า *Bacillus* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ทั้งหมด 167 ชนิด และเป็นสารจำพวกเปปไทด์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* 68 ชนิด (Katz and Demain, 1977) เช่น bacillomycin, iturin, mycosubtilin, bacilysin, fengymycin, mycobacillin เป็นต้น โดยสารที่สร้างขึ้นมาเป็นสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต การสร้างสารเมทาบอไลท์นั้นจะสร้างในช่วง late log phase จนถึงช่วง stationary phase (Nakano *et al*., 1988) จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* ในอาหารเหลวคือที่อุณหภูมิ 30 °C และในอาหารแข็งคือที่อุณหภูมิ 25 °C (Shoda, 2000) สำหรับประโยชน์ของสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นโดย *B. subtilis* นั้น ได้แก่ ยับยั้งการสร้างสารโมเลกุลใหญ่บางชนิดในเซลล์ ช่วยรักษาพลังงานบางส่วนของเซลล์เอาไว้ ช่วยในการแก่งแย่งอาหารในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน หากต้องอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น และยังช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิด ทำให้ *Bacillus* spp. สามารถดำรงชีวิตได้นานขึ้น ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่สร้างโดย *Bacillus* spp. ได้แก่

Surfactin ประกอบด้วยอะมิโน 7 ตัว คือ L-Glu, L-Leu, D-Leu, L-Val, L-Asp, D-Leu และ L-Leu (Wei *et al*., 2003) อะมิโนตัวที่ 7 อาจมีการยึดจับด้วยหมู่คาร์บอกซิล และไฮดรอกซิลของกรดไขมันที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดแรงตึงผิว ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ไวรัส และไฟโตพลาสมา

Iturins มีลักษณะโครงสร้างเป็น amphiphilic peptide ring ซึ่งประกอบด้วยอะมิโน 7 ตัว (Gong *et al*., 2006) สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ iturin, bacillomycin, mixirin และ mycosubtilin ออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา และยีสต์เป็นส่วนใหญ่ โดยส่งผลต่อการงอกของสปอร์ หรือการเจริญของเส้นใยของเชื้อราก่อโรค

Fergycin (plipastatin) ประกอบด้วย β- hydroxy fatty acid ต่อกับ N- terminal ของ 10 amino ซึ่งจะมี 4 D-amino acid และ amino acid L-ornithine เล็กน้อย ปลาย C ของ peptide moiety เชื่อมกับไทโรซีนที่ตำแหน่งที่ 3 มีผลเจาะจงในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา

Bacillibactin ประกอบด้วย dihydroxybutyrate (DHB), glycine และ threonine 3 กลุ่มประกอบกันเป็นวงแหวนขนาดใหญ่ ทำหน้าที่เป็น siderophore โดยใช้ OH^- ของ DHB จับ ferric iron

Difficidin และอนุพันธ์ ได้แก่ difficidin และอนุพันธ์ และ oxydifficidin ส่วนใหญ่สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ก่อโรคในคน เช่น *Morganella morgnii, Streptococcus faecalis, Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Ps. mirabilis* และ *E. aerugenes* (Wilson *et al*., 1987 ; Zimmerman *et al*., 1987 อ้างโดย สุชล แก้วพรหม, 2539)

Zwittermicin A เป็นสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย *B. cereus* และ *B. thuringiensis* (He *et al*., 1994 ; Stabb *et al*., 1994 ; Raffel *et al*., 1996) โครงสร้างทั่วไปประกอบด้วย peptide และ polyketide antibiotics มีหมู่ hydroxyl อยู่บนสาย carbon ซึ่งคล้ายกับโครงสร้างบางส่วนของ polyketide โดย nitrogen ตรงส่วนปลายของ zwittermicin A เป็นส่วนที่ได้มาจากกรดอะมิโน citrulline ซึ่งเป็นส่วนที่คล้ายกับ peptide antibiotic สารปฏิชีวนะ zwittermicin A ที่สร้างขึ้นสามารถยับยั้งได้ทั้งยูคาริโอต และโปรคาริโอตที่ก่อโรคพืชหลายชนิด (Silo-Suh *et al*., 1998)

กลไกการยับยั้งของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. ต่อเชื้อสาเหตุโรค

สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย *Bacillus* spp. จะมีผลไปทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ซึ่งสามารถแบ่งความสามารถในการเข้าทำลายจุลินทรีย์ได้ 5 ประเภท (สมใจ เอี่ยมพรรัตน์, 2531)

1. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถแบ่งตัวต่อไปได้

2. มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสารปฏิชีวนะจะไปทำให้การนำสารเข้าสู่เซลล์และออกจากเซลล์ผิดปกติ หากเซลล์เป็นเช่นนี้นานจะทำให้เซลล์ตายได้

3. ขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์โปรตีนเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อการซ่อมแซม และสร้างเสริมเซลล์ ทำให้เกิดการเจริญ ดังนั้นการยับยั้งหรือการขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนจึงส่งผลให้เซลล์ตายได้

4. ขัดขวางหน้าที่ของกรดนิวคลีอิก กรดนิวคลีอิกเป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญในการควบคุมเมตาบอลิซึมของเซลล์ ดังนั้นการขัดขวางการทำงานของกรดนิวคลีอิกจะทำให้เมตาบอลิซึมของเซลล์ผิดปกติไปด้วย

5. ขัดขวางการสร้างพลังงานของเซลล์ สารปฏิชีวนะที่ผลิตขึ้นจะไปมีผลขัดขวางการสร้างพลังงาน หากการสร้างพลังงานถูกขัดขวางกิจกรรมของเซลล์จะลดต่ำลง ทำให้เซลล์ตาย

2.2.2 เอนไซม์ (Enzymes) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.

Bacillus spp. สามารถผลิต extracellular hydrolytic enzymes ที่ใช้ในการย่อยสลายได้หลายชนิด เช่น ไคติเนส ไคโตซานเนส ไลเปส ลามินาลิเนส และโปรติเอส ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่าง (alkaline protease) และเสถียรที่อุณหภูมิสูง (Priest, 1977) เอนไซม์ที่สร้างขึ้นมานี้มีบทบาทในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา (Helisto *et al*., 2001) Aktuganov และคณะ (2007) รายงานว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 739 สามารถผลิตเอนไซม์ β1,3-glucanase และ protease เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบของอาหาร โดยเอนไซม์ที่สร้างขึ้นมานี้มีบทบาทในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา *Bipolaris sorokiniana* ส่วน Aono และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษาการสร้างเอนไซม์ของ *B. circulans* สายพันธุ์ IAM1165 พบว่า *B. circulans* สายพันธุ์ IAM1165 สร้างเอนไซม์ β1,3-glucanase ซึ่งมีมวลโมเลกุลต่างกันคือ 28, 42, และ 91 kDa โดยเอนไซม์ดังกล่าวนี้ถูกสร้างในระยะ stationary phase เอนไซม์ที่สร้างขึ้นจะทำงานได้ดีในช่วง pH 4.0 - 7.0 และสามารถทำงานได้แม้อุณหภูมิสูงถึง 60 °C และยังพบว่าเอนไซม์ β1,3-glucanase ที่มีมวลโมเลกุล 42 kDa สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุด Miyanishi และคณะ (2002) รายงานถึง β1,3-glucanase ว่าสามารถแยกได้จาก พืช แบคทีเรีย ยีสต์ โดยเอนไซม์ที่สร้างขึ้นมานี้เป็นประโยชน์ต่อการย่อยเซลล์ของจุลินทรีย์ตัวอื่น ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าเอนไซม์ที่สร้างขึ้นยังช่วยให้พืชอาศัยมีกลไกต้านทานต่อเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *melonis* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของแตงโม นอกจากนี้ Leelasuphakul และคณะ (2006) ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์ β1,3-glucanase ที่ผลิตโดย *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เหมาะสมคือ 6.5 - 9.5 และยังสามารถทำงานได้ดีแม้อุณหภูมิจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 50 °C เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นมานี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani* และ *Pyricularia grisea* ได้ดี

2.2.3 สารระเหย (Volatile organic compounds) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.

แบคทีเรีย และเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินสามารถผลิตสารระเหยประเภทไฮโดรคาร์บอนหลายชนิด เช่น ethylene, ethane, propane, propene, isoamyl alcohol และ isoprene จากการศึกษาพบว่า *Bacillus* spp. สามารถสร้างสารระเหย isoprene (2-methyl-1,3-butadiene)ได้มากที่สุดโดยสาร isoprene นี้มีฤทธิ์ต้าน Cyanobacteria และเชื้อราก่อโรคพืช Kuzma และคณะ (2004) รายงานถึงสารระเหย isoprene ที่สร้างโดย *Bacillus* spp. ว่าจะถูกสร้างขึ้นในระยะ log

phase โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างคือที่ 45 °C นอกจาก isoprene แล้ว *Bacillus* spp. ยังสร้างสารระเหย ethylene ซึ่งมีบทบาทยับยั้ง การพัฒนาอาการของโรคพืช และยังช่วยส่งเสริมให้ผลไม้สุกเร็วขึ้น (Ladygina *et al*., 2005) นอกจากนี้สุชล แก้วพรหม (2539)ได้ทำการศึกษาผลของสารระเหย ที่สร้างโดย *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Py. grisea*, *Rhynchosporium oryzae* และ *R. solani* พบว่าสารระเหยที่สร้างขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยเข้าไปขัดขวางขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ของเชื้อรา โดยทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต ยับยั้งการงอกของสปอร์ชั่วคราวเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และเกิดการบวมของสปอร์ซึ่งอาจเกิดจากการสะสมของสารระเหยภายในสปอร์ทำให้สปอร์ไม่สามารถงอกได้ตามปกติ

2.3 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Biological control หรือ biocontrol)

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าการควบคุมโดยชีววิธีเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการนำไปเป็นกลยุทธ์ป้องกันกำจัดโรค ได้มีการศึกษาทั้งในประเทศ และต่างประเทศมาเป็นเวลานานหลายปี (นิพนธ์ ทวีชัย, 2539) และมีการนำไปใช้อย่างได้ผลดีในขั้นทำเป็นการค้า (ตารางที่ 3) และจะมีบทบาทที่สำคัญมากในศตวรรษที่ 21 (Cook, 1993) ผลดีของการควบคุมแบบชีววิธี คือ ลดอันตรายจากการใช้สารเคมี และให้ผลการควบคุมระยะยาว แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีมักนิยมเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ หรือเชื้อปฏิปักษ์ (biological control agent, BCA)

ตารางที่ 3 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของบริษัทต่าง ๆ ที่ผลิตและจำหน่ายเพื่อใช้ควบคุมโรคพืช

ประเภทจุลินทรีย์ (ชื่อผลิตภัณฑ์)	โรคที่ควบคุม	ประเทศที่ผลิต (บริษัทที่ผลิต)
กลุ่มเชื้อแบคทีเรีย		
Agrobacteria radiobacter (Strain 84) (Galltrol-A)	โรคปุ่มปมของโคนต้นไม้และผล	สหรัฐอเมริกา (Ag Biochem)
B. subtilis (Kodiak)	โรคที่เกิดกับระบบราก	ออสเตรเลีย (Gustafson)
B. subtilis (Quantum 4000 HB)	โรคที่เกิดกับระบบราก	ออสเตรเลีย (Gustafson)
B. subtilis (Quantum 4000 P)	โรคที่เกิดกับระบบราก	ออสเตรเลีย (Gustafson)
Ps. fluorescens (Dagger G)	โรคในกล้าจากเชื้อ *Pythium* และ *Rhizoctonia*	สหรัฐอเมริกา (Ecogen)
Streptomyces griseoviridis	โรคที่เกิดจากเชื้อราหลายชนิด	ฟินแลนด์ (Kemira OY.)
กลุ่มเชื้อรา		
Chaetomium globosum	โรคเน่าระดับดินในผักกาดหวาน	สวิสเซอร์แลนด์
Ch. minitans	เชื้อ *Botrytis* และ *Sclerotinia*	เนเธอร์แลนด์
Gliocladium virens	โรคเน่าระดับดินในไม้ประดับ	สหรัฐอเมริกา จำหน่ายและผ่านการจดทะเบียนโดยองค์กรเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม (EPA) แล้ว
G. roseum	โรคเหี่ยวในมันฝรั่ง	สหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 2 (ต่อ) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของบริษัทต่าง ๆ ที่ผลิต และจำหน่ายเพื่อใช้ควบคุมโรคพืช

ประเภทจุลินทรีย์ (ชื่อผลิตภัณฑ์)	โรคที่ควบคุม	ประเทศที่ผลิต (บริษัทที่ผลิต)
Trichoderma tri-4	โรคเน่าระดับดินใน ไม้ประดับ	สหรัฐอเมริกา
T. harzianum	โรคเน่าในผักกาดหวาน	อิตาลี
T. harzianum	โรคเน่าในหอม	อียิปต์
T. harzianum และ *T. polysporum*	โรคพืชหลังเก็บเกี่ยว ในผักและผลไม้	สหรัฐอเมริกา

ที่มา: ดัดแปลงจาก เปรมปรีย์ ณ สงขลา (2537)

การใช้เชื้อแบคทีเรียควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราโดยชีววิธี

Baker และคณะ (1985) ได้ทำการศึกษาประยุกต์ใช้ *B. subtilis* เพื่อควบคุมโรคราสนิมของถั่วเหลืองโดยการพ่น *B. subtilis* 2 สายพันธุ์คือ PPL-3 และ APPL-1 จำนวน 3 ครั้ง/สัปดาห์ พบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคราสนิมในถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *U. appendiculatus* ได้ถึง 75 % โดย *B. subtilis* สายพันธุ์ PPL-3 ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช แต่ทำให้ผลผลิตของพืชลดลง สำหรับสายพันธุ์ APPL-1 ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช และจากการศึกษายังพบว่าในบางกรรมวิธีที่ใช้ *B. subtilis* นั้นมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้แมนโคเซ็บ 1 ครั้ง/สัปดาห์

Rytter และคณะ (1989) ทำการแยก *Bacillus* spp. จากใบเจอราเนียมที่ถูกราสนิมเข้าทำลายได้เชื้อจำนวน 12 สายพันธุ์ และได้นำมาทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Puccinia pelargonii-zonalis* สาเหตุโรคราสนิมของเจอราเนียมภายในห้องปฏิบัติการ และได้ประยุกต์ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ฉีดพ่นที่ใบก่อนทำการปลูกเชื้อราสนิม การทดลองพบว่า *B. subtilis* 3 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ และลดอัตราการเกิดตุ่มของราสนิมบนใบเจอราเนียมที่ทำการปลูกเชื้อในโรงเรือน โดยแสดงการยับยั้งภายหลัง 4 วัน หลังประยุกต์ใช้เชื้อปฏิปักษ์

สุชล แก้วพรหม (2539) ได้ทำการศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89 – 24 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Py. grisea* และ *Rhy. oryzae* ได้ โดยเกิดบริเวณยับยั้งขึ้นระหว่างเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และเชื้อราทั้งสอง ผลของฤทธิ์ต้านราแสดงให้ทราบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 สร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่งสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นมีคุณสมบัติในการละลายน้ำ โดยเชื้อจะปล่อยสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสภาวะที่ดีที่สุดในการสร้างสารปฏิชีวนะ คือการเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB เป็นเวลา 5 วัน และยังพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89 – 24 และ *B. subtilis* ทั่วไปยังสามารถผลิตสารชนิดระเหยออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อรา และยับยั้งการงอกของสปอร์ *Rhy. oryzae* และเม็ด sclerotium ของ *R. solani* โดยสารระเหยนี้จะผลิตได้มากที่สุดในอาหาร PDA

