การคัดเลือกและการเตรียมสูตรสำเร็จ *Bacillus subtilis* เพื่อควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจาก *Alternaria longipes* ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

Screening and Preparation of *Bacillus subtilis* Formulation for Control Leaf Spot Disease Caused by *Alternaria longipes* of Lettuce in Hydroponic Condition.

วานิด รอดเนียม

Wanit Rotniam

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Soil Resources Management
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกและการเตรียมสูตรสำเร็จ *Bacillus subtilis* เพื่อควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจาก *Alternaria longipes* ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

ผู้เขียน นางสาววานิด รอดเนียม

สาขาวิชา การจัดการทรัพยากรดิน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	**คณะกรรมการสอบ**
.....	.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู)	(รองศาสตราจารย์ ดร.จำเป็น อ่อนทอง)
	.....กรรมการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(รองศาสตราจารย์ ดร.ฤดีกร วิวัฒนปฐพี)
.....	.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร)	(ดร.ภวิกา บุณยพิพัฒน์)
	.....กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู)
	.....กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกและการเตรียมสูตรสำเร็จ *Bacillus subtilis* เพื่อควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจาก *Alternaria longipes* ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์
ผู้เขียน	นางสาววานิด รอดเนียม
สาขาวิชา	การจัดการทรัพยากรดิน
ปีการศึกษา	2552

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคใบจุดในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ และเตรียมเป็นสูตรสำเร็จรูปแบบแกรนูลละลายน้ำสำหรับพ่นเพื่อควบคุมโรคใบจุด โดยแยกเชื้อรา *Alternaria* spp. จากตัวอย่างผักสลัดที่แสดงอาการโรคใบจุดจากแปลงปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ในพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ ของประเทศไทย จำนวน 14 ฟาร์ม ด้วยวิธี tissue transplanting method ได้ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ LRC 4-6 ก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด ซึ่งจำแนกชนิดได้เป็น *Alternaria longipes* และทำการแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 356 สายพันธุ์ ด้วยวิธี soil dilution plate method จากตัวอย่างดินป่าสมบูรณ์ของประเทศไทย มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA พบว่าสามารถคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพได้ดี 18 สายพันธุ์ และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราด้วยอาหาร PDA double strength และทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์โดยผสมส่วนใสกับสปอร์เชื้อรา พบว่า *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ LPDD 3-1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด โดยให้ผลการยับยั้งเส้นใยเชื้อราทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อนได้สูงถึง 97.6 และ 95.6 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ 91.6 และ 86.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย germ tube ของสปอร์ที่งอกออกมามีลักษณะผิดปกติอย่างชัดเจนคือสั้นกุดและโป่งพอง

การพัฒนาสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ สามารถผลิตสูตรสำเร็จได้ 5 สูตร ด้วยวิธี wet granulation เมื่อประเมินผลสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของสูตรสำเร็จแกรนูลพบว่า สูตรสำเร็จที่ 1 (sodium alginate 12.5 เปอร์เซ็นต์ PVP(k-30) 12.5 เปอร์เซ็นต์ lactose monohydrate 75 เปอร์เซ็นต์ และสปอร์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 ปริมาณ 4.4 x 10^{15} cfu) มีคุณสมบัติที่เหมาะสำหรับพ่นเพื่อควบคุมโรคใบจุดในผักสลัด โดยสามารถละลายน้ำได้ดี สารละลายที่ได้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง ให้ค่าความหนืดสูง (18.90 cps) มีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดบนใบผักสลัดสูงหลังจากพ่นเป็นเวลา 10

วัน และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 เดือน มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในสูตรสำเร็จในปริมาณสูงและค่อนข้างคงตัว (10^9 cfu ต่อกรัม) และสารละลายของสูตรสำเร็จมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำสูตรที่ 1 ต่อการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในโรงเรือนไฮโดรโพนิกส์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design) มี 9 กรรมวิธีการทดลอง 5 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่าการพ่นสูตรสำเร็จแกรนูลก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุ 1 วัน และพ่นซ้ำหลังจากปลูกเชื้อรา เป็นเวลา 3 และ 5 วัน สามารถควบคุมโรคใบจุดบนผักสลัดได้ดี โดยให้เปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรคต่อต้นในผักสลัดกรีนโอ๊ค เรดคอรัล และบัตเตอร์เฮด เท่ากับ 20.0 19.4 และ 22.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลดลงจากชุดควบคุมถึง 53.2 57.9 และ 65.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่งผลให้สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของผักจากชุดควบคุมได้สูงถึง 57.1 43.4 และ 49.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Thesis Title	Screening and Preparation of *Bacillus subtilis* Formulation for Control Leaf Spot Disease Caused by *Alternaria longipes* of Lettuce in Hydroponic Condition.
Author	Miss Wanit Rotniam
Major Program	Soil Resources Management
Academic Year	2009

ABSTRACT

The objective of this study was to select and test the efficacy of *Bacillus* spp. antagonist in inhibiting the growth of *Alternaria* spp., the causal agent of lettuce leaf spot disease in hydroponic farms and to prepare the fresh cells of *Bacillus* spp. into a water-soluble granule for spray application to suppress leaf spot disease. Fifteen isolates of *Alternaria* spp. were isolated from leaf spot disease samples of lettuce obtained from 14 hydroponic farms in several provinces of Thailand using tissue transplanting method. *Alternaria longipes* (isolate LRC 4-6) was the most virulent strain to the lettuce plants, comparing to other isolates when pathogenicity test was undertaken. A total of 356 isolates of *Bacillus* spp. were isolated from forest soil samples in Thailand using soil dilution plate method. These *Bacillus* spp. isolates were screened to detect their effectiveness in inhibiting mycelial growth of *A. longipes* LRC 4-6 using dual culture technique on PDA medium. Eighteen isolates of *Bacillus* spp. showed the potential in antagonizing *A. longipes* LRC 4-6, based upon their effect on inhibiting a mycelial growth and spore germination. *Bacillus subtilis* isolate LPDD 3-1, was the most effective in inhibiting mycelial growth (with 97.6% and 95.6% reduction) when sterilized and non-sterilized supernatant was incorporated into the PDA double strength medium respectively. This bacterium also was the most effective in inhibiting spore germination (with 91.6% and 86.3% reduction) when spores were suspended in water mixed with either sterilized or non-sterilized supernatant respectively. Moreover, the conidia treated with these supernatants had obvious abnormal morphology with shortened germ tubes and cell swelling.

Subsequently, five water-soluble granule formulations were successfully prepared using wet granulation method. The suitable and applicable formulation composed of sodium alginate (12.5%), PVP (k-30) (12.5%), lactose monohydrate (75%) and *B.*

subtilis LPDD 3-1 endospore suspension (at 4.4 x 10^{15} cfu). This formulation exhibited good physical characteristics with high solubility, high viscosity (at 18.90 cps) and neutral pH. Sprayed upon a lettuce leaf, the bacterial population still remained high when a number of the bacterium was assessed 10 days after application. After being stored for 6 months, a number of the bacterium in the formulation was at 10^{9} cfu/g (at 26-30^{o}C). Under laboratory condition, an aqueous solution of the formulation showed high activity in inhibiting mycelial growth of *A. longipes* LRC 4-6 (with more than 95 % reduction).

The testing to determine the efficacy of the water-soluble granule formulation under hydroponic greenhouse condition was arranged in a completely randomized design (with 9 treatments and 5 replications). It was found that spraying the formulation 1 day before pathogen inoculation, followed by spraying the formulation again at 3 and 5 day after pathogen inoculation, had high potential for deterring and suppressing the development of lettuce leaf spot disease. After spraying the lettuces with the developed formulation, % leaf with disease symptom/plant in green oak, red coral and butter head was at 20.0%, 19.4% and 22.7% respectively, with the reduction in % leaf with disease symptom/plant at 53.2% (for green oak), 57.9% (for red coral) and 65.9% (for butter head) when comparing with the non-treated control. The effect of the spray also increased the percentage of fresh weight of the lettuces at 57.1% (for green oak), 43.4% (for red coral) and 49.7% (for butter head).