Montesinos และคณะ (1996) คัดเลือกสายพันธุ์ของ *Erwinia herbicola* และ *Ps. fluorescens* จำนวน 410 สายพันธุ์ จากส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน และจากรากของพืชหลาย ๆ ชนิด แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งการงอกโคนิเดียของ *Stemphylium vesicarium* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบจุดสีน้ำตาล โดยวิธี detached leaf การทดลองพบว่า 7 % ของสายพันธุ์ *E. herbicola* และ *Ps. fluorescens* เหล่านี้สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดีย และการเจริญของเส้นใย *St. vesicarium* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และพบว่า 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง สังเกตได้จากระดับความรุนแรงของโรคที่ลดลง และการยับยั้งการการงอกของโค-นิเดียบนผิวใบ และยังพบว่าเกือบทั้งหมดของสายพันธุ์ *Ps. fluorescens* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งนั้น สามารถสร้างสารเคมีที่ยับยั้งการงอกของโคนิเดีย และสารต่อต้านเชื้อราในอาหารแข็งและอาหารเหลว นอกจากนี้การทดลองพ่นด้วย *Ps. fluorescens* สายพันธุ์ EPS 288 ก่อนทำการปลูกเชื้อด้วยโคนิเดียของ *St. vesicarium* ลงบนต้นแพร์นั้น พบว่ามีระดับความรุนแรงของโรคต่ำกว่า 88 % เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว

Yoshida และคณะ (2000) คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากใบหม่อน และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Coll. Dematium* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของหม่อนพบว่า *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ RC - 2 ยับยั้ง *Coll. dematium* ได้ดีที่สุด เมื่อทำการทดสอบโดยพ่นน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* บนต้นหม่อน พบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ดี และยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชอื่น ๆได้หลายชนิด เช่น *Rosellinia necartrix, Py. oryzae, A. tumefaciens* และ *X. campestris* pv. *campestris*

Douglas และ Barry (2002) ทดลองนำสปอร์ของ *B. subtilis* มาใช้ควบคุมโรคใบจุดของซูการ์บีทที่เกิดจากเชื้อ *C. beticola* ในสภาพแปลง การทดลองพ่นสปอร์ *B. subtilis* ในอัตรา 1×10^6 cfu/ml หรือในอัตราที่สูงกว่าลงบนต้นซูการ์บีท พบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคลงได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม สำหรับการศึกษาในเรือนทดลองได้ประยุกต์ใช้เซลล์ของ *B. subtilis* แทนการใช้สปอร์ โดยประยุกต์ใช้เซลล์ของ *B. subtilis* 1- 5 วัน ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรค ผลการทดลองพบว่าการประยุกต์ใช้เซลล์ของ *B. subtilis* สามารถควบคุมโรคได้เพิ่มขึ้นจากกรรมวิธีควบคุม อย่างไรก็ตามการควบคุมโรคในสภาพแปลงนั้น พบว่าการใช้สปอร์ *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคดีกว่าการพ่นด้วยเซลล์ของ *B. subtilis* ทั้งนี้เนื่องจากสปอร์ช่วยส่งเสริมให้ *B. subtilis* ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีกว่าเซลล์

Okigbo และ Osuinde (2003) แยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ NCIB 3610 จากดินบริเวณใต้ต้นมะม่วงเพื่อนำมาทดสอบการยับยั้งโรคใบจุดของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Pestalotiopsis mangiferae*, *Lasiodiplodia theobromae (*syn. *Botryodiplodia theobromae*), *Macrophoma mangiferae* ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญในทางตอนใต้ของประเทศไนจีเรีย โดยทำการทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ NCIB 3610 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ 57, 61 และ 58 % ตามลำดับ

จิรัสสา มีกลิ่นหอม (2547) แยกเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนใบ และผลของพริกพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้อาหาร 4 ชนิด พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 210 ไอโซเลท ต่อมานำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Coll. gloeosporioides* และ *Coll. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสทั้ง 2 สปีชีส์ บนอาหาร PDA พบว่าแบคทีเรีย 24 ไอโซเลท สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้ จึงนำทุกไอโซเลทไปทดสอบการยับยั้งการเกิดแผลจาก *Coll. gloeosporioides* พบว่าแบคทีเรีย 9 ไอโซเลท สามารถลดขนาดของแผลได้ 38.34 - 76.67 % 4 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเกิดแผลจาก *Coll. capsici* และสามารถลดขนาดแผลลงได้ 53.05 - 81.31% และเมื่อนำแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ไปทดสอบในสภาพแปลงพบว่าเชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท คือ HGw 13, Lg1, DGg 13 และ HGw 25 สามารถควบคุมการเกิดโรคจาก *Coll. gloeosporioides* ได้ 33.50, 31.85, 28.34 และ 24.05 % ตามลำดับ และแบคทีเรียไอโซเลท DGg 13, HGw 25, HGw 13 และ Lgl ควบคุมการเกิดโรคจาก *Coll. capsici* ได้ 32.40, 22.27, 21.29 และ 16.33 % ตามลำดับ

Kishore และคณะ (2005) ทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อรา แบคทีเรีย *B. circulans* สายพันธุ์ GRS 243 และแบคทีเรีย *Serratia marcescens* สายพันธุ์ GPS5 ที่แยกได้จากพืชตระกูลถั่ว เพื่อนำมาใช้ป้องกันโรค Late Leaf Spot (LLS) ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *Phaeoisariopsis*

personata การทดลองใช้ *B. circulans* สายพันธุ์ GRS 243 แบคทีเรีย *Ser. marcescens* สายพันธุ์ GPS5 ร่วมกับสารคอลลอยด์ไคติน 1 % (w/v) ในเรือนทดลอง สามารถลดความเสียหายจากโรคลงได้ 60 % เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์แบคทีเรียเพียงอย่างเดียว และการทดสอบในสภาพแปลง พบว่าการใช้ไคตินร่วมกับ *B. circulans* สายพันธุ์ GRS 243 และการใช้ไคตินร่วมกับแบคทีเรีย *Ser. marcescens* สายพันธุ์ GPS5 เพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรค และยังทำให้จำนวนฝักของถั่วสิสงเพิ่มขึ้นเป็น 62 และ 75 % ตามลำดับ

การติดตามจำนวนประชากรจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

Liu และ Sinclair (1995) ได้นำ *B. megaterium* สายพันธุ์ ATCC 55000 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *R. solani* ที่เป็นสาเหตุของโรครากและโคนเน่าของถั่วเหลือง ภายในห้องปฏิบัติการ มาพัฒนาให้มีความต้านทานต่อ rifampicin เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ *B. megaterium* สายพันธุ์ ATCC 55000 ก่อนนำเชื้อ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *R. solani* ภายในสภาพแปลงทดลอง การทดลองแสดงให้เห็นว่า *B. megaterium* สายพันธุ์ ATCC 55000 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และสามารถเพิ่มจำนวนบริเวณรอบราก อีกทั้งยังส่งเสริมให้ผลผลิตถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น

วรรณวิไล อินทนู และคณะ (2548) ได้นำเชื้อ *B. amyloliquefaciens* จำนวน 4 ไอโซเลท คือ Lg1, HGw13, HGw25 และ DGg 13 ซึ่งแยกได้จากผลพริก และผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Coll. gloeosporioides* และ *Coll. capsici* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกแล้ว มาพัฒนาให้ต้านทานต่อ rifampicin 100 ppm โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร Nutrient Glucose Agar (NGA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยเข้มข้น 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วนำไปวางใต้หลอดกำเนิดแสง UV ให้มีระยะห่าง 15 เซนติเมตร ฉายแสง UV นาน 1 นาที จากนั้นจึงดูดเซลล์แขวนลอย 0.1 มิลลิลิตร นำไปเกลี่ยบนอาหาร NGA ซึ่งเติม rifampicin 100 ppm บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำโคโลนีเชื้อที่เจริญได้ไปเกลี่ยเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บไว้ใน NGA ที่เติม rifampicin 1 ppm เพื่อให้เชื้อมีความคงทนต่อการกลายพันธุ์

Bazzi และคณะ (2006) คัดเลือกแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณผิวของต้นแพร์จากสวนผลไม้ในประเทศอิตาลี เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. amylovora* สาเหตุโรค fire blight บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการคัดเลือกพบว่าเชื้อ *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ IPV-BO 4027C และ IPV-BO 4027D ที่สร้าง siderophore สามารถยับยั้ง *E. amylovora* และจากการทดลอง

ในห้องปฏิบัติการพบว่า *Pseudomonas* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถลดความรุนแรงของโรค fire blight ได้ 45 % ในขณะที่การใช้สารปฏิชีวนะ streptomycin สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ 92 % และเมื่อติดตามประชากรของเชื้อในห้องปฏิบัติการพบว่า *Pseudomonas* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มจำนวนประชาการได้บนดอกแอปเปิ้ล และดอกแพร์ อีกทั้งยังสามารถลดจำนวนประชากรของ *E. amylovora* บนดอกแอปเปิ้ลได้ ต่อมาจึงได้นำเชื้อ *Pseudomonas* spp. 2 สายพันธุ์มาพัฒนาให้ต้านทาน rifampicin เพื่อใช้ในการติดตามการมีชีวิตรอดของเชื้อบนดอกแอปเปิ้ล ในสภาพแปลงทดลอง จากการตรวจนับประชากร *Pseudomonas* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์โดยนำใบของแอปเปิ้ล และใบแพร์มาแปะทับลงบนอาหารจำเพาะบ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน แล้วนับโคโลนีที่ปรากฏบนจานอาหาร (LB-agar ที่มีส่วนผสมของ rifampicin 20 μg/ml) พบว่า *Pseudomonas* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถมีชีวิตรอด แต่มีจำนวนประชากรลดลง โดยประชากรของ 4027D Rif^r มีจำนวนต่ำกว่า 4027C Rif^r (ประมาณ 10^3 และ 10^4 cfu/flower)

3. กลไกการควบคุมโรคของเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชมี 4 ลักษณะดังนี้

3.1 การแข่งขัน (competition) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่าง ๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโต หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ พืชจะเจริญเติบโตแข็งแรง มีผลผลิตสูงขึ้น การแข่งขันที่พบมากคือเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์นำเอาธาตุอาหารหรือสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในดินหรือในสภาพแวดล้อมนั้นมาใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโต ทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชขาดสารอาหารไม่สามารถเจริญเติบโตและเข้าทำลายพืช เช่น เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Ps. fluorescens* จะผลิตสาร siderophore ที่ช่วยในการจับยึดธาตุเหล็ก (Iron, Fe^{+3}) ในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* สาเหตุโรค take – all ของข้าวสาลี ช่วยให้ข้าวสาลีเจริญเป็นปกติ ให้ผลผลิตดีขึ้น จึงนิยมเรียกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีลักษณะแบบนี้ว่าแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) โดยแบคทีเรียพวกนี้ชอบอาศัยอยู่ในดินบริเวณผิวราก (rhizoplane) หรือบริเวณรอบราก

3.2 การทำลายชีวิต (antibiosis) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจคัดเลือกมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้นจะเน้นคุณสมบัติการทำลายชีวิตของเชื้อโรคเป็นส่วนใหญ่ และนับว่าเป็นกลไกชนิดแรกที่มีการศึกษานำมาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยเชื้อปฏิปักษ์นี้มีความสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่นำมาผลิตใช้เป็นยารักษาโรคกับมนุษย์ สัตว์ และพืชมากมายในปัจจุบัน การควบคุมโรคพืชจากแบคทีเรียโดยชีววิธีที่สำเร็จเป็นครั้งแรก

เป็นกลไกที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *A. radiobacter* สายพันธุ์ K84 ผลิตสารปฏิชีวนะ bacteriocin ซึ่งภายหลังตั้งชื่อว่า Agrocin 84 ไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *A. tumefaciens* biotype 1 และ 2 สาเหตุโรคปุ่มปม (crown gall) ของพืช (Thomson, 1987) หรือในกรณีของการใช้ *Ps. fluorescens* สายพันธุ์ 2-79 ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ phasing -1- carboxylate สามารถยับยั้งการเกิดโรค take-all ของข้าวสาลีได้ถึง 50-90 % (Cook *et al*., 1995)

3.3 การเป็นปรสิต (parasitism) เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต เข้าไปเจริญอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบได้มาก ได้แก่ *Erwinia urediniolytica* เข้าทำลาย pedicel ของราสนิม *Bdellovibrio bacteriovorus* เป็นปรสิตของเชื้อแบคทีเรีย *Ps. syringae* pv. *glycinea* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วเหลือง หรือเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* (Syn. *Bacillus penetrans*) ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม (Cook and Baker, 1983) แบคทีเรียเหล่านี้ ยังไม่ได้รับความสนใจศึกษาปรับปรุงให้เกิดประโยชน์อย่างจริงจัง จึงนับว่าเป็นสิ่งหนึ่งที่น่าศึกษาพัฒนานำมาใช้ในการควบคุมโรคต่อไป

3.4 การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) เป็นกลไกที่ปัจจุบันกำลังได้รับความสนใจศึกษากันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อรา หรือแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่เคยเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคไปแล้ว สามารถชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทาน ต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น การกลายพันธุ์ในยีนเดี่ยวของเชื้อรา *Coll. magna* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพวกแตง (cucurbit) จะไม่ทำให้เกิดโรค แต่เชื้อจะเจริญอยู่ในพืช ช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคเดิม ได้หรือในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรง (avirulent) ที่มีชีวิตอยู่สามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine ปลดปล่อยออกมาที่บริเวณรากทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Ral. solanacearum* สายพันธุ์เดิมได้ (Arwiyanto *et al*., 1994)

การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ควบคุมโรคโดยชีววิธีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ช่วยลดการใช้สารเคมี และอันตรายจากสารเคมีต่อมนุษย์ และสิ่งแวดล้อม จากข้อมูลการศึกษาดังกล่าวจึงเห็นได้ว่า *Bacillus* spp. มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เนื่องจากสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ดำรงชีวิตได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตเนื่องจากสามารถสร้างเอนโดสปอร์ ไม่ก่ออันตรายต่อมนุษย์ และสิ่งแวดล้อม อีกทั้งง่ายต่อการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ในการควบคุมโรคพืช

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่สามารถควบคุมโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อราของถั่วฝักยาวโดยชีววิธี
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทางใบของ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ในสภาพแปลงปลูก

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. ใบถั่วฝักยาว และดินจากแปลงถั่วฝักยาว
2. อาหาร NA, NB, NGA สำหรับใช้เลี้ยงแบคทีเรีย และอาหาร motility medium, Hugh and Leifson's OF medium, nutrient gelatin, Simmons'citrate agar, VP medium Christensen's urea agar slant, starch agar, 0.1% peptone broth สำหรับใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย
3. KOH
4. นิโกรซิน (nigrosin)
5. พาราฟีน ออย (parafin oil)
6. แอลฟา แนพทอล (alpha napthol)
7. ยูเรีย (urea)
8. ฟีนอล เรด (phenol red)
9. ลูกอล ไอโอดีน (lugol's iodine)
10. โคแวค (kovac)
11. ไรแฟมพิซิน (rifampicin)
12. มาลาไคท์ กรีน (malachite green)
13. ซาฟลานิน (safranin)
14. คริสตัล ไวโอเลท (crystal violet)
15. แลคโตฟีนอล คอททอล บลู (lactophenol cotton blue)
16. ใบถั่วฝักยาวที่เป็นโรคใบจุด ราสนิม และราแป้ง
17. เมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวพันธุ์เขียวดก
18. สารคลอโรทาโลนิล (chlorothalonyl)
19. ปุ๋ยคอก
20. ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15
21. ออสโมโคท (osmocote) สูตร 13-26-7+1.5 แมกนีเซียม

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้วและวัสดุอื่น ๆ ได้แก่ จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) หลอดเลี้ยงเชื้อ (tube) หลอดสำหรับปั่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร (eppendorf) สไลด์หลุม (depression slide) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) บีกเกอร์ (beaker) กระบอกตวงวัดปริมาตร (volumetric cylinder) ลูป (loop) กระดาษกรอง (membrane filter) และอื่น ๆ
2. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
3. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
4. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow)
5. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)
6. กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)
7. กล้องถ่ายรูป (camera)
8. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)
9. กล่องชื้น (moisture chamber)
10. เครื่องเขย่าผสม (vortex)
11. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
12. เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (orbital shaker)
13. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20 ไมโครลิตร และขนาด 1 มิลลิลิตร
14. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
15. อุปกรณ์ฉีดพ่น (foggy sprayer)
16. ไมโครเวฟ (microwave)
17. เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (analytical balance)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างใบ และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวเพื่อนำมาใช้แยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

เก็บตัวอย่างใบ และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวในพื้นที่จังหวัดทางภาคใต้ ได้แก่ สงขลา ตรัง กระบี่ พัทลุง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และชุมพร ในเดือนพฤศจิกายน 2549 โดยเลือกเก็บใบถั่วฝักยาวปกติไม่แสดงอาการเป็นโรค หรือที่แสดงอาการโรคเล็กน้อย บรรจุตัวอย่างลงในถุงพลาสติกใช้ยางรัดปิดปากถุงบันทึกวันที่ สถานที่เก็บ ใส่กล่องพลาสติกเพื่อนำไปแยกเชื้อต่อไป ส่วนการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาว กระทำโดยใช้ช้อนปลูกตักดินซึ่งอยู่ห่างจากโคนต้นถั่วฝักยาวประมาณ 3 นิ้ว และลึกจากผิวหน้าดินประมาณ 1.5 นิ้ว ใช้ช้อนปลูกตักดินประมาณ 5 กรัม บรรจุลงในถุงพลาสติกใช้ยางรัดปิดปากถุง บันทึกวันที่ สถานที่เก็บ ใส่กล่องพลาสติกเพื่อนำไปแยกเชื้อต่อไป การสุ่มเก็บตัวอย่างใบถั่วฝักยาว และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวโดยสุ่มเก็บแปลงละ 3 จุด

2. การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จากใบ และดินในแปลงปลูกถั่วฝักยาว

นำตัวอย่างใบ และดินที่เก็บจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวมาแยกเชื้อโดยวิธี dilution spread plate สำหรับการแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จากใบถั่วฝักยาวกระทำโดยนำตัวอย่างใบถั่วฝักยาวน้ำหนัก 1 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 3-5 มิลลิเมตร นำตัวอย่างใบที่หั่นแล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำตัวอย่างดังกล่าวมาเขย่าด้วย เครื่องเขย่าผสม (vortex) นาน 3 นาที เพื่อแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ออกจากผิวใบของถั่วฝักยาว เช่นเดียวกัน จากตัวอย่างดินโดยใช้ดินน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำตัวอย่างดังกล่าวมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสมนาน 3 นาที หลังจากเขย่าแล้วจะได้น้ำแบคทีเรียแขวนลอย เจือจางน้ำแบคทีเรียแขวนลอยแบบลำดับขั้นให้ได้ระดับความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-3} นำน้ำแบคทีเรียแขวนลอยที่ได้ไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 °C นาน 30 นาที เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ทนความร้อน และลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ใช้ไมโครปิเปต (micropipette) ดูดน้ำแบคทีเรียแขวนลอยปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงในจานอาหาร nutrient agar (NA) เกลี่ยผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C) เป็นเวลา 3 วัน

เมื่อครบ 3 วัน ให้นำจานอาหารดังกล่าวมาเลือกเก็บโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะเป็นสีขาว สีครีม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1- 2 มิลลิเมตร ย้ายลงในอาหาร NA slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำแบคทีเรียดังกล่าวมาตรวจสอบปฏิกิริยาแกรม และการสร้างเอนโดสปอร์ต่อไป

ตรวจสอบปฏิกิริยาแกรม (Ryu, 1938) เพื่อคัดแบคทีเรียแกรมลบทิ้ง โดยมีขั้นตอน คือหยด KOH ความเข้มข้น 3 % ลงบนสไลด์ 1 หยด แตะเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ที่อยู่ใน NA slant ปริมาณ 1 ลูป แตะลงบน KOH ความเข้มข้น 3 % ใช้ลูป (loop) คนให้เข้ากัน แล้วยกลูปขึ้น หากเชื้อไม่เหนียวติดลูปแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกให้นำมาทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนโดสปอร์ต่อ

ตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์โดยนำเชื้อที่ผ่านการทดสอบแกรมแล้วว่าเป็นแกรมบวก มาตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์โดยหยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนสไลด์ ใช้ลูปแตะเชื้อแล้วคนให้เข้ากันทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นหยด 5.0 % (w/v) aq. มาลาไคท์ กรีน (malachite green) ให้ท่วม นำไปอังบนไอน้ำเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำไหลปล่อยให้แห้ง จากนั้นย้อมทับด้วย 0.5 % (w/v) aq. ซาฟลานิน (safranin) เป็นเวลา 15 วินาที ล้างโดยผ่านน้ำ ซับให้แห้งตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) ที่กำลังขยาย 40 เท่า หากแบคทีเรียมีการสร้างเอนโด-สปอร์จะติดสีเขียว และหากเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีการสร้างเอนโดสปอร์แล้วให้คัดทิ้ง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคทางใบของถั่วฝักยาว

3.1 เตรียมน้ำสปอร์แขวนลอยของเชื้อสาเหตุโรค

เก็บใบถั่วฝักยาวที่เป็นโรคใบจุด และโรคราสนิม ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น เพื่อกำจัดสปอร์ที่เชื้อสร้างในธรรมชาติ จากนั้นนำไปบ่มในกล่องชื้น (moisture chamber) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สปอร์ที่สร้างขึ้นมาใหม่จะมีอายุเท่ากันสำหรับการทดสอบ แล้วจึงนำใบถั่วฝักยาวมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บน้ำสปอร์แขวนลอยมาใช้ทดสอบต่อไป ส่วนราแป้งนำใบที่มีโรคมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อโดยไม่ต้องบ่ม เนื่องจากสภาพอากาศที่ชื้นจะไม่เหมาะต่อการเจริญของราแป้ง เก็บน้ำสปอร์แขวนลอยของทุกโรคมานับจำนวนด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) และปรับความเข้มข้นให้มีความเข้มข้น 1 x 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

3.2 เตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

เขี่ยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร NA slant เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเชื้ออายุครบ 24 ชั่วโมง ให้ใช้ลูปแตะเชื้อจากหลอดอาหาร NA slant ปริมาณ 1 ลูป ย้ายลงไปเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (orbital shaker) ด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ให้ใช้ไมโครปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ย้ายลงในหลอดสำหรับปั่น 1.5 มิลลิลิตร (eppendorf) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

ที่ความเร็ว 10,000 g นาน 20 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (membrane filter) ซึ่งมีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร อีกครั้งเพื่อแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ตกค้างในน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสออกให้หมด

3.3 ทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์

หยดน้ำสปอร์แขวนลอยเชื้อราสาเหตุโรคที่มีความเข้มข้น 1 x 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และน้ำเลี้ยง *Bacillus* spp. ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์หลุม (depression slide) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C) ทดสอบทุกไอโซเลท ไอโซเลทละ 5 ซ้ำ ตรวจนับการงอกของสปอร์ทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์โดยสุ่มนับจำนวนสปอร์เชื้อรา 5 ซ้ำ ซ้ำละ 100 สปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์โดยทำการวัดความยาวของ germ tube นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการงอกจากสูตร (Surrender *et al*., 1987 อ้างโดย เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และ วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล, 2543)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ = 100 - [A/B] x 100

A = เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์กรรมวิธีทดสอบ

B = เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์กรรมวิธีควบคุม

เกณฑ์การงอก คือ สปอร์ที่งอก germ tube มีความยาวเกินครึ่งหนึ่งของความกว้างสปอร์

ตรวจสอบความผิดปกติของ germ tube ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกำลังขยาย 100 เท่า บันทึกภาพและลักษณะของ germ tube

3.4 คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค

คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อราทั้ง 3 ชนิด คือ *C. cruenta U. vignae* และ *Oidium* sp. เหลือ 2 ไอโซเลท โดยเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ หรือทำให้สปอร์เชื้อราสาเหตุเจริญได้น้อยลง

4. การทดสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

ทดสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. โดยอาศัยคู่มือของ Macfaddin (1980) และ Schaad และคณะ (2001) ดังแสดงในภาคผนวก (หน้า 68-70) สำหรับการทดสอบมีดังนี้ คือ การย้อมแกรม (gram stain) การย้อมแคปซูล (capsule stain) ความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility test) การเจริญแบบต้องการและไม่ต้องการ

ออกซิเจน (oxidation-fermentation test) การสร้างสารอินโดล (indole) การย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction) การใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน (citrate test) การสร้าง acetoin (VP test) การสร้างเอนไซม์ urease (urease production) การสร้างกรดและแก๊สจากคาร์โบไฮเดรต (acid and gas production carbohydrates) การเจริญใน 7.5 % NaCl (growth in 7.5 % NaCl) ความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

5. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ให้ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ rifampicin

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ rifampicin โดยนำ *Bacillus* spp. มาเลี้ยงในอาหาร nutrient glucose agar (NGA) ที่ผสม ยาปฏิชีวนะ rifampicin ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 70, 80, 90 และ 100 ppm ตามลำดับ นำ *Bacillus* spp. ที่กลายพันธุ์ให้ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm มาทดสอบความคงทนต่อการต้านทานยาปฏิชีวนะ rifampicin จำนวน 10 รุ่น (generation) โดยการใช้ลูปแตะเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ rifampicin แล้ว ขีดลงบนจานอาหาร NGA ที่ผสมยาปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm จำนวน 10 รุ่น หลังทดสอบครบ 10 รุ่น นำ *Bacillus* spp. ดังกล่าวย้ายเก็บในอาหาร NGA slant ผสมยาปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm เพื่อนำมาทดสอบในสภาพแปลงต่อไป

6. การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อกันของแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในจานอาหาร NGA โดยใช้ลูปแตะเชื้อแล้วนำมาขีดลงบนจานอาหารให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูปขูด *Bacillus* spp. บริเวณผิวหน้าอาหาร นำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไปละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปรับความเข้มข้นด้วย Mc Farland Standard เบอร์ 0.5 ให้ได้ความเข้มข้น 1.5 x 10^8 cfu/ml ใช้ก้านสำลีจุ่มในน้ำแบคทีเรียแขวนลอยไอโซเลทที่ 1 ทาต่อเนื่องบนผิวอาหาร NGA ที่เตรียมไว้ จากนั้นนำกระดาษกรองที่เจาะเป็นวงกลมซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 4 อัน วางเป็นรูปสี่เหลี่ยมบนอาหารวุ้นที่ทาน้ำแบคทีเรียแขวนลอยไอโซเลทที่ 1 ไว้แล้ว ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำแบคทีเรียแขวนลอยไอโซเลทที่ 2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษกรองที่วางไว้ ทำการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีข้างต้นโดยใช้น้ำแบคทีเรียแขวนลอยไอโซเลทที่ 2 ทาลงบนผิวหน้าอาหาร และใช้น้ำแบคทีเรียแขวนลอยไอโซเลทที่ 1 หยดลงบนกระดาษกรอง นำจานอาหารดังกล่าวบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองโดยวัดความกว้างของส่วนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

7. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อการควบคุมโรคทางใบของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อราในเรือนทดลอง

ดำเนินการทดลองในช่วงเดือนมิถุนายน 2550 – สิงหาคม 2550

7.1 เตรียมต้นถั่วฝักยาว

นำเมล็ดถั่วฝักยาวพันธุ์เขียวดกปลูกลงในถุงดำที่มีขนาด 8 × 16 นิ้ว ซึ่งบรรจุดินผสมปุ๋ยคอกในอัตราส่วน 3 : 1 ถุงละ 4 เมล็ด เมื่อถั่วฝักยาวอายุครบ 7 วัน หลังการปลูกทำการถอนแยกให้เหลือ 2 ต้น/ถุง ปักค้าง และใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ประมาณถุงละ 1 ช้อนชา เมื่อต้นถั่วอายุ 15 วัน และ 30 วัน ต้นถั่วฝักยาวจะเริ่มออกดอกใส่ปุ๋ยออสโมโคท (osmocote) สูตร 13-26-7+1.5 แมกนีเซียม 1 ช้อนโต๊ะ เพื่อบำรุงดอก

7.2 เตรียมน้ำแบคทีเรียแขวนลอย

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในจานอาหาร NGA โดยใช้ลูปแตะเชื้อแล้วนำมาขีดลงบนจานอาหารให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูปขูด *Bacillus* spp. บริเวณผิวหน้าอาหารนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไปละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปรับความเข้มข้นด้วย Mc Farland Standard เบอร์ 0.5 ให้ได้ความเข้มข้น 1.5 x 10^8 cfu/ml เพิ่มประสิทธิภาพการจับใบโดยการเติมสารจับใบ (tween 80) 0.04 %

7.3 เตรียมน้ำสปอร์แขวนลอยของเชื้อสาเหตุโรค

เตรียมน้ำสปอร์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิด เพื่อการปลูกเชื้อ เนื่องจาก *C. cruenta* ไม่สร้างสปอร์ หรือสร้างสปอร์ได้น้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนราสนิม และราแป้งไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จึงกระทำโดยเก็บใบถั่วฝักยาวที่แสดงอาการเป็นโรคใบจุด ราสนิม ราแป้ง นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นับสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และปรับให้มีระดับความเข้มข้น 1 x 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เพิ่มประสิทธิภาพการจับใบโดยการเติมสารจับใบ 0.04 %

7.4 การพ่นน้ำแบคทีเรียแขวนลอย

เริ่มพ่นน้ำแบคทีเรียแขวนลอยลงบนต้นถั่วฝักยาวเมื่อต้นถั่วมีอายุครบ 3 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะก่อนการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคทางใบ โดยใช้น้ำแบคทีเรียแขวนลอยปริมาตร 30 มิลลิลิตร/ต้น พ่นลงบนต้นถั่วฝักยาวให้ทั่วทุกใบ พ่นซ้ำทุก ๆ 7 วัน จนต้นถั่วอายุครบ 70 วัน จึงหยุดพ่น วางแผนการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วย 8 ถุง ในแต่ละกรรมวิธีพ่นด้วย

1. *Bacillus* sp. ไอโซเลทที่ 1 ที่ความเข้มข้น 1.5 x 10^8 cfu/ml
2. *Bacillus* sp. ไอโซเลทที่ 2 ที่ความเข้มข้น 1.5 x 10^8 cfu/ml
3. ผสม *Bacillus* sp. ไอโซเลทที่ 1 และไอโซเลทที่ 2 ไอโซเลทละ 1.5 x 10^8 cfu/ml
4. สารคลอโรทาโลนิลที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm
5. กรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่น)

7.5 การปลูกเชื้อราสาเหตุโรคทางใบของถั่วฝักยาว

นำน้ำสปอร์แขวนลอยเชื้อราสาเหตุโรคทางใบที่เตรียมไว้พ่นลงบนต้นถั่วฝักยาวให้ทั่วทุกใบของต้นถั่วฝักยาว โดยพ่นหลังจากพ่นน้ำแบคทีเรียแขวนลอยหรือสารคลอโรทาโลนิลแล้ว 24 ชั่วโมง