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ที่ได้กรุณาสนับสนุนวิทยานิพนธ์ด้วยการให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดในด้านต่างๆ ตลอดจนช่วยตรวจสอบ แก้ไขและชี้แนะแนวทาง จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จำเป็น อ่อนทอง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ฤดีกร วิวัฒนปฐพี และ ดร.ภวิกา บุณยพิพัฒน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และทุนบัณฑิตศึกษาสงขลานครินทร์ ผู้เขียนขอขอบพระคุณยิ่ง

ขอขอบคุณภาควิชาธรณีศาสตร์ และศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ (ภาคใต้) คณะทรัพยากรธรรมชาติ และคณะเภสัชศาสตร์ ที่กรุณาสนับสนุนในด้านสถานที่ทำวิจัย ขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาธรณีศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านงานธุรการ และขอบคุณ คุณปฐมพงศ์ วงษ์เลี้ยง คุณยาวารียะห์ สาเมาะ และคุณอมรรัตน์ ชุมทอง ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานทดลอง

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ที่ให้การอบรมเลี้ยงดู และส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดี อีกทั้งเป็นแรงผลักดันที่สำคัญให้ผู้เขียนมีกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา ส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

วานิด รอดเนียม

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการตารางภาคผนวก	(11)
รายการภาพ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	21
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	22
วัสดุและสารเคมี	22
อุปกรณ์	22
วิธีการทดลอง	23
3. ผลการทดลอง	34
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	62
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	74
เอกสารอ้างอิง	77
ภาคผนวก	87
ประวัติผู้เขียน	98

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	คุณค่าทางอาหารของผักสลัด	8
2.	การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* spp.	17
3.	สารประกอบของสูตรสำเร็จแกรนูลละลายน้ำ	29
4.	จำนวนสายพันธุ์เชื้อรา *Alternaria* spp. ทั้งหมดที่แยกได้จากพื้นที่ต่าง ๆ	35
5.	สายพันธุ์เชื้อ *Alternaria* spp. ที่คัดเลือกได้จากผักสลัดในพื้นที่ต่าง ๆ	35
6.	ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Alternaria* spp. บนผักสลัดแต่ละชนิด	36
7.	จำนวนสายพันธุ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างดินป่าสมบูรณ์ชนิดต่าง ๆ	39
8.	บริเวณยับยั้งระหว่างเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 และแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.	41
9.	ประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อและนึ่งฆ่าเชื้อต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6	44
10.	ประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อและนึ่งฆ่าเชื้อต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6	45
11.	การทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1	47
12.	ความสามารถในการละลายน้ำของสูตรสำเร็จแกรนูลที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์	49
13.	ความเป็นกรด-ด่างของสูตรสำเร็จแกรนูลที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์	50
14.	ความหนืดของสูตรสำเร็จแกรนูลที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์	50
15.	ปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูล	51
16.	ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรต่าง ๆ ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6	52
17.	ปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 บนใบผักสลัด หลังจากพ่นด้วยสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 1 4 7 และ 10 วัน	53

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

18. ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรต่าง ๆ ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6..... 56
19. เปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรคและการลดลงของใบที่เป็นโรคใบจุดของผักสลัดในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในโรงเรือนไฮโดรโพนิกส์..... 59
20. เปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายใบและการลดลงของดัชนีการทำลายใบจุดของผักสลัดในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในโรงเรือนไฮโดรโพนิกส์..... 60
21. น้ำหนักสดและเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดของผักสลัดในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในโรงเรือนไฮโดรโพนิกส์..... 61

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

1. ปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูล หลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน..... 97

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	ผักสลัดใบชนิดกรีนโอ๊ค เรดคอรัล และเรดโอ๊ค.....	7
2.	ผักสลัดห่อชนิดบัตเตอร์เฮดและสลัดคอส.....	7
3.	ลักษณะอาการโรคใบจุดในผักสลัดบัตเตอร์เฮดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์.....	11
4.	วงจรชีวิตของเชื้อรา *Alternaria* spp.	12
5.	การปลูกผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์แบบระบบเปิดหรือสภาพกลางแจ้ง.....	13
6.	ลักษณะอาการโรคใบจุดในผักสลัดบัตเตอร์เฮดที่เกิดจากเชื้อรา *Alterneria* sp. สายพันธุ์ LRC 4-6.....	36
7.	เชื้อรา *Alternaria longipes* (Ellis & Everh) Mason (ก) ลักษณะเส้นใยเชื้อรา (ข) ลักษณะสปอร์ (conidia) กำลังขยาย 400 เท่า	37
8.	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เมื่อแยกด้วยวิธี soil dilution plate method ที่ระดับการเจือจาง 10^{-4}.....	38
9.	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria longipes* LRC 4-6 โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1.....	40
10.	ลักษณะจุลสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria longipes* LRC 4-6 เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1.....	40
11.	ขนาดโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria longipes* LRC 4-6 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA double stren□th ที่ผสมสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD 3-1 (ก) ชุดควบคุม (ข) สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ (ค) สารปฏิปักษ์นึ่งฆ่าเชื้อ...	46
12.	ลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria longipes* LRC 4-6 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB ที่ผสมสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1	46
13.	(ก) ผลิตภัณฑ์สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลสูตรที่ 1 (ข) ลักษณะจุลสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรที่ 1.....	48
14.	ลักษณะการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Alternaria longipes* LRC 4-6 โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูล เมื่อทดสอบโดยวิธี pour plate ด้วยอาหาร PDA วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน.....	52

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

15. (ก) ลักษณะการติดบนใบของสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรที่ 1 หลังจากพ่นบนใบผักสลัดเรดคอรัล เป็นเวลา 7 วัน (ข) จุลสัณฐานวิทยาของสปอร์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* LPDD 3-1 บนใบผักสลัดเรดคอรัล..... 54

16. (ก) ลักษณะการติดบนใบของสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรที่ 1 หลังจากพ่นบนใบผักสลัดกรีนโอ๊ค เป็นเวลา 7 วัน (ข) จุลสัณฐานวิทยาของสปอร์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* LPDD 3-1 บนใบผักสลัดกรีนโอ๊ค..... 54

17. (ก) ลักษณะการติดบนใบของสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรที่ 1 หลังจากพ่นบนใบผักสลัดบัตเตอร์เฮด เป็นเวลา 7 วัน (ข) จุลสัณฐานวิทยาของสปอร์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* LPDD 3-1 บนใบผักสลัดบัตเตอร์เฮด..... 55

18. ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูลหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน..... 56

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์เป็นที่รู้จักและพัฒนาไปสู่การผลิตในเชิงการค้าแพร่หลายในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก สำหรับประเทศไทยการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์เชิงการค้ามีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เพราะเป็นระบบปลูกพืชที่มีประสิทธิภาพโดยการควบคุมการให้น้ำและธาตุอาหารให้เพียงพอกับความต้องการของพืช พืชจึงเจริญเติบโตเร็ว ให้ผลผลิตในปริมาณมาก และผลผลิตที่ได้มีความสม่ำเสมอ มีคุณภาพสูง สะอาดและปลอดภัยจากสารเคมี นอกจากนี้สามารถปลูกพืชได้อย่างต่อเนื่องตลอดทั้งปีในพื้นที่เดียวกัน และสามารถปลูกได้ในทุกสภาพพื้นที่ (โสระยา, 2543; ดิเรก , 2547) สำหรับพืชที่นิยมปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์เป็นพืชประเภทกินใบที่ใช้รับประทานในชีวิตประจำวันโดยเฉพาะผักสลัดหรือผักกาดหอม (lettuce) ได้แก่ กรีนโอ๊ค (green oak) เรดโอ๊ค (rea oak) เรดคอรัล (rea coral) บัตเตอร์เฮด (butter head) ฟิลเล่ไฮซ์เบิร์ก (filey iceberg) และสลัดคอส (cos) ซึ่งเป็นผักกินใบที่ผู้บริโภคให้การยอมรับเพิ่มขึ้น เนื่องจากในปัจจุบัน ผู้บริโภคมีความรู้และให้ความสำคัญต่อสุขภาพอนามัยโดยเลือกบริโภคผักที่สะอาดปลอดภัยจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และมีคุณค่าทางโภชนาการสูงมาใช้ในการบริโภค ดังนั้นปริมาณความต้องการผักที่มีคุณภาพ ปลอดภัยจากสารพิษตกค้าง และมีราคาที่เหมาะสมกับคุณภาพจึงเพิ่มตามไปด้วย (สัมฤทธิ์, 2538; ดิเรก, 2547) อย่างไรก็ตามการปลูกผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์ มักประสบปัญหาการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืช ทั้งนี้เนื่องจากเป็นระบบที่มีอุณหภูมิและความชื้นสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโรคพืชและการแพร่ระบาดของแมลง (Menzies *et al*., 1996) ซึ่งปัญหาการเข้าทำลายของโรคในพืชที่ปลูกระบบไฮโดรโพนิกส์ในประเทศไทย นอกจากโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. แล้ว (พรหมมาศ, 2548) ปัจจุบันพบโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* spp. ระบาดเข้าทำลายพืชโดยเฉพาะในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของผักสลัดลดลงเป็นอย่างมาก (ดิเรก, 2550; คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2550)

การควบคุมโรคโดยการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรายังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การตกค้างของสารเคมีในน้ำและดิน ทำให้ดินเสื่อมสภาพและก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และข้อจำกัดที่สำคัญอีกประการคือ การตกค้างของสารเคมีในผลผลิต ส่งผลให้เกิดความไม่ปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค จากข้อจำกัดดังกล่าว ทำให้มีการพยายามค้นคว้าหาวิธีการใหม่ ๆ มาใช้ควบคุมโรคพืชแทนการใช้สารเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