7.6 การประเมินความรุนแรงของโรค

ประเมินความรุนแรงของโรคหลังพ่นน้ำแบคทีเรียแขวนลอยทุก 7 วัน และประเมินโรคซ้ำทุก ๆ 7 วัน จนต้นถั่วอายุครบ 80 วัน ทำการประเมินโรคด้วยวิธี descriptive area (ปริศนา วงค์ล้อม, 2548) รวมทั้ง 3 โรค กับส่วนใบทั้งต้น โดยมีระดับคะแนน 0 - 5 ดังนี้

0 = ไม่เกิดโรค
1 = เกิดโรค 0-20 % ของพื้นที่ใบ
2 = เกิดโรค 20-40 % ของพื้นที่ใบ
3 = เกิดโรค 40-60 % ของพื้นที่ใบ
4 = เกิดโรค 60-80 % ของพื้นที่ใบ มีสีเหลืองและร่วง ประมาณ 25 % ของความยาวต้นทั้งหมด
5 = เกิดโรค 80- 100 % ของพื้นที่ใบ ใบกลายเป็นสีเหลือง และหลุดร่วง ประมาณ 50 % ของความยาวต้นทั้งหมด

นำคะแนนความรุนแรงของโรคมาคำนวณค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) เวอร์ชัน 14

8. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อการควบคุมโรคทางใบของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อรานอกเรือนทดลอง

กระทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 7 แต่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคทางใบลงบนต้นถั่วฝักยาว ดำเนินการในช่วงเดือนสิงหาคม 2550 - ตุลาคม 2550

9. การตรวจนับโคโลนีแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตรอดบนใบถั่วฝักยาว

ตรวจนับโคโลนีแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีชีวิตรอดบนใบถั่วฝักยาวติดต่อกันเป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยเก็บใบถั่วฝักยาวใน 4 กรรมวิธีทดลองคือ กรรมวิธีพ่นด้วย *Bacillus* sp. ไอโซเลทที่ 1 กรรมวิธีพ่นด้วย *Bacillus* sp. ไอโซเลทที่ 2 กรรมวิธีพ่นด้วย *Bacillus* sp. ไอโซเลทที่ 1 ผสมกับไอโซเลทที่ 2 และกรรมวิธีควบคุม สุ่มเก็บใบถั่วฝักยาวกรรมวิธีละ 3 ต้น ต้นละ 1 ใบ เลือกเก็บใบที่ 4 นับจากโคนต้น โดยเก็บหลังการพ่นน้ำแบคทีเรียแขวนลอย 7 วัน ก่อนที่จะพ่นน้ำแบคทีเรียแขวนลอยในครั้งต่อไป นำใบถั่วฝักยาวที่สุ่มเก็บมาแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. โดยนำใบถั่วฝักยาวหนัก 1 กรัม มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ใส่ในหลอดที่บรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสมเพื่อแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ติดอยู่บริเวณผิวของใบถั่วฝักยาว เมื่อได้น้ำแบคทีเรียแขวนลอย *Bacillus* spp. แล้วนำไปเจือจางจนถึงระดับ 10^{-1}- 10^{-2} ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำแบคทีเรียแขวนลอยปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหาร NGA ที่ผสม rifampicin 100 ppm เกลี่ยน้ำแบคทีเรียแขวนลอยให้ทั่วจานอาหาร ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C) เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตรอด มาคำนวณค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างใบ และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวเพื่อนำมาใช้แยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

จากการเก็บตัวอย่างใบ และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวใน 7 จังหวัด ทางภาคใต้ของประเทศไทย ในเดือนพฤศจิกายน 2549 เก็บรวบรวมตัวอย่างได้ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 จำนวนตัวอย่างใบ และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวในจังหวัดทางภาคใต้

สถานที่เก็บ	จำนวนตัวอย่าง
จ. กระบี่	
อ. เขาพนม	2
จ. ชุมพร	
อ. ปะทิว	4
อ. ทุ่งตะโก	4
อ. ท่าแซะ	2
อ. สวี	2
อ. เมือง	2
จ. ตรัง	
อ. ย่านตาขาว	6
จ. นครศรีธรรมราช	
อ. พระพรหม	4
อ. ร่อนพิบูลย์	2
อ. หัวไทร	3
อ. พรหมคีรี	2
จ. พัทลุง	
อ. เมือง	2

ตารางที่ 4 (ต่อ) จำนวนตัวอย่างใบ และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวในจังหวัดทางภาคใต้

สถานที่เก็บ	จำนวนตัวอย่าง
อ. ลำปำ	2
จ. สงขลา	
อ. ควนเนียง	4
อ. ระโนด	2
อ. หาดใหญ่	4
จ. สุราษฎร์ธานี	
อ. เมือง	2
อ. ท่าชนะ	2
อ. เวียงสระ	2
รวม	**53**

2. การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จากใบ และดินในแปลงปลูกถั่วฝักยาว

สามารถแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างใบ และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวได้ทั้งหมด 559 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่มีสีขาวขุ่น สีครีม สีเหลือง ผิวหน้าโคโลนีกลมนูน ไม่เรียบ ผิวด้าน รูปร่างของขอบโคโลนีมีทั้งขอบเรียบ ไม่เรียบ และรูปร่างไม่แน่นอน เมื่อนำมาตรวจสอบปฏิกิริยาแกรมด้วย KOH ความเข้มข้น 3 % พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 503 ไอโซเลท (ตารางที่ 5) ที่แสดงปฏิกิริยาแกรมบวกคือไม่เหนียวติดลูป จึงนำมาตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์ พบว่าแบคทีเรียสร้างเอนโดสปอร์ โดยเมื่อย้อมด้วยมาลาไคท์กรีนแล้วติดสีเขียว

ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากใบ และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวในจังหวัดทางภาคใต้

สถานที่เก็บ	ส่วนที่แยก		จำนวนไอโซเลท	รหัสไอโซเลท
	ใบ	ดิน		
จ. กระบี่				
อ. เขาพนม	/		15	KP-KB-281-295
		/	45	KP-KB-356-379,417-437
จ. ชุมพร				
อ. ปะทิว	/		6	PC-CP-124-129
		/	9	PC-CP-251-259
อ. ทุ่งตะโก		/	6	TTK-CP-176-180,306
อ. ท่าแซะ	/		9	TZ-CP-90-98
		/	23	TZ-CP-333-355
อ. สวี	/		9	SW-CP-1-9
		/	12	SW-CP-58-62,166-170, 323,329
อ. เมือง	/		9	M-CP-63,67,171-175 248,250
		/	11	M-CP-136-145,153
จ. ตรัง				
อ. ย่านตาขาว	/		11	YTK-T-406-416
		/	34	YTK-T-464-497
จ. นครศรีธรรมราช	/		23	PP-NK-380-395,399-405
อ. พระพรหม		/	4	PP-NK-65,69,397,398

ตารางที่ 5 (ต่อ) จำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากใบถั่วฝักยาว และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวในจังหวัดทางภาคใต้

สถานที่เก็บ	ส่วนที่แยก		จำนวนไอโซเลท	รหัสไอโซเลท
	ใบ	ดิน		
อ. ร่อนพิบูลย์	/		12	RPB-NK-39-50
		/	7	RPB-NK-146-152
อ. หัวไทร	/		30	HT-NK-181-210
		/	26	HT-NK-438-463
อ. พรหมคีรี	/		10	PKR-NK-99-108
จ. พัทลุง				
อ. เมือง	/		5	M-PL-33-34,155-160
		/	8	M-PL-35,38,330-332
อ. ลำปำ	/		2	LP-PL-239,161
จ. สงขลา				
อ. ควนเนียง	/		11	KN-SK-72,86-89,165,301-305
		/	18	KN-SK-51-57,64,66,68,73-75,296-300
อ. ระโนด	/		2	RN-SK-237,249
		/	6	RN-SK-130-135
อ. หาดใหญ่	/		44	HY-SK-31,32,36,37, 76-85,154,211-236,307,308, 396

ตารางที่ 5 (ต่อ) จำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากใบถั่วฝักยาว และดินจาก

แปลงปลูกถั่วฝักยาวในจังหวัดทางภาคใต้

สถานที่เก็บ	ส่วนที่แยก		จำนวนไอโซเลท	รหัสไอโซเลท
	ใบ	ดิน		
จ. สุราษฎร์ธานี				
อ. เมือง	/		10	M-SU-238,272-280
อ. ท่าชนะ	/		39	TC-SU-109-118,120-124,309-332
		/	27	TC-SU-10-30,70,71,119, 162-164
อ. เวียงสระ	/		8	WS-SU-240-247
		/	12	WS-SU-260-271
รวม			**503**	

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคทางใบของถั่วฝักยาว

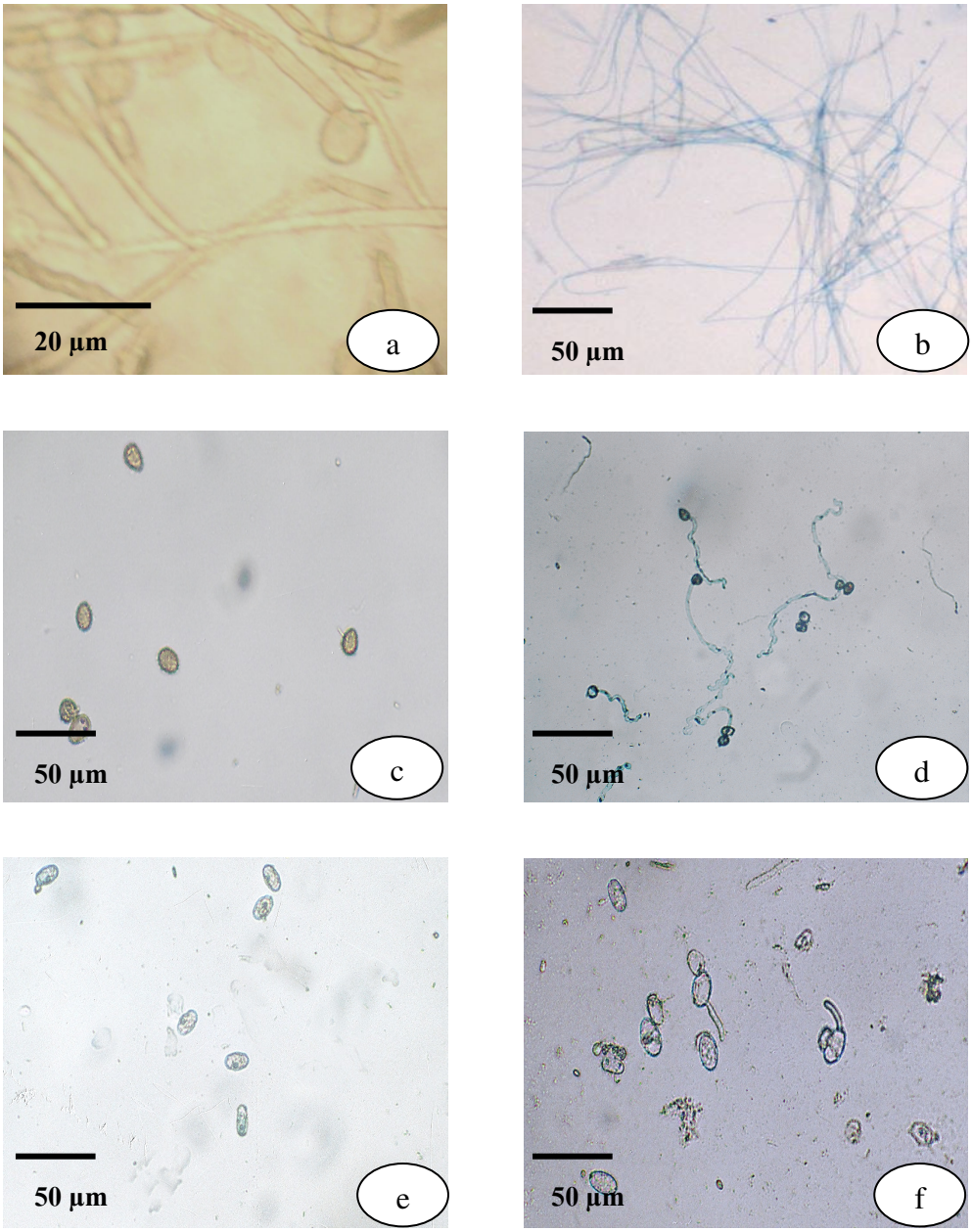
การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 503 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบ และดินในแปลงปลูกถั่วฝักยาวต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคทางใบถั่วฝักยาว 3 ชนิด คือ *C. cruenta U. vignae* และ *Oidium* sp. ผลการทดลองพบว่า *Bacillus* spp. จำนวน 167 ไอโซเลท จาก 503 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *U. vignae* สูงกว่า 70 % จึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. cruenta* พบว่า *Bacillus* spp. จำนวน 54 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. cruenta* สูงกว่า 70 % และเมื่อนำ *Bacillus* spp. ดังกล่าว มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Oidium* sp. ผลการทดสอบประสิทธิภาพพบว่า *Bacillus* spp. จำนวน 18 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคทางใบทั้ง 3 ชนิด สูงกว่า 70 % (ตารางที่ 6) โดยทำให้สปอร์ของเชื้อรา *C. cruenta* บวมโป่ง ไม่งอก (ภาพที่ 1a) และทำให้สปอร์ของเชื้อรา *U. vignae* และ *Oidium* sp. ไม่สามารถงอกได้ตามปกติ (ภาพที่ 1c และ 1e) ส่วนที่เหลืออีก 485 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์ต่ำกว่า 70 % (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

สำหรับในกรรมวิธีควบคุมนั้นสปอร์ของเชื้อรางอกตามปกติ (ภาพที่ 1b, 1d และ 1f) และเริ่มงอกที่ 3 ชั่วโมง หลังการบ่มในกล่องชื้น

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ไอโซเลทต่าง ๆ ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Cercospora cruenta Uromyces vignae* และ *Oidium* sp. บนสไลด์หลุมนาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C)

Bacillus spp. ไอโซเลท	* % การยับยั้งการงอกของสปอร์ราโดยน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* spp.		
	C. cruenta	*U. vignae*	*Oidium* sp.
HY-SK-81	98.5	98.0	90.5
TZ-SP-93	97.4	91.0	95.0
TC-SU-120	100.0	100.0	94.1
HT-NK-191	97.6	97.0	91.2
HY-SK-211	100.0	90.0	99.0
KP-KB-281	90.4	97.0	96.3
TC-SU-313	88.9	93.0	94.6
TZ-CP-342	**100.0**	**100.0**	**100.0**
PP-NK-402	98.7	97.0	94.9
HT-NK-440	98.4	100.0	98.1
HT-NK-452	91.1	92.0	96.7
HT-NK-460	**97.2**	**100.0**	**100.0**
YTK-T-475	97.0	100.0	97.0
YTK-T-484	74.3	89.0	90.0
YTK-T-492	100.0	94.0	96.2
YTK-T-494	85.0	95.0	91.8
YTK-T-496	95.2	100.0	93.3
YTK-T-497	97.1	100.0	96.7
สารคลอโรทาโลนิล	100.0	100.0	100.0
กรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่น)	0.0	0.0	27.2

* % การยับยั้งการงอกของสปอร์รา = $100 - \frac{\%\ \text{การงอกของสปอร์กรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\%\ \text{การงอกของสปอร์กรรมวิธีควบคุม}}$



ภาพที่ 1 การงอกของสปอร์เชื้อรา นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C)
ในน้ำเลี้ยง *Bacillus* spp. ในน้ำกลั่น