ด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ไม่ก่อโรค (Muslim *et al*., 2003) ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษาอย่างแพร่หลายเช่น ชวนพิศ (2549) พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Penicillium* sp. 075 และ *Fusarium* sp. 011 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดของทานตะวันได้ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Romeiro และคณะ (2005) พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus cereus* UFV-101 ที่แยกได้จากดินในแปลงปลูกมะเขือเทศ สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *A. solani*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* และ *Corynespora cassiicola* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคในมะเขือเทศได้ และ Siddiqui (2007) พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. Pa22 และ *Bacillus* sp. B28 ที่คัดแยกได้จากดินในแปลงปลูกข้าวสาลี สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. triticina* ในต้นข้าวสาลีได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลอง สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมเชื้อโรคพืชได้ดีและเป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นหลายประการได้แก่ ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคพืชได้ (Shogi, 1978) สามารถผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา เช่น ß-1,3-glucanase (Leelasuphakul *et al*., 2006) และสามารถผลิตสารระเหยที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไม่มีผลหรือมีผลข้างเคียงน้อยมากต่อพืชและสิ่งมีชีวิตอื่น (Shoda, 2000) และเป็นเชื้อที่สามารถพบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ และบริเวณรอบรากพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพดินป่าธรรมชาติ เช่น ป่าเบญจพรรณ ป่าดิบชื้น และป่าเต็งรัง เป็นต้น ป่าธรรมชาติเหล่านี้เป็นป่าที่มีความสมดุลของระบบนิเวศ ไม่ปนเปื้อนจากปุ๋ยเคมีและสารกำจัดศัตรูพืช มีความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ จึงมีโอกาสทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ อย่างไรก็ตามการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชให้มีประสิทธิภาพสูงนั้น รูปแบบและวิธีการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์นับเป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะกำหนดความสำเร็จของการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งรูปแบบผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ดีควรมีความคงตัว สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานาน สะดวกต่อการนำไปใช้และปลอดภัยต่อผู้ผลิตผู้บริโภค

ปัญหาการเข้าทำลายของโรคในพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ในประเทศไทยเป็นปัญหาที่มีความสำคัญและมีแนวโน้มรุนแรงขึ้นโดยเฉพาะในผักสลัด แต่มีรายงานการศึกษาการเข้าทำลายและการควบคุมโรคโดยชีววิธีน้อยมาก ส่วนใหญ่จะมีรายงานเกี่ยวกับอาการผิดปกติของพืชที่เกิดจากปัจจัยอื่น ดังนั้นการศึกษาการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ เป็นงานวิจัยที่น่าสนใจและควรได้รับการส่งเสริม เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมี ส่งผลให้ลดปริมาณการตกค้างของสารเคมีในผลผลิตและสิ่งแวดล้อม เกิดความปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค และเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถพัฒนาไปสู่การเกษตรที่ยั่งยืน ที่จะทำให้มนุษย์อยู่คู่กับธรรมชาติอย่างผสมกลมกลืนตลอดไป

2. การตรวจเอกสาร

2.1 การปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์

การปลูกพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์ได้ริเริ่มโดย W.F. Gericke ในปี พ.ศ 2473 เป็นเทคโนโลยีการปลูกพืชแบบไม่ใช้ดิน โดยปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีน้ำและปุ๋ยเป็นส่วนประกอบหรือปลูกบนวัสดุอื่นที่ไม่ใช่ดิน เช่น ทราย กรวด เวอร์มิคิวไลท์ เพอร์ไลท์ และขี้เลื่อย เป็นต้น เป็นระบบการปลูกพืชที่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากการสำรวจพื้นที่ปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์เชิงการค้าในประเทศต่าง ๆ ในปี พ.ศ 2544 พบว่ามีพื้นที่ปลูกประมาณ 125,000-156,250 ไร่ โดยประเทศเนเธอร์แลนด์มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด รองลงมาได้แก่ ประเทศสเปน แคนนาดา ฝรั่งเศส ญี่ปุ่น อิสราเอล เบลเยียม และนิวซีแลนด์ สำหรับประเทศไทยได้มีการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์เชิงการค้าเพื่อผลิตพืชผักที่มีคุณภาพในปริมาณที่แน่นอน สนองความต้องการของห้างสรรพสินค้า ภัตตาคาร โรงแรม ตลาดพืชผักปลอดสารพิษ การปลูกทดแทนพืชนำเข้าและปลูกเพื่อการส่งออก โดยในปี พ.ศ 2547 มีการปลูกพืชในสารละลายธาตุอาหารประมาณ 130 ไร่ และปลูกด้วยวิธีการใช้วัสดุปลูกประมาณ 100 ไร่ มีปริมาณผลผลิตวันละ 12 ตัน คิดเป็นมูลค่า 314 ล้านบาทต่อปี (ดิเรก, 2547)

การปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ เป็นระบบการปลูกพืชที่ให้ผลผลิตสูง พืชเจริญเติบโตเร็ว มีความสม่ำเสมอ มีคุณภาพ สามารถปลูกในบริเวณพื้นที่ที่ดินไม่ดีหรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับการเจริญของพืชได้อย่างแน่นอน โดยเฉพาะในระดับรากพืชสามารถควบคุมปริมาณธาตุอาหาร ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และความเข้มข้นของออกซิเจน ซึ่งทำได้ยากในการปลูกพืชบนดินโดยทั่วไป นอกจากนี้การปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์สามารถปลูกพืชได้ต่อเนื่องตลอดทั้งปีในพื้นที่เดียวกัน ใช้พื้นที่ในการปลูกน้อย ลดต้นทุนด้านแรงงานและสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และข้อดีที่ถือว่าเป็นจุดแข็งของการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์คือ ผลผลิตที่ได้สะอาด ปลอดภัยจากสารพิษตกค้าง ซึ่งเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบันที่มีการตื่นตัวในเรื่องของอาหารปลอดภัย (Food safety) ส่งผลให้คำนึงถึงคุณภาพของผลผลิตที่จะบริโภคมากขึ้น และผลผลิตที่ได้จากพืชระบบไฮโดรโพนิกส์มีความสวยงามน่ารับประทาน มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีรสชาติดี โดยเฉพาะผักสดจะมีความนุ่มและกรอบกว่าผักที่ปลูกบนดินตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์มีการลงทุนเริ่มต้นค่อนข้างสูง และผู้ปลูกต้องมีความรู้ ความชำนาญและประสบการณ์มากพอในการควบคุมดูแล (ถวัลย์, 2534; ดิเรก, 2547)

เทคโนโลยีการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ในปัจจุบัน ได้มีการพัฒนาขึ้นมาหลายรูปแบบ เพื่อให้เหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมแต่ละพื้นที่ ซึ่งสามารถแบ่งตามลักษณะการปลูกได้ 3 รูปแบบ คือ (ดิเรก, 2547)

2.1.1 การปลูกพืชในวัสดุปลูก (substrate culture) เป็นการปลูกพืชโดยใช้วัสดุปลูกแทนการปลูกด้วยดิน ซึ่งช่วยให้รากพืชยึดเกาะพยุงลำต้นให้ทรงตัวอยู่ได้ วัสดุที่ใช้ปลูกต้องมีการระบายน้ำและอากาศดี อุ้มน้ำได้พอเหมาะ โดยมีทั้งวัสดุอินทรีย์และวัสดุอนินทรีย์ เช่น แกลบ ขี้เลื่อย ขุยมะพร้าว กรวด ทราย ร็อควูด และเวอร์มิคิวไลท์ เป็นต้น โดยระหว่างปลูกต้องเติมสารละลายธาตุอาหารลงในวัสดุปลูก เพื่อให้พืชได้รับธาตุอาหารในการเจริญเติบโต

2.1.2 การปลูกพืชโดยให้รากลอยอยู่ในอากาศ (aeroponics) เป็นระบบที่มีการหมุนเวียนสารละลายธาตุอาหาร โดยปลูกในภาชนะที่มีการยึดต้นพืช ส่วนรากจะแขวนลอยในอากาศ อยู่ภายในกล่องหรือตู้ที่เป็นห้องมืด และพ่นสารละลายธาตุอาหารให้เป็นฝอยละเอียดแก่รากพืชเป็นระยะตามช่วงเวลาที่กำหนด ประเทศที่ใช้ระบบนี้ ได้แก่ ญี่ปุ่น สิงคโปร์ มาเลเซีย

2.13 การปลูกพืชในสารละลายธาตุอาหาร (liquid culture) เป็นระบบที่ได้รับความนิยมมากที่สุดและใช้ได้ดีในที่มีแดดจัด วิธีการปลูกโดยการนำรากพืชแช่ในสารละลายโดยตรง ซึ่งการปลูกพืชระบบนี้มีการพัฒนาหลายรูปแบบ ได้แก่ การปลูกแบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชเป็นแผ่นบางๆ บนรางปลูกอย่างต่อเนื่อง (Nutrient Film Technique : NFT) การปลูกแบบระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชไหลผ่านรากพืชแบบแผ่นหนาบนรางปลูกอย่างต่อเนื่อง (Nutrient Flow Technique : NFLT) การปลูกแบบระบบให้สารละลายธาตุอาหารในรางปลูกในระดับลึก (Deep Flow Technique : DFT) การปลูกแบบระบบให้สารละลายธาตุอาหารและอากาศไหลวนผ่านรากพืชในระดับลึกอย่างต่อเนื่องในรางปลูก (Dynamic Root Floating Technique : DRFT) และการปลูกแบบระบบให้สารละลายธาตุอาหารพืชท่วมสลับระบายออกอย่างต่อเนื่อง (Flood and Drain : FAD)

การปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ทั้งสามรูปแบบ อาจปลูกในสภาพโรงเรือนแบบปิดพืชที่ปลูกทั้งหมด หรือปลูกในโรงเรือนที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่เรียกกัน โดยทั่วไปว่า Evaporative Cooling System โรงเรือนลักษณะนี้ช่วยป้องกันโรคและแมลงได้ และช่วยลดอุณหภูมิในช่วงหน้าร้อนได้ดี แต่มีค่าใช้จ่ายในการผลิตที่สูงมาก หรืออาจปลูกในโรงเรือนที่มีหลังคาทรงสูงครอบคลุมแปลงปลูกพืช หรือโรงเรือนแบบมุ้งตาข่าย หลังคาเป็นพลาสติกใสกันแสงยูวี ด้านข้างบุด้วยตาข่ายกันแมลงและลม โรงเรือนลักษณะนี้จะกันฝนได้ดี แต่ในช่วงหน้าร้อน อุณหภูมิภายในโรงเรือนจะสูงมาก นอกจากนี้การปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์อาจปลูกนอกโรงเรือนหรือปลูกสภาพกลางแจ้ง (outdoor system) ซึ่งการปลูกลักษณะนี้ในช่วงหน้าร้อน พืชจะไม่ค่อยโตโดยเฉพาะผักสลัด เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงเกินไป การพรางแสงจะช่วยลดอุณหภูมิได้ระดับหนึ่ง แต่ยังสูงกว่าที่ผักสลัดจะเจริญเติบโตได้ จึงมีวิธีการแก้ไขโดยการให้น้ำแบบระบบพ่นฝอยเป็นละอองน้ำเล็กๆ ให้ทั่วบริเวณแปลงปลูก ซึ่งสามารถช่วยลดอุณหภูมิลงได้

2.2 ผักสลัด

ผักสลัดหรือผักกาดหอม (lettuce) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lactuca sativa* Linn. เป็นผักประเภทกินใบในวงศ์ Asteraceae (Compositae) มีถิ่นกำเนิดแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียนและเอเชีย เป็นผักที่ได้รับความนิยมในการบริโภคและปลูกมากในประเทศเขตหนาวและเขตร้อน ผักสลัดเป็นผักที่มีความต้องการบริโภคตลอดทั้งปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงเทศกาลต่าง ๆ และได้รับความนิยมมากในกลุ่มผู้รักสุขภาพ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นผักที่มีคุณค่าทางอาหารสูง เป็นแหล่งของวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย มีสารแอนติออกซิแดนท์หลายชนิด ช่วยป้องกันโรคมะเร็ง และมีเส้นใยช่วยให้ระบบขับถ่ายทำงานได้ดี นิยมรับประทานเป็นผักสดหรือใช้ในการประกอบอาหารได้หลายชนิด นอกจากนี้พบว่าร้อยละ 80 ของพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์เป็นผักสลัด ซึ่งจัดได้ว่าเป็นผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย ที่นับวันมีแนวโน้มความต้องการในปริมาณเพิ่มขึ้น (อนุรักษ์, 2542; ชำนาญ, 2550; ดิเรก, 2547)

2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ผักสลัดเป็นพืชฤดูเดียว รากเป็นระบบรากแก้วที่แข็งแรง มีลำต้นอวบสั้นและช่วงข้อถี่ ใบเจริญจากข้อเป็นกลุ่ม ใบมีลักษณะรูปร่างและสีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ บางพันธุ์มีสีแดงหรือน้ำตาล สีเขียวอ่อน สีเขียวปนเหลืองจนถึงสีเขียวแก่ พันธุ์ที่ห่อเป็นหัวมีใบหนา เนื้อใบอ่อนนุ่ม ใบจะห่อหัวอัดกันแน่นคล้ายกะหล่ำปลี ใบที่ห่ออยู่ข้างในจะเป็นมัน บางชนิดมีใบม้วนงอเปราะมีเส้นใบเห็นได้ชัด ขอบใบมีลักษณะเป็นหยัก ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีลักษณะเป็นช่อแบบ panicle ประกอบด้วยกลุ่มของดอกที่อยู่เป็นกระจุกตรงยอด แต่ละกระจุกประกอบด้วยดอกย่อย 15–25 ดอกหรือมากกว่า ก้านช่อดอกยาวประมาณ 2 ฟุต กลีบดอกสีเหลืองหรือสีขาวปนเหลือง ตรงโคนเชื่อมติดกัน รังไข่มี 1 ห้อง เกสรตัวเมียมี 1 อัน มีลักษณะเป็น 2 แฉก เกสรตัวผู้ 5 อัน รวมกันเป็นยอดยาวห่อหุ้มก้านเกสรตัวเมียและยอดเกสรตัวเมียไว้ ดอกจะบานช่วงเช้าและปิดในระยะเวลาสั้น โดยเฉพาะในช่วงที่อุณหภูมิต่ำ เมล็ดเป็นชนิดเมล็ดเดียว (achene) ซึ่งเจริญมาจากรังไข่อันเดียว เมล็ดจะมีเปลือกหุ้มเมล็ดบาง มีลักษณะแบนยาว หัวท้ายแหลมเป็นรูปหอก มีเส้นเล็ก ๆ ลาดยาวไปตามด้านยาวของเมล็ดที่ผิวเปลือกหุ้มเมล็ด เมล็ดมีสีเทาปนครีมความยาวของเมล็ดประมาณ 4 มิลลิเมตร และกว้างประมาณ 1 มิลลิเมตร (นิพนธ์, 2550)

2.2.2 ชนิดและพันธุ์ผักสลัด

ผักสลัดที่นิยมปลูกและบริโภคในปัจจุบัน สามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ตามลักษณะต้นและใบ (ชำนาญ, 2550; นิพนธ์, 2550)

2.2.2.1 ผักสลัดใบ (leaf lettuce หรือ loose leaf : *L. sativa* var crispa L.) เป็นผักสลัดที่นิยมปลูกและบริโภคกันทั่วไป ลักษณะต้นเป็นพุ่มเตี้ย มีใบมากเจริญเป็นกระจุก ใบจะ

กว้างและหยิกเป็นคลื่น เจริญเติบโตออกไปทางด้านบนและด้านข้าง ไม่ห่อเป็นหัว ทนต่ออากาศร้อนได้ดี สำหรับพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นชนิดที่มีสีเขียวทั้งต้น เช่น กรีนโอ๊ค (green oak) (ภาพที่ 1 ก) และชนิดที่มีสีน้ำตาลทั้งต้น เช่น เรดคอรัล (red coral) และเรดโอ๊ค (red oak) (ภาพที่ 1 ข และ ค)

2.2.2.2 ผักสลัดห่อ (head lettuce) เป็นผักสลัดที่ใบห่อเป็นหัว ซึ่งเกิดจากการที่ใบเรียงซ้อนกันหนามาก ผักสลัดห่อนี้แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดด้วยกันคือ

1) ผักสลัดชนิดห่อหัวแน่น (crisp head : *L. sativa* var capitata L.) มีลักษณะใบบาง กรอบ เปราะง่าย เห็นเส้นกลางใบชัดเจน ใบห่อเป็นหัวแน่นแข็งคล้ายกะหล่ำปลี เป็นชนิดที่นิยมกันมากในทางการค้าเพราะสามารถขนส่งได้สะดวก ผักสลัดชนิดนี้ ได้แก่ พันธุ์ Great lake, New york, Imperial และ Progress เป็นต้น

2) ผักสลัดชนิดห่อหัวไม่แน่น (Bibb) ลักษณะห่อเป็นหัวหลวม ใบอ่อนนุ่มและผิวใบมัน ใบไม่กรอบเหมือนชนิดห่อหัวแน่น ใบที่ซ้อนอยู่ข้างในมีลักษณะเหมือนถูกเคลือบด้วยน้ำมันคืออ่อนนุ่มและเป็นเมือกลื่น ๆ ใบข้างในซ้อนทับกันแน่นพอประมาณ สีเหลืองอ่อนคล้ายเนย (ภาพที่ 2 ก) เจริญเติบโตดีที่อากาศหนาวเย็น ไม่ทนทานต่ออากาศร้อน แต่อายุการเก็บเกี่ยวเร็วกว่าชนิดห่อหัวแน่น พันธุ์ที่นิยม เช่น บัตเตอร์เฮด (butterhead)

3) ผักสลัดชนิดห่อหัวหลวมค่อนข้างยาว (cos หรือ romaine) ลักษณะใบห่อเป็นรูปกลมยาวหรือรูปกรวย ลักษณะหัวคล้ายผักกาดขาวปลี ใบมีลักษณะยาวและแคบ ใบแข็ง (ภาพที่ 2 ข) นิยมกันมากในทวีปยุโรป แบ่งออกเป็น 2 พวก คือพันธุ์ที่มีหัวขนาดใหญ่ เช่น Paris White, White Heart เป็นต้น และพันธุ์ที่มีหัวขนาดเล็ก เช่น Little Gem

2.2.2.3 ผักสลัดต้น (stem lettuce : *L. sativa* var asparagina) เป็นผักสลัดที่ปลูกเพื่อใช้ลำต้นรับประทานเท่านั้น มีลักษณะลำต้นอวบ ลำต้นสูง ใบเกิดขึ้นต่อ ๆ กันไปจนถึงยอดหรือช่อดอก ใบมีลักษณะคล้ายผักสลัดใบ แต่ใบเล็ก หนาและสีเข้มกว่า