(a) *Cercospora cruenta* (400 เท่า) (b) *Cercospora cruenta* (100 เท่า)

(c) *Uromyces vignae* (100 เท่า) (d) *Uromyces vignae* (100 เท่า)

(e) *Oidium* sp. (100 เท่า) (f) *Oidium* sp. (100 เท่า)

4. การทดสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

Bacillus spp. ไอโซเลท HT-NK-460 และ TZ-CP-342 สามารถยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *C. cruenta U. vignae* และ *Oidiun* sp. ได้สูงถึง 97.2 – 100 % จึงนำมาทดสอบลักษณะทางวิธีจุลชีววิทยา ได้แก่ การย้อมแกรม การย้อมแคปซูล การเจริญใน 7.5% NaCl และทดสอบคุณสมบัติชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ การเจริญแบบต้องการและไม่ต้องการออกซิเจน การสร้างสารอินโดล การย่อยเจลาติน การใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน การสร้าง acetoin การสร้างเอนไซม์ urease การสร้างกรดและแก๊สจากคาร์โบไฮเดรต การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง ผลการทดลอง สามารถบ่งชนิด *Bacillus* sp. ไอโซเลท TZ-CP-342 ว่าเป็น *B. brevis* สำหรับ *Bacillus* sp. ไอโซเลท HT-NK-460 ผลการทดลอง สามารถบ่งชนิดว่าเป็น *B. megaterium* (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 การทดสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* sp. ไอโซเลท TZ-CP-342 และ *Bacillus* sp. ไอโซเลท HT-NK-460

	Gram stain	Capsule	Motile	OF-G	Indole	Gelatin	Citrate	VP	Urea	Glucose	Arabinose	Manitol	Xylose	7.5 % NaCl	Starch A.
B. brevis	**V**	**-**	**+**	**O**	**-**	**+**	**V**	**-**	**-**	**V**	**-**	**V**	**-**	**NG**	**-**
Bacillus sp. TZ-CP-342	+	-	+	O/F	-	+	+	-	-	A	-	A	-	NG	-
B. megaterium	**+**	**NR**	**+**[3,4]	**O**	**-**	**+**[5]	**+**	**-**	**V**	**A**	**V**[+]	**V**[+]	**V**[+]	**G**	**+**
Bacillus sp. HT-NK-460	+	-	+	O/F	-	+	+	-	-	A	-	A	-	G	+

ที่มา : Macfaddin, 1980

V = variable result NR = no results available F = fermentation A = Acid O = Oxidative

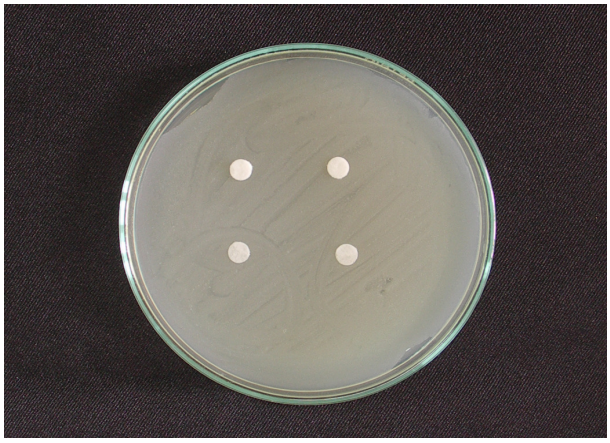
5. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ให้ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ rifampicin

B. megaterium ไอโซเลท HT-NK-460 และ *B. brevis* ไอโซเลท TZ-CP-342 ยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *C. cruenta U. vignae* และ *Oidium* sp. ได้สูงถึง 97.2 – 100 % (ตารางที่ 6) จึงนำมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ให้มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ rifampicin เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ในการติดตามประชากรของ *B. megaterium* และ *B. brevis* ในสภาพแปลงทดลอง การกลายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยใช้อาหาร NGA ผสมยาปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้นต่ำตั้งแต่ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 70, 80, 90 จนถึงความเข้มข้น 100 ppm โดยใช้ลูปขีดเชื้อลงบนอาหาร NGA ที่ผสมยาปฏิชีวนะ rifampicin จากการทดลองพบว่าในการกลายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท ให้ต้านทานยาปฏิชีวนะในแต่ละระดับความเข้มข้นนั้นต้องใช้ระยะเวลา 5-7 วัน แบคทีเรียปฏิปักษ์จึงจะสามารถปรับตัวให้ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ และในบางความเข้มข้นต้องทำซ้ำหลายครั้งจึงจะสามารถกลายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ให้ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ rifampicin ได้ โดยลักษณะของโคโลนีของ *B. brevis* และ *B. megaterium* หลังกลายพันธุ์มีลักษณะไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิม และได้กำหนดแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* และ *B. megaterium* ที่กลายพันธุ์เป็น *B. brevis* Rif^{r-} และ *B. megaterium* Rif^{r-} ตามลำดับ

การทดสอบความคงทนต่อการต้านทานยาปฏิชีวนะ rifampicin ที่ความเข้มข้น 100 ppm ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท โดยการขีดเชื้อดังกล่าวลงบนอาหาร NGA ที่ผสม rifampicin 100 ppm จำนวน 10 รุ่น ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลทมีความคงทนต่อการต้านทานยาปฏิชีวนะ rifampicin ได้ทั้ง 10 รุ่น คือสามารถเพิ่มปริมาณบนอาหาร NGA ที่ผสมยาปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm ได้ทั้ง 10 รุ่น และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค ก่อนนำไปทดสอบในสภาพโรงเรือนพบว่าความสามารถในการยับยั้งไม่แตกต่างไปจากเดิม

6. การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อกันของแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท

ผลการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อกันของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} สามารถเจริญเต็มผิวหน้าอาหารวุ้น และสามารถเจริญเข้าใกล้โคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* Rif^{r-} (ภาพที่ 2) ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ก้านสำลีจุ่มน้ำแบคทีเรียแขวนลอย *B. megaterium* Rif^{r-} ทาต่อเนื่องลงบนผิวอาหารวุ้นก็สามารถเจริญเต็มผิวหน้าอาหารวุ้น และสามารถเจริญเข้าใกล้โคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถเจริญร่วมกันโดยไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน



ภาพที่ 2 การเจริญร่วมกันโดยไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน
ของ *B. brevis* Rif^{r-} และ *B. megaterium* Rif^{r-}

7. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อการควบคุมโรคทางใบของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อราในเรือนทดลอง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} *B. megaterium* Rif^{r-} *B. brevis* Rif^{r-} ผสมกับ *B. megaterium* Rif^{r-} และสารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทางใบ 3 ชนิดคือ *C. cruenta U. vignae* และ *Oidium* sp. พบว่าในกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm มีระดับความรุนแรงของโรคใบจุดและราแป้งต่ำสุดคือ 0.04 และ 0.33 ตามลำดับ (ตารางที่ 8) รองลงมาคือการพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} ผสมกับ *B. megaterium* Rif^{r-} มีระดับความรุนแรงของโรคใบจุดและราแป้ง 0.66 และ 2.33 ตามลำดับ สำหรับในกรรมวิธีควบคุมมีระดับความรุนแรงของโรคใบจุดและราแป้ง 0.87 และ 3.37 ตามลำดับ การทดลองในเรือนทดลองนี้พบว่าต้นถั่วฝักยาวทุกกรรมวิธีทดลองไม่แสดงอาการของโรคราสนิมจึงไม่ทำการประเมินความรุนแรงของโรคราสนิม เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS พบว่ากรรมวิธีการพ่นด้วยสารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm มีระดับความรุนแรงของโรคใบจุด และราแป้งต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนการพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม ปริมาณผลผลิตของถั่วฝักยาวที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในเรือนทดลองนั้น พบว่ากรรมวิธีพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} ให้ปริมาณผลผลิตสูงสุดคือ 773.4 กก./ไร่ รองลงมาคือการพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* Rif^{r-} ให้ผลผลิต 763.4 กก./ไร่ การพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} ผสมกับ *B. megaterium* Rif^{r-} ให้ผลผลิต 673 กก./ไร่ และการพ่นด้วยสารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm

ให้ผลผลิต 592 กก./ไร่ (ตารางที่ 8) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าในแต่ละกรรมวิธีนั้นให้ผลผลิตในปริมาณที่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมซึ่งให้ผลผลิตเพียง 571 กก./ไร่ การทดลองในเรือนทดลองนั้นพบว่าใบถั่วฝักยาวมีขนาดใหญ่ ผิวบาง สีเหลือง จากนั้นใบจะร่วงอย่างรวดเร็วหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคลงบนต้นถั่วฝักยาว อีกทั้งต้นถั่วฝักยาวมีลักษณะยืดยาว (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 8 ระดับความรุนแรงของโรคใบจุด ราสนิม ราแป้ง และผลผลิตของถั่วฝักยาวในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในเรือนทดลอง

กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรค			ผลผลิต (กก./ไร่)
	ใบจุด[1/]	ราสนิม[2/]	ราแป้ง[3/]	
B. brevis Rif^{r-}	0.96 a	-	2.58 a	773.4 a
B. megaterium Rif $^{r-}$	1.04 a	-	2.41 a	763.4 a
B. brevis Rif^{r-} + *B. megaterium*Rif $^{r-}$	0.66 a	-	2.33 a	673.0 a
สารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm	0.04 b	-	0.33 b	592.0 a
กรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่น)	0.87 a	-	3.37 a	571.6 a
F-test	**	-	**	ns
C.V.	29.78	-	24.72	44.81

[1/] ประเมินโรคเมื่อต้นถั่วฝักยาวมีอายุ 63 วัน

[2/] ต้นถั่วฝักยาวไม่แสดงอาการเป็นโรคในทุกกรรมวิธีทดลอง

[3/] ประเมินโรคเมื่อต้นถั่วฝักยาวมีอายุ 56 วัน

** แตกต่างทางสถิติที่ $p< 0.01$

ns ไม่แตกต่างทางสถิติที่ $p< 0.01$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถว และคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ด้วยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

ภาพที่ 3 ต้นถั่วฝักยาวอายุ 40 วัน ที่ปลูกในเรือนทดลอง

8. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อการควบคุมโรคทางใบของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อรานอกเรือนทดลอง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} *B. megaterium* Rif $^{r-}$ *B. brevis* Rif^{r-} ผสมกับ *B. megaterium* Rif $^{r-}$ และสารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทางใบ 3 ชนิด คือ *C. cruenta U. vignae* และ *Oidium* sp. พบว่าในกรรมวิธีพ่นด้วยสารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm มีระดับความรุนแรงของโรคใบจุด และราแป้งต่ำสุดคือ 0.93 และ 0.33 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) รองลงมาคือการพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} ผสมกับ *B. megaterium* Rif $^{r-}$ ซึ่งมีระดับความรุนแรงของโรคใบจุด และราแป้ง 1.20 และ 1.93 ตามลำดับ สำหรับระดับความรุนแรงของโรคราสนิมนั้น พบว่าการพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} ผสมกับ *B. megaterium* Rif $^{r-}$ มีระดับความรุนแรงของโรคราสนิมต่ำสุดคือ 0.67 รองลงมาคือการพ่นด้วยสารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm ซึ่งมีระดับความรุนแรงของโรค 0.93 สำหรับในกรรมวิธีควบคุมมีระดับความรุนแรงของโรคใบจุด ราสนิม และราแป้ง คือ 2.07 2.07 และ 3.53 ตามลำดับ (ภาพที่ 4) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS พบว่าแต่ละกรรมวิธีให้ค่าที่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ปริมาณผลผลิตของถั่วฝักยาวที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีการทดลองนั้น พบว่ากรรมวิธีพ่นด้วยสารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm ให้ปริมาณผลผลิตสูงสุดคือ 3,674 กก./ไร่ รองลงมาคือการพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} ผสมกับ *B. megaterium* Rif $^{r-}$ ให้ผลผลิต 3,196 กก./ไร่ และการพ่นด้วย *B. megaterium* Rif $^{r-}$ ให้ผลผลิต

3,038 กก./ไร่ (ตารางที่ 9) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการพ่นน้ำแบคทีเรียแขวนลอยลงบนต้นถั่วฝักยาวก่อนพืชแสดงอาการเป็นโรคส่งผลให้ผลผลิตของถั่วฝักยาวมีปริมาณเพิ่มขึ้น และการพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} ผสมกับ *B. megaterium* Rif $^{r-}$ นั้น ให้ผลผลิตถั่วฝักยาวในปริมาณที่มากกว่าการพ่นเพียงไอโซเลทเดียว ปริมาณผลผลิตถั่วฝักยาวที่ได้จากการทดลองมีความสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค อย่างไรก็ตามผลผลิตที่เพิ่มขึ้นในทุกกรรมวิธีการทดลอง ยังไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีควบคุม

ตารางที่ 9 ระดับความรุนแรงของโรคใบจุด ราสนิม ราแป้ง และผลผลิตของถั่วฝักยาวในแต่ละกรรมวิธีการทดลองนอกเรือนทดลอง

กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรค			ผลผลิต (กก./ไร่)
	ใบจุด[1/]	ราสนิม[1/]	ราแป้ง[2/]	
B. brevis Rif^{r-}	1.87 a	1.61 ab	2.67 ab	2,580 a
B. megaterium Rif $^{r-}$	1.33 ab	1.06 bc	2.47 ab	3,038 a
B. brevis Rif^{r-} + *B. megaterium* Rif $^{r-}$	1.20 ab	0.67 c	1.93 b	3,196 a
สารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm	0.93 b	0.93 bc	0.33 c	3,674 a
กรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่น)	2.07 a	2.07 a	3.53 a	2,890 a
F-test	**	**	**	ns
C.V.	21.22	20.38	21.51	24.19

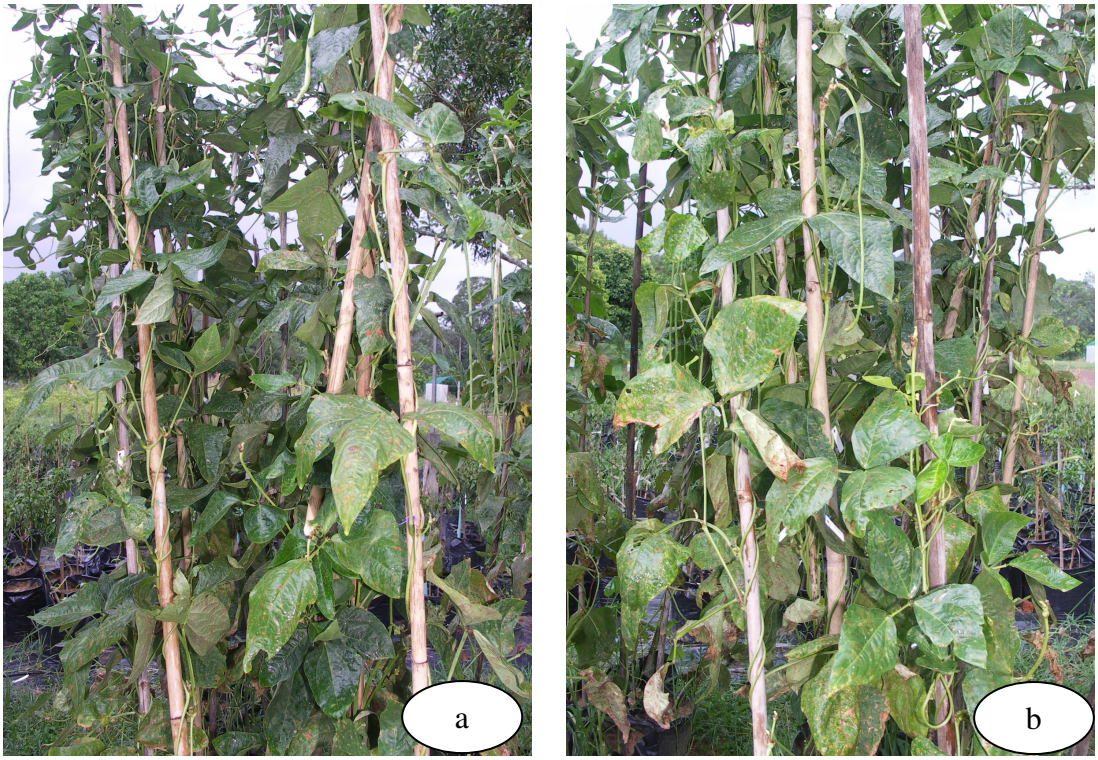
[1/] ประเมินโรคเมื่อต้นถั่วฝักยาวมีอายุ 70 วัน