ก

ข

ค

ภาพที่ 1 ผักสลัดใบชนิดกรีนโอ๊ค (ก) เรดคอรัล (ข) และ เรดโอ๊ค (ค)

ก

ข

ภาพที่ 2 ผักสลัดห่อชนิดบัตเตอร์เฮด (ก) และสลัดคอส (ข)

2.2.3 คุณค่าทางอาหาร

ผักสลัดเป็นผักที่มีคุณค่าทางอาหารสูง โดยเฉพาะผักสลัดใบ ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารหลายชนิด เช่น วิตามินเอ วิตามินซี แคลเซียม เหล็ก โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น (ตารางที่ 1) มีสรรพคุณทางยาช่วยระงับความกระวนกระวาย การขับปัสสาวะและขับเสมหะ นอกจากนี้ผักชนิดนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) หลายชนิด เช่น โฟลิคแอซิค (folic acid) ลูตีน (lutein) และเบต้าแคโรตีน (beta-carotein) ซึ่งสารเหล่านี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะทำหน้าที่จับอนุมูลอิสระที่เข้าทำลายเซลล์จนเกิดความผิดปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง การบริโภคผักสลัดช่วยลดโอกาสที่จะเป็นมะเร็งได้ (สัมฤทธิ์, 2538; Hedges and Lister, 2005)

ตารางที่ 1 คุณค่าทางอาหารของผักสลัด

ปริมาณสารอาหารต่อ 100 กรัม	พันธุ์			
	butterhead	romaine	crisp head	loose leaf
โปรตีน (g)	1.2	1.3	1.9	1.3
คาร์โบไฮเดรต (g)	2.5	3.5	2.9	3.5
ไขมัน (g)	0.2	0.3	0.1	0.3
แคลเซียม (g)	35	68	20	68
เหล็ก (g)	2.0	1.4	0.5	1.4
วิตามิน A (I.U.)	970	1900	330	1900
ไทอามีน (mg)	0.06	0.05	0.06	0.05
ไรโบฟลาวิน (mg)	0.06	0.08	0.08	0.08
ไนอะซีน (mg)	0.3	0.4	0.3	0.4
กรดแอสคอร์บิค (mg)	8	18	6	18
beta-carotein (µg)	1987	3434	299	4495
Lotein & zeaxanthin (µg)	1223	2312	277	1724

ที่มา : ดัดแปลงจาก Lorenz and Maynard,1980 ; Hedges and Lister, 2005

2.2.4 สภาพแวดล้อมที่เหมาะต่อการเจริญเติบโต

2.2.4.1 แสง เป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช ดังนั้นพื้นที่ปลูกผักสลัดควรได้รับแสงแดดเต็มที่ตลอดวัน มีพลังงานแสงมากกว่า 150/cal/cm^2/day ความยาวของคลื่นแสงที่เหมาะต่อการงอกของเมล็ดอยู่ระหว่าง 650-690 นาโนเมตร ช่วงเวลาการให้แสงมีผลต่อการเจริญเติบโต โดยการเจริญเติบโตเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในช่วงเวลาการให้แสงที่ยาวนาน สำหรับประเทศไทยการปลูกผักสลัดในช่วงฤดูร้อนซึ่งมีความเข้มแสงสูง ช่วงแสงยาว ทำ

ให้ผักสลัดมีอัตราการเจริญเติบโตด้านลำต้นเพิ่มขึ้น ช่วงข้อยาว ใบชะงักการเจริญเติบโตทำให้ใบสั้น ดังนั้นการปลูกในช่วงฤดูร้อนควรพรางแสงให้ผักสลัด (สัมฤทธิ์, 2538; นิพนธ์, 2550)

2.2.4.2 อุณหภูมิ โดยทั่วไปผักสลัดต้องการอากาศอบอุ่น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 20-28 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิในเมืองไทยในช่วงหน้าร้อนจะสูงมาก โดยอุณหภูมิภายนอกโรงเรือนอาจสูงถึง 38 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิในโรงเรือนเมื่อปิดหมดอาจสูงถึง 40 องศาเซลเซียส ซึ่งผักสลัดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ จึงต้องทำการลดอุณหภูมิให้ต่ำลง ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การพรางแสงด้วยซาแรน การเปิดมุ้งด้านข้างหรือการพ่นละอองน้ำให้ทั่วโรงเรือน (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2550) การปลูกผักสลัดในสภาพที่มีช่วงแสงยาวและอุณหภูมิสูง ทำให้ช่อดอกเจริญเร็ว ส่งผลให้ผลผลิตมีคุณภาพต่ำ (นิพนธ์, 2550)

2.2.4.3 สารละลายธาตุอาหาร การปลูกผักในระบบไฮโดรโพนิกส์ ปัจจัยที่สำคัญคือสารละลายธาตุอาหาร โดยสูตรสารละลายธาตุอาหารที่จัดเป็นสูตรมาตรฐานและมักถูกนำมาดัดแปลงเพื่อให้เหมาะสมกับพืชชนิดต่างๆ มีหลายสูตร เช่น Knop's 1865, Sach's 1860, Shive's และ Hoagland's (มนูญ, 2544) ความเข้มข้นของสารละลายธาตุอาหารสามารถวัดในรูปของค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity หรือ EC) โดยค่าการนำไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับปลูกผักสลัดอยู่ระหว่าง 1.4-2.0 dSm^{-1} ถ้าสูงหรือต่ำกว่านี้จะส่งผลกระทบต่อพืช นอกจากนี้ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายธาตุอาหารก็เป็นปัจจัยสำคัญ ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของผักสลัดอยู่ในช่วง 5.8-6.2 (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2550)

2.2.5 การเก็บเกี่ยว

ผักสลัดมีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 38-45 วันหลังจากเพาะเมล็ด เก็บเกี่ยวขณะที่ใบยังอ่อน ไม่เหนียวกระด้าง ไม่แทงช่อดอก ไม่ควรเก็บเกี่ยวในระยะต้นแก่เพราะมีรสขม ควรเก็บในช่วงเช้าก่อนมีแสงแดดเพื่อลดอุณหภูมิในพืชและลดการคายน้ำ ผักสลัดเป็นพืชที่เน่าเสียง่าย เนื่องจากมีน้ำเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 90 และหลังจากเก็บเกี่ยวจะมีอัตราการคายน้ำและการหายใจสูงทำให้สูญเสียน้ำและเหี่ยวได้เร็ว ดังนั้นคุณภาพของผักสลัดขึ้นอยู่กับความรวดเร็วในการลดอุณหภูมิก่อนเก็บรักษาหรือก่อนการขนส่ง (นิพนธ์, 2550)

2.3 โรคใบจุด

2.3.1 เชื้อรา *Alternaria* spp.

Alternaria spp. จัดเป็นเชื้อราสาเหตุที่แพร่ระบาดก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชหลายชนิดได้แก่ พืชจำพวกผัก เช่น ผักคะน้า กะหล่ำดอก ผักกาดขาว แครอท บล็อกโคลี มันฝรั่ง ผักสลัด และพืชพวกไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับ (Simmons, 1997) เชื้อรา *Alternaria* spp. มีการ

จำแนกหมวดหมู่ทางวิทยาศาสตร์ (Classification) ดังนี้ (Agrios, 1997)

Kingdom	Mycetae
Division	Eumycota
Sub-Division	Deuteromycotina
Class	Hyphomycetes
Order	Hyphales (Moniliales)
Family	Dematiaceae
Genus	*Alternaria*

ราสกุล *Alternaria* spp. ขยายพันธุ์โดยการสร้างสปอร์หรือโคนิเดีย (conidia) ที่มีลักษณะรูปร่างเป็นรูปไข่ (ovoid) กระบองหัวกลับ (obclavate) หรือรูปทรงกระบอก (cylindrical) อาจมีส่วนปลายยื่นเป็นจงอยที่เรียกว่า rostrate ซึ่งมีลักษณะสีซีดจนถึงสีน้ำตาลอมเขียว รูปร่างอ้วนสั้นหรือยาวมากคล้ายเส้นด้าย (filifrome) ผนังเรียบหรือขรุขระ (verruculose) สปอร์มีผนังกั้นทั้งตามยาวและตามขวาง แบ่งออกเป็นเซลล์ย่อย ๆ หลายเซลล์ไปจนถึง beak การเกิดสปอร์จะเกิดเดี่ยว ๆ เพียงเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์เชื่อมต่อกันเป็นสายหรือเป็นลูกโซ่ (catenulate) บนก้านโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ที่งอกออกมาจากเส้นใย ซึ่งก้านโคนิดิโอฟอร์อาจอยู่แบบเป็นกลุ่มแบบธรรมดาหรือลักษณะไม่แน่นอน บางครั้งแตกกิ่งก้านสาขา สีน้ำตาลอ่อนหรือสีน้ำตาลเข้ม conidiogenous cell (เซลล์ที่สร้างสปอร์) มีลักษณะไม่แตกต่างไปจากเซลล์อื่น สปอร์เกิดได้โดยที่ผนังกั้นชั้นในของ conidiogenous cell ดันทะลุผนังชั้นนอกออกมาคล้ายลูกโป่ง (enteroblastic) เมื่อสปอร์หลุดออกจากเซลล์แม่แล้ว คงเหลือรอยทิ้งไว้เป็นรูเล็ก ๆ ที่ผนัง บางครั้งมีเซลล์ใหม่เจริญออกมาใต้รอย พร้อมที่จะสร้างสปอร์ต่อไป ทำให้รูปร่างของ conidiogenous cell เรียงต่อคดงอไปมาตามสปอร์ที่เกิดใหม่อย่างต่อเนื่องจากบริเวณที่เหนือจุดกำเนิดเดิม (ศักดิ์, 2537; Agrios, 1997)

2.3.2 ลักษณะอาการของโรค

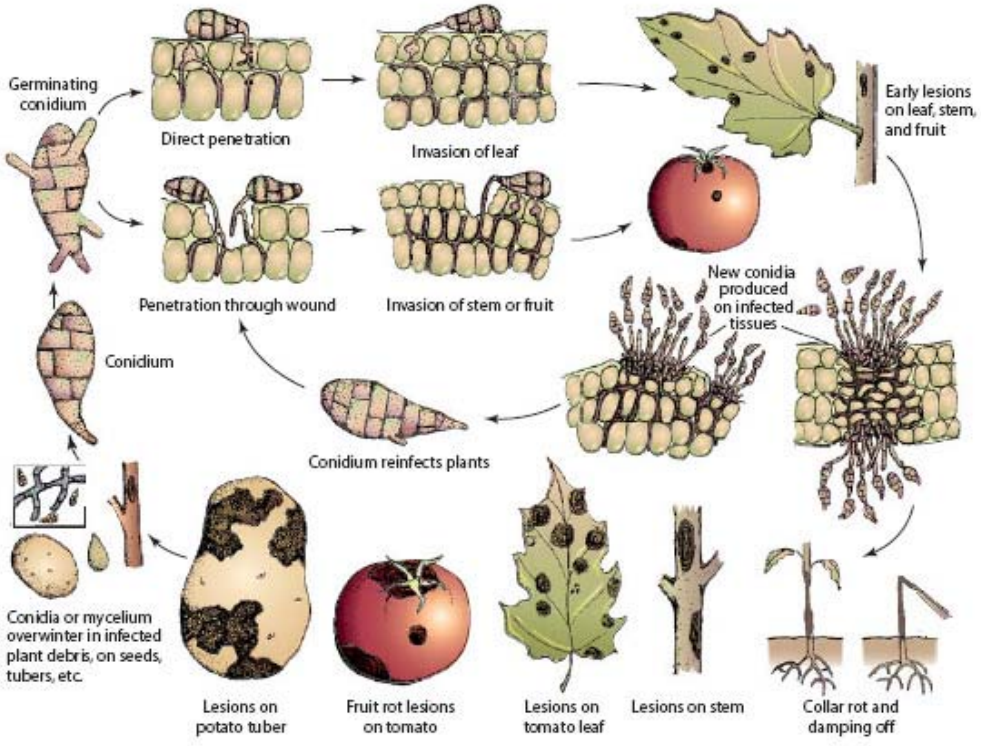
โรคใบจุดของผักสลัดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* spp. มักพบที่ใบแก่และใบล่างของต้น โดยอาการเริ่มแรกเกิดแผลจุดเล็กสีเหลืองขึ้นบนใบ ต่อมาแผลค่อย ๆ ขยายโตขึ้นเป็นแผลแห้งสีน้ำตาลเป็นวงค่อนข้างกลมเรียงซ้อนกันหลายวง เกิดขึ้นให้เห็นชัดเจนที่ด้านบนของใบ และบริเวณแผลอาจปรากฏจุดสีดำ ซึ่งเป็นกลุ่มของสปอร์เชื้อราที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์หรือแพร่กระจายเชื้อ ขนาดของแผลอาจเป็นเพียงจุดเล็ก ๆ จนโตมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 2-3 นิ้ว บนใบหนึ่ง ๆ อาจเกิดแผลเพียง 2-3 แผล หรือมากจนเต็มใบ ถ้าอาการรุนแรง จะเกิดอาการตายของเนื้อเยื่อระหว่างเส้นใบทำให้ใบแห้งตายในที่สุด (ศักดิ์, 2537; คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2550)

ภาพที่ 3 ลักษณะอาการโรคใบจุดในผักสลัดชนิดบัตเตอร์เฮดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

2.3.3 การระบาดของโรคใบจุดในผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์

จากการขยายตัวของพื้นที่ปลูกพืชในระบบการปลูกพืชแบบไฮโดรโพนิกส์ ทั้งฟาร์มที่เกิดขึ้นใหม่เพื่อทำเป็นธุรกิจการปลูกพืชระบบนี้โดยเฉพาะ และฟาร์มของเกษตรกรรายย่อยที่ปรับเปลี่ยนระบบการผลิตจากการปลูกพืชบนดินเป็นการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ หรือฟาร์มที่ปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ควบคู่กับการปลูกพืชบนดิน ทำให้พบการระบาดของโรคใบจุดเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในฟาร์มที่ปลูกแบบระบบเปิดหรือปลูกกลางแจ้ง เนื่องจากส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุสามารถแพร่ระบาดมายังแปลงปลูกได้ง่าย และในฟาร์มเก่าที่เคยมีการปลูกพืชตามปกติอยู่แล้ว โอกาสของการเกิดโรคยิ่งมีมากขึ้นเพราะเชื้อสาเหตุเริ่มต้นมีมากกว่าประกอบกับพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์มีความต้านทานต่อโรคพืชได้น้อยกว่าการปลูกพืชบนดิน เนื่องจากพืชมีความสม่ำเสมอทางพันธุกรรมเป็นเหตุให้เชื้อสาเหตุมีการปรับตัวและเข้าทำลายได้ง่าย นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบมีน้อย ทำให้ขาดสิ่งปกป้องตามธรรมชาติ (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2550) สำหรับการปลูกผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์ที่เกษตรกรนิยม คือการปลูกนอกโรงเรือนหรือปลูกในสภาพกลางแจ้ง ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะต่อการแพร่ระบาดของเชื้อรา *Alternaria* spp. เพราะเชื้อรานี้สามารถขยายพันธุ์และแพร่กระจายได้ง่าย โดยปลิวไปกับลม ติดไปกับแมลง น้ำฝน หรือน้ำที่ใช้ในระบบพ่นฝอย ก่อให้เกิดการระบาดหรือแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นหรือต้นข้างเคียงได้ เมื่อสปอร์เชื้อตกลงบนพืช เชื้อราจะงอก germ tube ออกมา และเจริญต่อไปเป็นเส้นใยเติบโตเข้าไปภายในพืช โดยผ่านช่องเปิดตามธรรมชาติ การเข้าทำลายเป็นไปอย่างช้า ๆ หากพืชแข็งแรงจะใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 8-10 วัน แต่ถ้าพืชอ่อนแอหรือมีแผลเกิดขึ้น เชื้อราอาจใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 4-5 วัน (ภาพที่ 4) โดยสภาพแวดล้อมที่เหมาะต่อการขยายพันธุ์และเข้าทำลายก่อให้เกิดโรคได้ดีคืออากาศมีความชื้นสูง เช่น ในช่วงที่มีหมอกน้ำค้างจัดหรือฝนตกติดต่อกันเป็นเวลานาน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะต่อการสร้างสปอร์อยู่ในช่วง 24-30 องศาเซลเซียส (ศักดิ์, 2537) นอกจากนี้การปลูกผักสลัดนอก

โรงเรือน สภาพแวดล้อมรอบ ๆ แปลงปลูกมีผลต่อการเกิดโรคใบจุดโดยเฉพาะต้นพืชและวัชพืชใต้โต๊ะปลูก (ภาพที่ 5) จะเป็นแหล่งอาศัยของเชื้อราสาเหตุได้ เนื่องจากโดยธรรมชาติเชื้อรา *Alternaria* spp. เกือบทุกชนิดเป็นทั้งพาราไซท์ (parasyte) และแซฟโปรไฟท์ (saprophyte) คืออาศัยเกาะกินเจริญเติบโตได้ทั้งบนพืชที่ยังมีชีวิตอยู่และตายแล้ว ด้วยเหตุนี้ในช่วงหน้าร้อนที่มีการให้น้ำระบบพ่นฝอยเพื่อลดอุณหภูมิแก่ผักสลัด ทำให้สปอร์เชื้อราติดไปกับน้ำพ่นฝอยกระจายไปอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการระบาดของโรคใบจุดทั่วทั้งแปลง



ภาพที่ 4 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Alternaria* spp.
ที่มา : Agrios, 2005

ภาพที่ 5 การปลูกผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์แบบระบบเปิดหรือสภาพกลางแจ้ง

การป้องกันกำจัดโรคใบจุด เกษตรกรโดยส่วนใหญ่ ป้องกันการเกิดโรคโดยดูแลกำจัดวัชพืชบริเวณรอบ ๆ แปลงปลูกให้สะอาด ใช้วัสดุเพาะกล้าที่สะอาดหรือผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลังเก็บเกี่ยว ทำความสะอาดโต๊ะปลูกและพ่นด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ หากพบการเข้าทำลายของโรค ทำการเก็บส่วนของพืชที่เป็นโรคไปเผาทำลายหรือฝังกลบโรยด้วยปูนขาว และถ้าพบการระบาดของโรคอย่างรุนแรง จะใช้สารฆ่าเชื้อราควบคุมโรค (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2550)

2.4 แบคทีเรีย *Bacillus* spp.