[2/] ประเมินโรคเมื่อต้นถั่วฝักยาวมีอายุ 56 วัน

** แตกต่างทางสถิติที่ $p< 0.01$

ns ไม่แตกต่างทางสถิติที่ $p< 0.01$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวและคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 4 ต้นถั่วฝักยาวอายุ 70 วัน ที่ปลูกนอกเรือนทดลอง หลังจากพ่นด้วย

(a) แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-}

(b) แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* Rif^{r-}

ภาพที่ 4 (ต่อ) ต้นถั่วฝักยาวอายุ 70 วัน ที่ปลูกนอกเรือนทดลอง หลังจากพ่นด้วย

(c) แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} ผสมกับ *B. megaterium* Rif^{r-}

(d) สารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm

(e) กรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่น)

9. การตรวจนับโคโลนีแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่มีชีวิตรอดบนใบถั่วฝักยาว

จากการติดตามโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีชีวิตรอดบนใบถั่วฝักยาว โดยนำใบถั่วฝักยาวหลังพ่นด้วยน้ำแบคทีเรียแขวนลอยทุก ๆ 7 วัน ก่อนจะทำการพ่นในครั้งต่อไป มาติดตามจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอด กระทำโดยเจือจางน้ำแบคทีเรียแขวนลอยแล้วนำมาเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหาร NGA ผสมยาปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°C) ตรวจนับโคโลนีแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีชีวิตรอดหลังพ่นทุก ๆ 7 วัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 1 เดือน ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r-} *B. megaterium* Rif^{r-} และ *B. brevis* Rif^{r-} ผสมกับ *B. megaterium* Rif^{r-} สามารถมีชีวิตรอดบนใบถั่วฝักยาว แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ (ตารางที่ 10) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS พบว่าจำนวนโคโลนีของแต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางที่ 10 จำนวนโคโลนีแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ตรวจพบบนใบถั่วฝักยาวหลังพ่นลงบนต้นถั่วฝักยาวทุก ๆ 7 วัน

ไอโซเลท	จำนวนโคโลนีแบคทีเรียปฏิปักษ์ ($x10^4$ cfu/g) [1/]			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
B. brevis Rif^{r-}	51.66 a	38.33 a	41.66 a	11.00 a
B. megaterium Rif^{r-}	3.66 c	3.66 b	1.26 c	1.66 b
B. brevis Rif^{r-} + *B. megaterium* Rif^{r-}	31.66 b	25.33 a	14.00 b	7.00 ab
กรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่น)	-	-	-	-
F-test	**	**	**	**
C.V.	18.99	28.29	16.31	28.31

[1/] นับจากตัวอย่างใบพืชสด ที่เก็บก่อนการพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ครั้งต่อไป

** แตกต่างทางสถิติที่ $p< 0.01$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวและคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ด้วยวิธี DMRT

บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างใบ และดินในแปลงปลูกถั่วฝักยาว โดยนำน้ำแบคทีเรียแขวนลอยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 80 °C นาน 30 นาที สามารถแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ได้ทั้งหมด 503 ไอโซเลท โดยแยกได้จากทุก ๆ ตัวอย่าง จากขั้นตอนการแยกเชื้อเห็นได้ว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Boer and Diderichsen, 1991) เช่น ใบเจอราเนียม (Rytter *et al*.,1989) ใบหม่อน (Yoshida *et al*., 2000) และดินใต้ต้นมะม่วง (Okigbo and Osuinde, 2003) นอกจากนี้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ยังทนความร้อนได้สูงถึง 80 °C เนื่องจากเอนโดสปอร์ที่สร้างขึ้น

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. cruenta*, *U. vignae* และ *Oidium* sp. โดยใช้น้ำเลี้ยง *Bacillus* spp. ที่มีอายุ 48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราทั้ง 3 ชนิด นี้ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *C. cruenta* มีลักษณะบวมเห็นได้ชัด ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นจากสารปฏิชีวนะที่แบคทีเรียสร้างขึ้น มีผลต่อผนังเซลล์ของเชื้อรา ทำให้การนำสารเข้าสู่เซลล์และออกจากเซลล์ผิดปกติ ส่งผลให้เซลล์ตายได้ (สมใจ เอี่ยมพรรัตน์, 2531) ทั้งนี้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ผลิตสารปฏิชีวนะขึ้นในช่วง late log phase จนถึงช่วง stationary phase (Nakano *et al*., 1988) สารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นมีประโยชน์ ในการแก่งแย่งอาหารในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน หากต้องอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น และยังช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิด ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคที่ได้สอดคล้องกับการรายงานของ Brana และคณะ (1985) ที่พบว่าการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดนั้นการผลิตจะเริ่มขึ้นหลังจากที่เชื้อเจริญได้สูงสุดแล้ว การทดลองของวาสนา มู่สา (2542) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LN 007 ในสูตรอาหาร Mckeen มีระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าว *Py. oryzae* และ *R. solani* คือ 48 ชั่วโมง รายงานของ Vasudeva และ Chakravarthi (1954) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. subtilis* มีคุณสมบัติในการควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้หลายชนิด เช่น *R. solani R. bataticola Alternaria solani Bo. cinerea F. udum* และ *Coll. falcatum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อส่งผลให้ germ tube มีลักษณะผิดปกติและทำให้สปอร์เชื้อราบวม Yoshihiro และคณะ (2003) ทำการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราซึ่งเป็นสาเหตุโรคใบไหม้ของข้าวโดยใช้สปอร์เชื้อราความเข้มข้น 10^3 สปอร์/มิลลิลิตร ผสมกับแบคทีเรียแขวนลอย *B. subtilis* สายพันธุ์ IK-1080 ที่ระดับความเข้มข้น $1x10^6$ $5x10^7$ $1x10^8$ และ

$5x10^8$ cfu/ml การทดลองพบว่าแบคทีเรียแขวนลอยที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ และ $5x10^7$cfu/ml แสดงการยับยั้งการงอกของสปอร์และการสร้าง appressoria และ การทดลองของ Thonglem และคณะ (2007) ใช้สปอร์เชื้อรา *Penicillium digitatum* ความเข้มข้น $3x10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร ผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของ *B. pumilus* แล้วสังเกตการงอกของ germ tube ที่ 0, 4 และ 8 ชั่วโมง การทดลองพบว่า *B. pumilus* สายพันธุ์ W1L1 แสดงการยับยั้งการงอกของ germ tube ได้สูงสุด 97.6 % หลังบ่มไว้ 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

การจำแนก *Bacillus* sp. ไอโซเลท TZ-CP-342 และ *Bacillus* sp. ไอโซเลท HT-NK-460 ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่า *Bacillus* sp. ไอโซเลท TZ-CP-342 มีลักษณะใกล้เคียง *B. brevis* และ *Bacillus* sp.ไอโซเลท HT-NK-460 มีลักษณะใกล้เคียง *B. megaterium* (Macfaddin, 1980) จากการศึกษาพบว่า *B. brevis* และ *B. megaterium* เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชกันอย่างแพร่หลาย (Shoda, 2000) โดยไม่ก่ออันตรายต่อคน สัตว์ และพืช การจำแนกแบคทีเรียด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นวิธีที่สามารถกระทำได้ง่าย ราคาค่อนข้างต่ำแต่ต้องใช้ระยะเวลาในการติดตามผลการทดลองค่อนข้างนาน และความแม่นยำน้อยกว่าการจำแนกโดยวิธีทางชีวโมเลกุล เช่น PCR-based 16S rDNA, RAPD, RFLP แต่การจำแนกโดยวิธีทางชีวโมเลกุลนั้นมีข้อจำกัดคือ ต้องมีความชำนาญ วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาสูง

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^r

B. megaterium Rif^r ให้ต้านยาปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm เพื่อใช้ติดตามแบคทีเรียเป็นวิธีที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถทำได้ง่าย ไม่ต้องอาศัยความชำนาญมาก ราคาค่อนข้างต่ำหากเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ๆ เช่น การใช้ยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein, *gfp*) (อติพล พัฒิยะ, 2542) แต่การกลายพันธุ์แบคทีเรียโดยวิธีนี้ต้องใช้เวลานานในการกลายพันธุ์ การกลายพันธุ์ต่อยาปฏิชีวนะ rifampicin นั้น เนื่องมาจากยีน *rpoB* ที่อยู่บนโครโมโซมเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ RNA polymerase ทำให้ rifampicin ไม่สามารถเข้าจับกับ β-subunit ของ RNA polymerase เพื่อการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ (มาลิน จุลศิริ, 2536) การทดสอบความคงทนของแบคทีเรียที่กลายพันธุ์ต้านทาน rifampicin จำนวน 10 รุ่น ภายในห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรียสามารถต้านยาได้ 100 % ทั้ง 10 รุ่น แสดงให้เห็นว่าการต้านยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียสามารถคงอยู่ในระยะที่ยาวนานพอที่จะนำไปทดลองในเรือนทดลองและนอกเรือนทดลอง โดยประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลายพันธุ์ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ราไม่แตกต่างไปจากเดิม ทั้งนี้อาจเนื่องจากการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียไม่ได้เกิดขึ้นตรงบริเวณที่สร้างสารปฏิชีวนะที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค อย่างไรก็ตามเมื่อติดตาม

จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. หลังพ่นลงบนใบถั่วฝักยาวทุก ๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทที่พ่นลงบนต้นถั่วฝักยาวมีปริมาณลดลง คือ *B. brevis* Rif^r มีจำนวนโคโลนีที่ตรวจพบมากที่สุด คือ 51.66 x 10^4 cfu/ml ในขณะที่ *B. megaterium* Rif^r ตรวจพบโคโลนีน้อยที่สุด คือ 1.26 x 10^4 cfu/ml ซึ่งคิดเป็นปริมาณโคโลนีที่ลดลงได้ 96.58-99.99% ทั้งนี้ปริมาณที่ลดลงอาจเนื่องมาจากปัจจัยที่ไม่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิ ปริมาณอาหารบนใบถั่วฝักยาว การถูกชะล้างจากน้ำฝน อีกทั้งแบคทีเรียที่นำมาใช้ควบคุมโรคดังกล่าวเป็นแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดิน อาจเป็นไปได้ที่สภาพแวดล้อมบนใบไม่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณสารจับใบลงในน้ำแบคทีเรียแขวนลอย อาจทำให้แบคทีเรียที่พ่นลงไปสามารถเกาะติดกับใบถั่วฝักยาวได้มากขึ้น

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^r และ *B. megaterium* Rif^r เมื่อนำมาทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อกันแล้วพบว่า สามารถเจริญร่วมกันโดยไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเอาแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท มาประยุกต์ใช้ร่วมกันเพื่อควบคุมโรคโดยชีววิธี

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ในเรือนทดลองและนอกเรือนทดลองดำเนินการแตกต่างกัน โดยการทดสอบในเรือนทดลองนั้นได้ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคทางใบทั้ง 3 ชนิด หลังพ่นน้ำแบคทีเรียแขวนลอยหรือสารคลอโรทาโลนิล ส่วนการทดลองนอกเรือนทดลองนั้นปล่อยให้ต้นถั่วฝักยาวเกิดโรคตามธรรมชาติ ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน โดยการทดลองในเรือนทดลองนั้น *Bacillus* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลท ไม่สามารถควบคุมโรคใบจุด และราแป้ง โดยมีระดับความรุนแรงของการเกิดโรคไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม และไม่พบอาการโรคราสนิมในทุกกรรมวิธีทดลอง แม้ว่าได้มีการปลูกเชื้อก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาพอากาศในเรือนทดลองที่ร้อนไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค ส่วนการทดลองนอกเรือนทดลองซึ่งปล่อยให้มีการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคตามธรรมชาติ พบว่า *B. megaterium* Rif^r และ *B. brevis* Rif^r ผสมกับ *B. megaterium* Rif^r สามารถควบคุมโรคใบจุดได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ในขณะเดียวกัน *B. brevis* Rif^r ผสมกับ *B. megaterium* Rif^r มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราสนิมได้ดีกว่า และแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีพ่นด้วยสารคลอโรทาโลนิล ซึ่งเป็นสารเคมีที่แนะนำให้ใช้โดยกรมวิชาการเกษตร ส่วนโรคราแป้งนั้นพบว่า *B. brevis* Rif^r *B. megaterium* Rif^r และ *B. brevis* Rif^r ผสมกับ *B. megaterium* Rif^r สามารถควบคุมโรคได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม การทดลองแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากใบถั่วฝักยาว และดินสามารถลดอัตราการเกิดโรคทางใบได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Yoshida และคณะ (2000) ที่ใช้น้ำเลี้ยงของ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ RC-2 พ่นลงบนต้น

หม่อนก่อนการเข้าทำลายของเชื้อ *Coll. dematium* การทดลองพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสสามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียและลดการเกิดโรคได้ Rytter และคณะ (1989) นำ *Bacillus* spp. ที่แยกจากใบเจอราเนียมมาทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Puccinia pelargonii-zonalis* โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ฉีดพ่นที่ใบก่อนทำการปลูกเชื้อก่อโรคราสนิม การทดลองพบว่า *B. subtilis* 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ และลดอัตราการเกิดตุ่มของราสนิมบนใบเจอราเนียม โดยแสดงการยับยั้งภายหลัง 4 วัน หลังประยุกต์ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ นอกจากนี้การพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ลงบนต้นถั่วฝักยาวก่อนพืชแสดงอาการเป็นโรค สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรค และยังส่งผลให้ปริมาณผลผลิตของถั่วฝักยาวเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ยกเว้นการพ่นด้วย *B. brevis* Rif^{r} นอกเรือนทดลอง) เช่นเดียวกับการรายงาน Anonymous (2008) ที่ได้ประยุกต์ใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. หลาย ๆ ชนิดกับพืชเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิต และการทดลองยังพบว่าการพ่นแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ผสมรวมกัน 2 ไอโซเลท ลงบนต้นถั่วฝักยาวทำให้ปริมาณผลผลิตถั่วฝักยาวเพิ่มขึ้นมากกว่าการพ่นแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพียงไอโซเลทเดียว เช่นเดียวกับการทดลองของ Jiang และคณะ (2006) ที่ใช้ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB11 และ FH17 ผสมกัน (BF) ในอัตรา 1:1 แล้วนำมาคลุกกับกากองุ่นทำเป็นปุ๋ยหมักก่อนนำไปใช้กับพริกหยวก ผลการทดลองพบว่าสามารถควบคุมการเกิดโรคไหม้จาก *P. capsici* ได้ 60.3 % และทำให้ปริมาณผลผลิตของพริกหยวกเพิ่มขึ้นถึง 200 % ผลผลิตที่ได้มีปริมาณมากกว่าการใช้ *Bacillus* sp. ไอโซเลท BB11 หรือ FH17 เพียงไอโซเลทเดียว สำหรับการทดลองในเรือนทดลองนั้น พบว่าใบถั่วฝักยาวมีขนาดใหญ่ ผิวบาง สีเหลือง จากนั้นใบจะร่วงอย่างรวดเร็วหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคลงบนต้นถั่วฝักยาว อีกทั้งต้นถั่วฝักยาวมีลักษณะยืดยาว อาการดังกล่าวอาจมีผลให้การประเมินโรคอาจมีความผิดพลาด จึงทำให้ผลผลิตที่ได้ต่ำและไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค

การพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r} ร่วมกับ *B. megaterium* Rif^{r} ลงบนต้นพืชก่อนการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคทำให้ระดับความรุนแรงของโรคลดลง และส่งผลให้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้มีแนวโน้มไปในทางที่ดี อาจจะนำไปใช้ได้จริงในสภาพแปลงปลูกถั่วฝักยาวทั่วไป แต่ทั้งนี้การทดลองได้กระทำเพียง 1 ฤดูกาลเพาะปลูกเท่านั้น จึงควรมีการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท ในฤดูกาลเพาะปลูกที่แตกต่างอีกครั้ง เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ก่อนนำไปใช้หรือพัฒนาเป็นรูปผลิตภัณฑ์ต่อไป

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างใบ และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวเพื่อนำมาใช้แยกปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

เก็บรวบรวมตัวอย่างใบ และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวใน 7 จังหวัด ทางภาคใต้ ได้ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง

2. การแยกปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จากใบ และดินในแปลงปลูกถั่วฝักยาว

สามารถแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จากตัวอย่างใบ และดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวได้ทั้งหมด 503 ไอโซเลท

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคทางใบของถั่วฝักยาว

Bacillus sp. ไอโซเลท HT-NK- 460 และ *Bacillus* sp. ไอโซเลท TZ-CP-342 มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิด ได้สูง 97. 2 -100 % โดยทำให้สปอร์เชื้อรา *C. cruenta* มีลักษณะบวม โป่ง ไม่งอก และสปอร์เชื้อรา *U. vignae* และ *Oidium* sp. ไม่งอก

4. การทดสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* spp.

การทดสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* spp. สามารถบ่งชนิด *Bacillus* sp. ไอโซเลท TZ-CP-342 ได้ว่าเป็น *B. brevis* และสามารถบ่งชนิด *Bacillus* sp. ไอโซเลท HT-NK- 460 ได้ว่าเป็น *B. megaterium*

5. การชักนำให้เกิดกลายพันธุ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ให้ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ rifampicin

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* และ *B. megaterium* ที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ให้ต้านยาปฏิชีวนะ rifampicin 100 ppm สามารถคงทนต่อการต้านยาปฏิชีวนะ rifampicin ได้ทั้ง 10 รุ่น และยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. cruenta U. vignae* และ *Oidium* sp. ในห้องปฏิบัติการเหมือนเดิม

6. การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อกันของแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif^{r} และ *B. megaterium* Rif^{r} สามารถเจริญอยู่ร่วมกันได้โดยไม่เป็นปฏิปักษ์ต่อกัน

7. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อการควบคุมโรคทางใบของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อราในเรือนทดลอง

กรรมวิธีพ่นด้วยสารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm มีระดับความรุนแรงของโรคใบจุด และราแป้งต่ำสุดคือ 0.04 และ 0.33 ตามลำดับ ขณะที่เมื่อใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์พบความรุนแรงของโรคใบจุดและราแป้งไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม ผลผลิตถั่วฝักยาวที่ได้จากทั้งกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารคลอโรทาโลนิลและแบคทีเรียปฏิปักษ์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งให้ผลผลิต 571.6 กก./ไร่ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

8. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ต่อการควบคุมโรคทางใบของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อรานอกเรือนทดลอง

กรรมวิธีพ่นด้วยสารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm มีระดับความรุนแรงของโรคใบจุด และโรคราแป้งต่ำสุด รองลงมาเมื่อใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. brevis* Rif $^{r-}$ ผสมกับ *B. megaterium* Rif $^{r-}$ (โรคใบจุด 1.20 โรคราแป้ง 1.93 และโรคราสนิมต่ำสุดคือ 0.67) ผลผลิตที่ได้จากกรรมวิธีพ่นด้วยสารคลอโรทาโลนิล 2,000 ppm มีปริมาณผลผลิตสูงสุดคือ 3,674 กก./ไร่ กรรมวิธีพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้ปริมาณผลผลิตถั่วฝักยาวเพิ่มขึ้น (ยกเว้นการพ่นด้วย *B. brevis* Rif^{r-} นอกเรือนทดลอง) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (2,890 กก./ไร่) อย่างไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

9. การตรวจนับโคโลนีแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ที่มีชีวิตรอดบนใบถั่วฝักยาว

แบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกไอโซเลทที่พ่นลงบนใบถั่วฝักยาวสามารถมีชีวิตรอดแต่ไม่เพิ่มปริมาณบนใบถั่วฝักยาว โดย *B. brevis* Rif $^{r-}$ มีชีวิตรอดบนใบถั่วฝักยาวสูงที่สุด

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร ก. 2545. โครงการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ *B. subtilis* สายพันธุ์ ABS/TRF สำหรับควบคุมโรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ. จาก. http:// www.rescom.trf.or.th/display/show_colum_sum.php? (28/2/2551)

กรมวิชาการเกษตร ข. 2545. ศัตรูของถั่วฝักยาวและการป้องกันกำจัด. เกษตรดีที่เหมาะสมสำหรับถั่วฝักยาวและถั่วลันเตา. กรุงเทพ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด.

กรมวิชาการเกษตร. 2550. สถิติข้อมูล. จาก. http://www.doa.go.th (10/10/2007)

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2549. สถิติการผลิตการเกษตรตามชนิดพืชกลุ่มผักปีเพาะปลูก2548/2549 ทั้งประเทศ. จาก. http://www.agriman.doae.go.th (10/10/2007)

ขวัญจิตร สันติประชา และวัลลภ สันติประชา. 2535. การทดสอบพันธุ์ถั่วฝักยาวในฤดูฝน ในจังหวัดสงขลา. ว. สงขลานครินทร์ 14 : 373-378.

จิระเดช แจ่มสว่าง และบรรเจิด อินหว่าง. 2539. การควบคุมโรคเน่าระดับดินไรซ๊อคโทเนียของฝ้ายโดยวิธีคลุกเมล็ดด้วยจุลินทรีย์. ว. โรคพืช 6 : 63-69.

จิรัสสา มีกลิ่นหอม. 2547. การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตร-มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2539. การใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพในปัจจุบัน. ว. แก่นเกษตร 24 : 53 – 62.

ปริศนา วงค์ล้อม. 2548. การใช้พืชสมุนไพร และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BO12 -022 ควบคุมโรคราเขียว (*Trichoderma harzianum* Rifai.) ในเห็ดหูหนู และผลของกานพลู (*Eugenia aromatica* ktze.) ต่อการควบคุมโรคทางใบของถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Fruw.). วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เปรมปรีย์ ณ สงขลา. 2537. การใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช. ว. เคหการเกษตร 12 : 175-183.

พงษ์วิภา หล่อสมบูรณ์. 2529. ราสนิมในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พรรณเพ็ญ เหมมณี. 2549. สมบัติการยับยั้งของสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* และสารเมทาบอไลท์ต้านการเจริญของเชื้อราเขียว (*Penicillium digitatum* Sacc.) ของส้ม. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มาลิน จุลศิริ. 2532. ยาต้านจุลชีพ : ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อักษรบัณฑิต.

มณจันทร์ เมฆธน. 2536. ศักยภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* AP01 ในการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืช. ว. วิทยาศาสตร์ ม. ก. 11 : 9-20.

วรรณวิไล อินทนู, จิระเดช แจ่มสว่าง และ จิรัสสา มีกลิ่นหอม. 2548. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกด้วยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสภาพแปลง. หน้า 305-317 *ใน* รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 7 โรงแรมโลตัสกาดสวนแก้วเชียงใหม่ 7-9 พ.ย. 2548.

วาสนา มู่สา. 2542. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าวโดย *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN007. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2549.โรคของผักและการควบคุมโรค. กรุงเทพ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ เอี่ยมพรรัตน์. 2531. ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ที่แยกได้และผลของสารปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของบักเตรีที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8. 2548. คู่มือโรคและแมลงศัตรูผักโครงการเกษตรเชิงพาณิชย์. สงขลา : บริษัทมาสเตอร์พีชแอนด์โครเซท์ จำกัด.

สุชล แก้วพรหม. 2539. การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และ วัชรินทร์ รุกขไชยศิริ. 2543. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสกุล *Cassia* sp. รายงานการวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อติพล พัฒิยะ. 2542. การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงใน *Bacillus* spp. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Aktuganov, G., Galimzyanova, N., Melent'ev, A. and Kuz'mina, L. 2007. Extracellular hydrolases of strain *Bacillus* sp. 739 and their involvement in the lysis of micromycete cell walls. Microbiol. 76 : 413-420.

Anonymous. 2008. *Bacillus subtilis* strain having antagonistic activity controlling plant diseases. [online]. Available : http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp? (18/3/2008)

Aono, R., Hammura, M., Yamamoto, M. and Asano, T. 1994. Isolation of extracellular 28- and 42-Kilodalton β-1, 3-glucanases and comparison of three β-1, 3-glucanases produced by *Bacillus circulans* IAM1165. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 122-129.

Arwiyanto, T., Sqkata, K., Goto, M., Tsuyumu, S. and Takikawa, Y. 1994. Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* Ann. Phytopathol. Soc. Japan 60 : 288-294.

Baker, C.J., Stavely, J.R. and Mock, N. 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant Dis. 69 : 770 -772.

Barnett, L.H. and Barry, B. B. 1972. Descriptions and Illustrations of Genera. Minneapolis, Minn : Burgess Pub.

Bazzi, C., Biondi, E. and Vanneste, L.J. 2006. Potential as biological control agents of some novel epiphytic bacterial strains isolated from Italy. ACTA Hort.(ISHS) 704 : 329-336.

Blakeman, J.P. and Fokkema, N.J. 1982. Potential for biological control of plant disease on the phylloplane. Ann. Rev. Phytopathol. 20 : 167-192.

Brana, A.F., Wolfe, S. and Demain, A.L. 1985. Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. Can. J. Microbiol. 31 : 736-743.

Boer, A.S. and Diderichsen, B. 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 1-4.

Collins, D.P., Jacobsen, B.J. and Maxwell, B. 2003. Spatial and temporal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agent of sugar beet cercospora leaf spot. Bio. Cont. 26 : 224-232.

Cook, R.J. 1993. The role of biological control in pest management in the 21st century. p. 1020 *In* : Lumsden, R.D. and Vaughn, J.L. (eds.). American Chemical Society Conference Proceedings Series. Pest Management : Biologially Based Technologies.

Cook, R.J. and Baker, K.F. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul, Minesota : APS Press.

Cook, R.J., Thomasshow , L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G. and Kin, D-S. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobactreria against root disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 : 4197-4201.

Douglas, C.P. and Barry, J.J. 2002. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. Bio. Cont. 26 : 153-161.

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hypomycetes. Aberystwyth : Cambrian News.

Emmert, E.A.B. and Handelsman, J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. FEMS Microbiol. Lett. 171 : 1-9.

Gong, M., Wang, J.-D., Zhang, J., Yang, H., Lu, X.-F., Pey, Y. and Cheng, J.-Q. 2006. Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 *in vitro* and identification of its antifungal substance. Acta. Biochem. Biophys. 38 : 233-240.

Hebber, K.P., Davey, A.G. and Dart, P.J. 1992. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme* a soil-borne fungal pathogens isolation and identification. Soil-Biol-Biochem. 24 : 979-987.

He, H., Silo-Suh, L.A., Handelsman, J. and Clardy, J. 1994. Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. Tetrahedron Lett. 35, 2499-2502.

Helisto, P., Aktuganov, G., Galimzianova, N., Melentjev, A. and Korpela, T. 2001. Lytic enzyme complex of antagonistic *Bacillus* sp. X-b : isolation and purification of components. J. Chromatogr. 758 : 197-205.

Jiang, Q.Z., Guo, H.Y., Li, M.S., Qi, Y.H and Guo, H.J. 2006. Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparation and field application methods against Phytophthora blight of bell pepper. Bio. Cont. 36 : 216-223.

Katz, E. and Demain, L.A. 1977. The peptide antibiotic of *Bacillus subtilis* : Chemistry, biogenesis and possible function. Bacteriol. 41 : 449-474.

Kishore, G.K., Pande, S. and Podile, A.R. 2005. Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. Phytopathol. 95 : 1157-1165.

Koike, T.S. and Saenz, S.G. 1998. First report of powdery mildew, caused by an *Oidium* sp. on poinsettia in California. Plant Dis. 82 : 128.

Krieg R.N. and Holt, G.J. 1984. In Krieg, R.N. Novel Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1. USA.

Kuzma, J., Marshall, N.M., Pollock, H.W. and Fall, R. 2004. Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene sporulation in *Bacillus subtilis*. Microbiol. 142 : 733-740.

Ladygina, N., Dedukhina, G.E. and Vainshtein, B.M. 2005. A review on microbial synthesis of hydrocarbons. Pro. Biochem. 41 : 1001-1014.

Leelasuphakul, W., Sivanunsaku, P. and Phongpaichit, S. 2006. Purification, Characterization and synergistic activity of β-1, 3-glucanases an antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. Enz. Microbiol. Technol. 38 : 990-997.

Liu, L.Z. and Sinclair, B.J. 1995. *Bacillus megaterium* ATCC 55000 and method of use thereof to control *R. solani*. [online]. Available : http://www.freepatentsoline.com (12/11/2007)

Macfaddin, J.F. 1980. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. USA : Waverly Press. Inc.

McKeen, C.D., Reilly, C.C. and Pusey, P.L. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. Phytopathol. 76 : 136-139.

Miyanishi, N., Hamada, N., Kobayashi, T., Imada, C. and Watanabe, E. 2002. Purification and characterization of a novel extracellular β-1,3-glucanase produced by *Bacillus clausii* NM-1 isolated from Ezo Abalone *Haliotis discus hannai*. J. Biosci. Bioeng. 95 : 45-51.

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

Nakano, M.M., Mohanned, A.M. and Zuber, P. 1988. Identification of genetic locus required food biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 170 : 5662-5668.

Obagwu, J. and Korsten, L. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. Postharv. Biol. Technol. 28 : 187-194.

Okigbo, N.R. and Osuinde, I.M. 2003. Fungal leaf spot diseases of mango (*Mangifera indica* L.) in Southeastern Nigeria and biological control with *Bacillus subtilis*. Plant Protect. Sci. 39 : 70-77.

Phae, C.G., Sasaki, M., Shoda, M. and Kubota, H. 1990. Characteristics of *Bacillus subtilis* isolated from composts suppressing phytopathogenic microorganisms. Soil Sci. Plant Ntr. 36 : 575 – 586.

Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol. Rev. 41 : 711-753.

Raffel, S.J., Stabb, E.V., Milner, J.L. and Handelsman, J. 1996. Genotypic and phenotypic analysis of zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus*. Microbiol. 142 : 3425-3436.

Rytter, J.L., Lukezic, F.L., Craig, R. and Moorman, G.W. 1989. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. Phytopathol. 79 : 367-370.

Ryu, E. 1938. On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. J. Jpn. Soc. Vet. Sci. 17 : 31-32.

Saito, N.1973. A thermophilic extracellular-amylase from *Bacillus licheniformis*. Arch. Biochem. Biophys. 155 **:** 290-298.

Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. St. Paul, MN. USA : APS Press.

Shoda, M. 2000. Review: Bacterial control of plant disease. J. Biosci. Bioeng. 89 : 515-521.

Silo-Suh, L.A., Stabb, E.V., Raffel, S.J. and Handelsman, J. 1998. Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. Curr. Microbiol. 37 : 6-11.

Sinclair, J.B. 1989. *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent for plant disease. *In* Perspectives in Plant Pathology. New Dehli : Today and Tomorrow's Printers and Publishers. pp. 367-374.

Stabb, V.E., Jacobson, M.L. and Handelsman, J. 1994. Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 4404-4412.

Stohl, A.E., Milner, L.J. and Handelsman, J. 1999. Zwittermicin A biosynthetic cluster. J. Gene. 237 : 403-411.

Tauber, M.J., Hoy, M.A and Herzog, D.C. 1985. Biological control in agricultural IPM system : A brief overview of the current status and future prospects *In* : Marjoric, A.H. and Donald, C.H., eds. Biological Control in Agricultural IPM Systems. London : Academic Press.

Thomson, J. 1987. The use of agro in-producing bacteria in the biological control of crown gall. pp. 213 – 228 *In* : Chet, L. (ed.). Innovative Approaches to Plant Disease Control. New York : John Wiley and Sons, Inc.

Thonglem, K., Plikomol, A. and Pathom-aree, W. 2007. Growth inhibition of *Penicillium digitatum* by antagonistic microorganisms isolated from various parts of orange tree. Mj. Int. J. Sci. Tech. 1 : 208-215.

Utkhede, R.S. and Rahe, J.E. 1983. Interactions of antagonist and pathogen in biological control of onion white rot. Phytopathol. 73 : 890-893.

Utkhede, R.S. and Smith, E.M.1991. *Phytophthora* and *Pythium* species associated with root rot of young apple tree and their control. Soil Biol. Biochem. 23 : 1059-1063.

Vasudeva, R.S. and Chakravarthi, B.P. 1954. The antibiotic action of *Bacillus subtilis* in relation to certain parasitic fungi, with special reference to *Alternaria solani*. Ann. Appl. Biol. 41 : 612-618.

Wei, H.Y., Wang, F.L., Chang, S.J. and Kung, S.S. 2003. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. J. Biosci. Bioeng. 96 : 174-178.

Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. and Shirata, A. 2000. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. Phytopathol. 91 : 181-187.

Yoshihiro, T., Mitsio, H., Hayato, H. and Futoshi, K. 2003. Biological control of rice blast disease by *Bacillus subtilis* IK-1080. [online]. Available : http://www.sciencelinks.jp/j-east/aeticle. (18/3/2008)

Zheng, X.Y. and Sinclair, J.B. 2000. The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of Rhizoctonia root rot of soybean. [online]. Available : http://www.entomology.wisc.edu (31/2/2008)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

Nutrient broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

Nutrient Glucose Agar (NGA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

สูตรอาหารสำหรับทดสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* spp.

Motility medium

Tryptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

Hugh and Leifson's OF medium

Peptone	2	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	3	กรัม

Bromthymol blue 0.2 %	15	มิลลิลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบ basal medium แล้วปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.1 เติม Bromthymol blue ลงไปเพื่อเป็น indicator เติม glucose 10 กรัม ผสมลงในอาหาร บรรจุใส่หลอดทดลองประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

Nutrient gelatin

Gelatin	20	กรัม
Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

Simmons'citrate agar

$MnSO_4$	0.2	กรัม
$NH_4H_2PO_4$	1	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
Sodium citrate	2	กรัม
NaCl	5	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6.8

VP medium

Buffered peptone	7	กรัม
K_2HPO_4	5	กรัม
Bacto-dextrose	5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6.8

Christensen's urea agar slant

Peptone	5	กรัม

Glucose	1	กรัม
KH_2PO_4	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ต้มส่วนผสมทั้งหมดจนละลายปรับ pH ให้ได้ 6.8-6.9 เติมฟีนอล เรด (phenol red) ความเข้มข้น 0.04 % ปริมาตร20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นลงประมาณ 52 °C เติมสารละลายยูเรีย (urea) 20 % ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองแล้วลงไปเขย่าให้เข้ากัน นำปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดอาหารปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางทำ slant

Starch agar

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Potato starch	10	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

0.1% Peptone broth

Peptone	1	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียมสารสำหรับทดสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* spp.

Lugol 's iodine

Iodine	5	กรัม
Potassium iodide (KI)	10	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

10 % α-napthol

Alpha napthol	10	กรัม
Ethanol 95 %	100	มิลลิลิตร

20 % Urea

Urea	20	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

0.04 % phenol red

phenol red	0.04	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

3 % KOH

KOH	3	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

Malachite green solution

Malachite green	5	กรัม
Distilled water	95	มิลลิลิตร

Crystal violet

Solution A		
Crystal violet	2	กรัม
Ethyl alcohol 95 %	20	มิลลิลิตร
Solution B		
Ammonium oxalate	0.8	กรัม
Distilled water	80	มิลลิลิตร

ผสม Solution A และ Solution B เข้าด้วยกัน แล้วใช้กระดาษกรอง กรองสารละลายก่อนบรรจุลงในขวดเก็บ

Counter stain

Stock solution		
Safranin	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95 %	100	มิลลิลิตร

Working solution

Stock solution	10	มิลลิลิตร
Distilled water	90	มิลลิลิตร

Kovac

p-Dimethylaminabenzaldehyde	10	กรัม
HCl	50	มิลลิลิตร
Alcohol	150	มิลลิลิตร

การทดสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp

1. การย้อมแกรม (gram stain)

นำเชื้อ 1 ลูป มาละลายในน้ำที่หยดไว้บนสไลด์เกลี่ยให้เป็นแผ่นบาง นำไปผ่านความร้อน หยดคริสตัลไวโอเลท (crystal violet) แล้วทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำไหลแล้วซับด้วยกระดาษทิชชู หยดสารละลายไอโอดีน (iodine) ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำไหลซับให้แห้ง หยดแอลกอฮอล์ (alcohol) ให้ไหลผ่านสไลด์นานประมาณ 30 วินาที ทิ้งให้แห้งแล้วล้างด้วยน้ำไหล 2 วินาที ย้อมทับด้วยสารละลายซาฟลานิน ทิ้งไว้ประมาณ 10 วินาที ล้างด้วยน้ำแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง หากแบคทีเรียย้อมติดสีน้ำเงินแสดงว่าเป็นแกรมบวก

2. การย้อมแคปซูล (capsule stain)

หยด Normal saline (0.85 % NaCl) ลงบนสไลด์ นำเชื้อ 1 ลูป มาละลายใน Normal saline เกลี่ย (ไม่ให้แห้ง) หยดสีนิโกรซิน (nigrosin) เกลี่ยให้แห้ง ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ไม่มี Capsule จะเห็นพื้นหลังเป็นสีดำ ตัวแบคทีเรียสีใสอ่านผลเป็นลบ

มี Capsule จะเห็นเป็นวงใสรอบเซลล์ (ลักษณะคล้ายเม็ดแมงลัก) อ่านผลเป็นบวก

3. การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility test)

นำ *Bacillus* spp. อายุ 18-24 ชั่วโมง stab ลงในอาหาร motility medium โดยไม่ให้ถึงก้นหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง สังเกตการกระจายของเชื้อ ถ้าเชื้อกระจายไปจากแนวที่ stab ไว้ แสดงว่าเชื้อ *Bacillus* spp. มีความสามารถในการเคลื่อนที่ อ่านผลเป็นบวก

4. การเจริญแบบต้องการและไม่ต้องการออกซิเจน (oxidation-fermentation test)

นำเชื้อ *Bacillus* spp. อายุ 18-24 ชั่วโมง stab ลงในอาหาร Hugh and Leifson's OF medium จำนวน 2 หลอด หลอดหนึ่งปิดทับด้วยพาราฟินเหลว (parafin oil) ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้หนาประมาณ 2 เซนติเมตร เพื่อทำให้อยู่ในสภาพที่ขาดอากาศ อีกหลอดไม่ต้องเติมพาราฟินเหลว บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูว่าเกิดกรดในหลอดอาหาร ในสภาพที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศ หรือทั้ง 2 สภาพ ถ้าเกิดในหลอดที่เททับด้วยพาราฟินและไม่เททับด้วยพาราฟิน แสดงว่าเกิดการ fermentation แต่ถ้าเกิดเฉพาะในหลอดที่ไม่ได้เทพาราฟินแสดงว่าเป็น oxidation ซึ่งการเกิดกรดให้สังเกตจากการเปลี่ยนสีอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

5. การสร้างสารอินโดล (indole)

นำเชื้อ *Bacillus* spp. อายุ 24 ชั่วโมง ย้ายลงในหลอดอาหาร 0.1 % peptone broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เลี้ยงไม่เกิน 24 ชั่วโมง หยดโคแวค (kovac) ลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ ถ้าเกิดชั้นสีแดงลอยอยู่แสดงว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถสร้างสารอินโดล (indole)ได้ อ่านผลเป็นบวก

6. การย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

เขี่ยเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหาร nutrient gelatin นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C) นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำหลอดอาหารดังกล่าวไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง หากเชื้อสามารถย่อยเจลาตินได้จะทำให้อาหารไม่แข็งที่อุณหภูมิ 20 °C อ่านผลเป็นบวก

7. การใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน (citrate test)

ขีดเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ลงบนอาหาร Simmons'citrate agar บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้าเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าเชื้อนั้นสามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน อ่านผลเป็นบวก

8. การสร้าง acetoin (VP test)

เขี่ยเชื้อ *Bacillus* spp. ปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหาร VP medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบ acetoin โดยหยด 10 % แอลฟา แนพทอล (α–napthol) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าแล้วเติม KOH ความเข้มข้น 20 % ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10-15 นาที ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้น อ่านผลเป็นบวก

9. การสร้างเอนไซม์ urease (urease production)

ขีดเชื้อ *Bacillus* spp. อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนอาหาร Christensen's urea agar slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง หากเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถผลิตเอนไซม์ urease ได้บริเวณผิวอาหารเปลี่ยนเป็นสีแดงม่วง อ่านผลเป็นบวก

10. การสร้างกรดและแก๊สจากคาร์โบไฮเดรต (acid and gas production carbohydrates)

นำเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง stab ลงในอาหาร Hugh and Leifson's OF medium ที่ประกอบด้วยน้ำตาลแต่ละชนิดคือ กลูโคส (glucose) แมนนิทอล (manitol) อะราบิโนส (arabinose) และไซโลส (xylose) อย่างละ 2 หลอด ปิดทับด้วยพาราฟินเหลวให้หนาประมาณ 2 เซนติเมตร 1 หลอด อีกหลอดไม่ต้องปิดทับพาราฟินเหลว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการเกิดแก๊สให้สังเกตจากโพรงแก๊สในหลอดอาหาร และการเกิดกรดสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

11. การเจริญใน 7.5 % NaCl (growth in 7.5 % NaCl)

ขีดเชื้อ *Bacillus* spp. อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนอาหาร NA slant ที่ผสม 7.5 % NaCl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง หาก *Bacillus* spp. เจริญได้แสดงว่าเชื้อสามารถทนต่อเกลือที่ 7.5 % ได้

12. การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

ขีดเชื้อ *Bacillus* spp. อายุ 24 ชั่วโมง ลงบน starch agar บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน หยดลูกอล ไอโอดีน (lugol's iodine) ลงบนอาหาร หากเกิดบริเวณใสหลังหยดแสดงว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถย่อยแป้งได้ อ่านผลเป็นบวก

วิธีการเตรียม McFarland Standard

barium chloride	0.05 M	$BaCl_2$ (1.175 % w/v $BaCl_2.2H_2O$)
sulfuric acid	0.36 N	H_2SO_4 (1 % v/v)

วิธีการเตรียม McFarland เบอร์ต่าง ๆ

No.	barium chloride (ml)	sulfuric acid (ml)	x 10^8 cfu/ml
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1	9	30

ที่มา : พรรณเพ็ญ เหมมณี (2549)

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 วิเคราะห์ความแปรปรวนระดับความรุนแรงของโรคใบจุดถั่วฝักยาว ในเรือนทดลอง

Source	df	SS	MS	F value
Treatment	4	1.9421	0.4855	10.72**
Error	10	0.4530	0.0453	
Total	14	2.3951		

C.V. 29.78 %

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 2 วิเคราะห์ความแปรปรวนระดับความรุนแรงของโรคราแป้งถั่วฝักยาว ในเรือนทดลอง

Source	df	SS	MS	F value
Treatment	4	15.2133	3.8033	12.77**
Error	10	2.9775	0.2977	
Total	14	18.1908		

C.V. 24.72 %

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 3 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณผลผลิตถั่วฝักยาวในเรือนทดลอง

Source	df	SS	MS	F value
Treatment	4	105191.34	26297.84	0.29^{ns}
Error	10	913996.63	91399.66	
Total	14	1019188.02		

C.V. 44.81 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 4 วิเคราะห์ความแปรปรวนระดับความรุนแรงของโรคใบจุดถั่วฝักยาวนอกเรือนทดลอง

Source	df	SS	MS	F value
Treatment	4	2.6773	0.6693	6.78**
Error	10	0.9866	0.0986	
Total	14	3.6640		

C.V. 21.22 %

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 5 วิเคราะห์ความแปรปรวนระดับความรุนแรงของโรคราสนิมถั่วฝักยาวนอกเรือนทดลอง

Source	df	SS	MS	F value
Treatment	4	3.7866	0.9466	14.20**
Error	10	0.6660	0.0666	
Total	14	4.4533		

C.V. 20.38 %

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 6 วิเคราะห์ความแปรปรวนระดับความรุนแรงของโรคราแป้งถั่วฝักยาวนอกเรือนทดลอง

Source	df	SS	MS	F value
Treatment	4	16.8640	4.2160	19.05**
Error	10	2.2133	0.2213	
Total	14	19.0773		

C.V. 21.51 %

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 7 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณผลผลิตถั่วฝักยาวนอกเรือนทดลอง

Source	df	SS	MS	F value
Treatment	4	238756.66	59689.16	0.89^{ns}
Error	10	674083.33	67408.33	
Total	14	912840.00		

C.V. 24.19 %

ns มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 8 วิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ($x10^4$ cfu/g) ในสัปดาห์ที่ 1 (พ่นทุก 7 วัน)

Source	df	SS	MS	F value
Treatment	2	3488.00	1744.00	57.49**
Error	6	182.00	30.33	
Total	8	3670.00		

C.V. 18.99 %

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 9 วิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ($x10^4$ cfu/g) ในสัปดาห์ที่ 2 (พ่นทุก 7 วัน)

Source	df	SS	MS	F value
Treatment	2	1840.22	920.11	22.81**
Error	6	242.00	40.33	
Total	8	2082.22		

C.V. 28.29 %

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 10 วิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ($x10^4$ cfu/g) ในสัปดาห์ที่ 3 (พ่นทุก 7 วัน)

Source	df	SS	MS	F value
Treatment	2	2559.74	1279.87	133.57**
Error	6	57.49	9.58	
Total	8	2617.23		

C.V. 16.31 %

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 11 วิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ($x10^4$ cfu/g) ในสัปดาห์ที่ 4 (พ่นทุก 7 วัน)

Source	df	SS	MS	F value
Treatment	2	131.55	65.77	19.10**
Error	6	20.66	3.44	
Total	8	152.22		

C.V. 28.31 %

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ $p \leq 0.01$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวศุภลักษณ์ มณีแสง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4842047

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช)	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	2547