2.4.1 ลักษณะแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียอยู่ในวงศ์ Bacillaceae เป็นแซฟโปรไฟท์ มีรูปร่างเซลล์เป็นแท่งตรง (rod shape) หรือเกือบตรงขนาด 0.3 – 2.2 x 1.2 – 7.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก (gram-positive) หรืออาจเป็นบวกเมื่ออายุยังน้อย แต่เมื่อมีอายุมากจะติดสีแกรมลบ สร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (endospore forming) จำนวน 1 อันต่อ 1 เซลล์ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาแบบรอบตัว (lateral flagella) (ดวงพร, 2537) แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถพบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ อากาศ และส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ ลำต้น และบริเวณรอบรากพืช เจริญเติบโตเร็วประมาณ 24-48 ชั่วโมง และเจริญได้ดีในอุณหภูมิปกติ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง ดำรงชีวิตแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน เจริญได้ในอาหารหลายชนิด การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารแข็งโคโลนีมักมีรูปร่างกลม ผิวด้านหน้าทึบแสง มีสีครีมถึงสีน้ำตาล การเลี้ยงในอาหารเหลวทำให้อาหารมีสีคล้ำขึ้น ดำรงชีวิตอยู่ได้ยาวนานโดยการสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ เช่น ทนต่อความแห้งแล้ง ความร้อน รังสียูวี และตัวทำละลายอินทรีย์ (Obagwu and Korsten, 2003) สามารถผลิตสาร

ปฏิชีวนะประเภทเปปไทด์ ได้ประมาณ 168 ชนิด ซึ่งสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคพืชได้ (Shogi, 1978) และสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดที่สำคัญได้แก่ amylase และ protease เป็นต้น อีกทั้งไม่ก่ออันตรายหรือทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อคน สัตว์ หรือพืช (Boer and Diderichsen, 1991)

2.4.2 แบคทีเรีย *Bacillus* spp. กับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เหมาะสำหรับนำมาเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืช เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้โดยทั่วไปในดิน น้ำ อากาศ และส่วนต่าง ๆ ของพืชโดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อพืช สามารถแก่งแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน สร้างเอนโดสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี ทำให้ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่สะดวกต่อการนำไปใช้ นอกจากนี้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม extracellular hydrolytic enzymes ได้หลายชนิด เช่นไคตินเนส ไคโตซานเนส ไลเปส ลามินาลิเนส และโปรติเอส ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่างและมีความคงตัวในที่อุณหภูมิสูง (Priest, 1977) และสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถใช้ควบคุมเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด (Helisto *et al*., 2001; Gong *et al*., 2006) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ผลิตขึ้น เช่น bacillomycin iturin mycosubtilin bacilysin fengymycin และ mycobacillin เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีผลไปทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นดังนี้ (สมใจ, 2531; บัญญัติ, 2534)

(ก) ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์ไม่สามารถแบ่งตัวเพื่อการเจริญต่อไปได้

(ข) มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสารจะผ่านเข้าสู่เซลล์แบบ active transport ต้องใช้พลังงานและเยื่อหุ้มเซลล์จะทำหน้าที่ควบคุมการปล่อยสารบางอย่างออกนอกเซลล์ สารปฏิชีวนะที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์จะไปทำให้การนำสารเข้าสู่เซลล์และออกจากเซลล์ผิดปกติ ส่งผลให้เซลล์ตายได้

(ค) มีผลขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์โปรตีนเป็นกระบวนการที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตในการซ่อมแซมและเสริมสร้างเซลล์ เพื่อทำให้เซลล์เจริญ ดังนั้นหากไม่มีกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือกระบวนการถูกขัดขวาง จะส่งผลให้เซลล์หยุดชะงักการเจริญจนทำให้เซลล์ตายได้

(ง) มีผลขัดขวางหน้าที่ของกรดนิวคลีอิก กรดนิวคลีอิกเป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญในการควบคุมเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งหากมีการขัดขวางการทำงานของกรดนิวคลีอิก จะทำให้เมตาบอลิซึมของเซลล์ผิดปกติไปด้วย

(จ) มีผลขัดขวางการสร้างพลังงานของเซลล์ ทำให้กิจกรรมของเซลล์ลดลง ซึ่งส่งผลให้เซลล์จุลินทรีย์ตายได้

จากคุณสมบัติดังกล่าว จึงมีการนำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มาใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีอย่างแพร่หลาย โดยมีการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* RB14-C สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ iturin A และ surfactin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าในมะเขือเทศได้ (Asaka and Shoda, 1996; Szczech and Shoda, 2004) Bertagnolli และคณะ (1996) รายงานว่า *B. megaterium* B153-2-2 สามารถผลิตเอนไซม์ extracellular endoproteinase และ phospholipase ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* สาเหตุของโรครากเน่าในถั่วเหลือง

Intanoo และคณะ (2002) ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากผิวใบของผักคะน้า สามารถแยกแบคทีเรีย *B. cereus* และ *B. megaterium* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของผักคะน้าได้ โดยเกิดบริเวณยับยั้งขึ้นบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) และทำให้การเจริญของเส้นใยเชื้อราผิดปกติไป

Yoshida และคณะ (2001) ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากใบมัลเมอรี่ที่ไม่เป็นโรคมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum dematium* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของต้นมัลเมอรี่ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้สารปฏิปักษ์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมายับยั้งเชื้อราสาเหตุ ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้สารปฏิปักษ์ของ *B. amyloliquefaciens* RC-2 ก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุ สามารถยับยั้งเชื้อราดังกล่าวได้ นอกจากนั้นยังพบว่าสารปฏิปักษ์ของ *B. amyloliquefaciens* RC-2 สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Rosellinia necatrix*, *Pyricularia oryzae*, *Agrobacterium tumefaciens* และ *Xanthomonas axonopodis* pv. Campestris ทำให้บ่งชี้ได้ว่าสารประกอบในสารปฏิปักษ์ที่ยับยั้งเชื้อรามีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ และเมื่อนำสารประกอบดังกล่าวไปวิเคราะห์พบว่ามีสารที่สามารถยับยั้งเชื้อราคือ iturin A2

Collins และ Jacobsen (2003) ได้นำแบคทีเรีย *B. subtilis* BacB ที่แยกได้จากส่วนของต้นชูการ์บีทมาควบคุมโรคใบจุดในชูการ์บีทที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora beticola* ในสภาพแปลง ผลการทดลองพบว่าเมื่อพ่นสปอร์ของแบคทีเรียในอัตรา $1x10^6$ cfu ต่อมิลลิลิตร หรือในอัตราที่สูงกว่า สามารถลดความรุนแรงของโรคได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุอย่างเดียว

Okigbo และ Osuine (2003) ทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดินบริเวณใต้ต้นมะม่วงด้วยวิธี soil dilution spread plate สำหรับควบคุมเชื้อรา *Pestalotiopsis mangiferae*, *Botryodiplodia theobromae* และ *Macrophoma mangiferae* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดในมะม่วง โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองพบว่า *B. subtilis* NCIB 3610 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ได้ 57 61 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการศึกษาของอมรรัตน์ (2547) ได้คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดินในแปลงปลูกถั่วหรั่งและถั่วลิสงในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อนำมาควบคุมเชื้อรา *R. solani* ที่เป็นสาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพของ

สารปฏิปักษ์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ด้วยวิธีการ pour plate ด้วยอาหาร PDA double strength เปรียบเทียบระหว่างสารปฏิปักษ์ที่ไม่ผ่านและผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ผลการทดลองพบว่า *B. firmus* TRV 9-5-2 สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้สูงสุดทั้งที่ไม่ผ่านและผ่านความร้อน โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราเท่ากับ 97.3 และ 93.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lisboa และคณะ (2006) ทำการแยกจุลินทรีย์จากดินในพื้นที่ป่าไม้พื้นเมืองในประเทศบราซิล พบว่าแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* สามารถผลิตสาร bacteriocin ยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียได้

Leelasuphakul และคณะ (2006) ศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* NSRS 89-24 ที่แยกได้จากศูนย์วิจัยข้าวจังหวัดพัทลุง สามารถผลิตสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ ß-1,3-glucanase ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว และเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคใบไหม้ของข้าวได้ดี เมื่อทดสอบโดยวิธี dual culture technique บนอาหาร PDA และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียดังกล่าว ไปกรองและนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาผสมกับอาหารทดสอบและปลูกเชื้อราสาเหตุ ผลการทดลองพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียในส่วนที่กรองและส่วนที่นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้ดี

Thonglem และคณะ (2007) ศึกษาเพื่อหาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราสีเขียวของต้นส้มที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* โดยแยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากส่วนต่าง ๆ ของต้นส้มที่สมบูรณ์ แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งเส้นใยเชื้อราโดยวิธีการ spot test technique และทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราด้วยวิธีการ dise diffusion method พบว่าแบคทีเรีย *B. pumilus* W1L1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 21 มิลลิเมตร และสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 97.6 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

ศุภลักษณ์ (2551) ได้แยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดินรอบโคนต้นและใบถั่วฝักยาวจากแปลงปลูกในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อนำมาควบคุมเชื้อรา *C. cruenta*, *Uromyces vignae* และ *Oidium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคทางใบของถั่วฝักยาว ทำการแยกเชื้อด้วยวิธีการ dilution spread plate แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราโดยการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียผลิตได้มาผสมกับสปอร์ของเชื้อสาเหตุ ความเข้มข้น $1x10^6$ cfu ต่อมิลลิลิตร ใช้อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วตรวจสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา พบว่าแบคทีเรีย *B. megaterium* HT-NK-460 และ *B. brevis* TZ-CP-342 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราดังกล่าวได้สูงถึง 97.22-100 เปอร์เซ็นต์

Alvindia และ Natsuaki (2009) ได้คัดแยกแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* DGA 14 จากผิวของตัวอย่างผลกล้วย มาศึกษาการควบคุมเชื้อรา *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae* และ *F. verticillioides* สาเหตุโรค crown rot ในกล้วย ทำการศึกษาโดยเลี้ยง

แบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth (NB) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองเอาสารปฏิปักษ์มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุ พบว่าสารปฏิปักษ์ที่ *B. amyloliquefaciens* ผลิตขึ้น สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ดี

สำหรับการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Alternaria* spp. มีรายงานการใช้ *Bacillus* spp. สามารถควบคุมเชื้อรา *Alternaria* spp. ได้หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* spp.

สายพันธุ์ *Bacillus* spp.	พืช	เชื้อสาเหตุ	เอกสารอ้างอิง
B. subtilis	ทานตะวัน	*A. helianthi*	Kong *et al*., 1997
B. amyloliquefaciens	แครอท	*A. radicina*	Chen and Wu, 1999
B. subtilis และ	พริกหวาน	*A. alternata*	Sid *et al*., 2003
B. licheniformis			
B. cereus	มะเขือเทศ	*A. solani*	Romeiro *et al*., 2005
B. amyloliquefaciens	เบญจมาศเปอร์เซีย	*A. cosmosa*	Wu *et al*., 2007

2.4.3 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. กับการควบคุมโรคพืช

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชได้ดี แต่การศึกษาส่วนใหญ่ใช้แบคทีเรียในรูปของเซลล์สดที่มีความคงตัวต่ำ ไม่สะดวกในการนำไปใช้ เก็บรักษาได้ยากและระยะเวลาในการเก็บรักษาสั้น ซึ่งส่งผลให้ลดประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช จากข้อจำกัดดังกล่าว จึงมีการศึกษาพัฒนาแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ให้อยู่ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่สะดวกในการนำไปใช้และสามารถควบคุมโรคได้ดี โดย Marten และคณะ (1999) รายงานว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* B2g ซึ่งอยู่ในรูปแบบต่างๆ คือ รูปแกรนูล สารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) และคลุกเมล็ด (seed treatment) สามารถทำลายเชื้อรา *R. solani* และ *F. oxysporum* ได้ผลดี ขณะเดียวกันสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของทานตะวัน กะหล่ำปลี และแตงกวาได้ Arunyanart และคณะ (2001) พบว่าการใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย *B. subtilis* รูปแบบของเหลว สูตร TRF A และ B สามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ดีรองจากการใช้สารเคมี validacin และมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม Chiou และ Wu (2003) รายงานว่าผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* B190 ในรูปแบบผงแห้งและ emulsion สามารถควบคุมโรคราสีเทาที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytis elliptica* ในดอกลิลลี่ได้ดีทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง Wiwattanapatapee และคณะ (2004) พัฒนาแบคทีเรีย

B. megaterium ในรูปสปอร์ เป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบเพลเลตลอยน้ำ พบว่าสามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ในสภาพเรือนทดลองได้ผลไม่แตกต่างจากการใช้สารเคมี และต่อมานำไปพัฒนาเพิ่มเป็นรูปแบบแกรนูลละลายน้ำ เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพในสภาพแปลงนาข้าวพบว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ดีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี iprodione (Kanjanamaneesathian *et al*., 2007) นอกจากนี้ Pengnoo และคณะ (2006) ได้นำแบคทีเรีย *B. firmus* TRV 9-5-2 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกถั่วหรั่งและถั่วลิสง มาพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จรูปแบบผงคลุกเมล็ดที่มีส่วนประกอบของทัลคัม polyvinylpyrrolidone, sodium carboxymethylcellulose (SCMC) และสปอร์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ที่เป็นสาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง ได้ 97.4 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดถั่วหรั่ง และจากการศึกษาของ Kim และคณะ (2007) ได้พัฒนาแบคทีเรีย *B. licheniformis* N1 เป็นสูตรสำเร็จรูปแบบผงแห้งที่มีส่วนประกอบของแป้งข้าวโพด น้ำมันมะกอก และน้ำตาลซูโครส พบว่าสามารถลดการเกิดโรคราสีเทาที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* ของสตรอเบอรีได้ 81 เปอร์เซ็นต์

2.4.5 แบคทีเรีย *Bacillus* spp. กับความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายหรือมีอันตรายต่อคน สัตว์หรือพืชน้อยมาก (Boer and Diderichsen, 1991; Shoda, 2000) ยกเว้นบางชนิด เช่น *B. anthrasis* ซึ่งทำให้เกิดโรคแอนแทรกซ์ และ *B. cereus* ซึ่งเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษอันตรายที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในคนปกติพบมีรายงานน้อยมาก ส่วนใหญ่มักเกิดตามหลังการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อผิวหนังที่ได้รับการปนเปื้อนดิน ส่วนการติดเชื้อที่รุนแรงเข้าสู่กระแสเลือดจะพบเฉพาะในผู้ป่วยที่มีความบกพร่องในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ในทางตรงกันข้าม แบคทีเรีย *Bacillus* spp. กลับเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ค่อนข้างมาก เช่น เป็นแหล่งผลิตยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Gramicidin ผลิตจากแบคทีเรีย *B. brevis*, Baccitracin ผลิตจาก *B. licheniformis* และ *B. subtilis*, Polymyxin ผลิตจาก *B. polymyxa*, Subtilin และ Mersacidin ผลิตจาก *B. subtilis* (สุวีณา, 2538) นอกจากนี้มีการนำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคพืช ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมชีวนะในการเลี้ยงสัตว์ และผลิตภัณฑ์อาหารที่เกี่ยวกับสุขภาพ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากคือ ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติก (probiotic) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะสามารถปรับสมดุลของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสิ่งมีชีวิต ทำให้คนและสัตว์มีสุขภาพดีขึ้น จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีบทบาทสำคัญและเป็นที่นิยมใช้กันโดยแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ แต่กลับมีประโยชน์ในแง่ของการก่อให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ และสามารถป้องกันการเกิดท้องร่วง ท้องผูก การอักเสบของลำไส้ กระตุ้นระบบคุ้มกันและลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด จุลินทรีย์โพรไบโอติกนำมาใช้ประโยชน์กันหลายรูปแบบ ทั้งเป็นจุลินทรีย์ที่

อัดเป็นเม็ดหรือในรูปแบบแคปซูล และรูปแบบจุลินทรีย์โพรไบโอติกหัวเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อนำไปผสมกับผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่นนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์นมเพื่อทำน้ำนมเปรี้ยว โยเกิร์ต เป็นต้น (สุญาณี, 2549; สุภาพ, 2551; Walker and Duffy, 1998) มีแบคทีเรีย *Bacillus* spp. หลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกได้แก่ *B. subtillis* (Vaseeharan and Ramasamy, 2003) *B. cereus*, *B. clausii*, *B. pumilus* (Duc *et al*., 2004) *B. licheniformis* และ *B. coagulans* เป็นต้น และมีการนำแบคทีเรีย *B. subtillis* เป็นสารเสริมชีวนะทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อเร่งการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งทำให้กุ้งแข็งแรง และเจริญเติบโตได้ดี (Vaseeharan and Ramasamy, 2003) ตลอดจนการนำแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. licheniformis* มาประยุกต์ใช้ร่วมกับ *Lactobacillus acidophilus* ในการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกในโซเกิร์ต ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำนมถั่วเหลืองมาผ่านกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ (สุนิดาและบวรศักดิ์, 2551)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่ามีการนำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มาใช้เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับบริโภคทั้งในคนและสัตว์ได้อย่างปลอดภัย ดังนั้นการนำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มาใช้ควบคุมโรคพืชด้วยวิธีการพ่นลงไปโดยตรงบนใบผัก จึงมีความปลอดภัยสูงต่อผู้บริโภค อีกทั้งในการประกอบอาหารต่าง ๆ นั้น พืชผักที่นำมาประกอบอาหารต้องผ่านกระบวนการล้างทำความสะอาด เพื่อชะล้างสิ่งสกปรกต่าง ๆ รวมทั้งแบคทีเรียออกไป ซึ่งแบคทีเรียที่เกาะติดอยู่ที่ใบพืชเป็นเชื้อที่ล้างออกได้ง่าย เมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีที่เป็นประเภทดูดซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อ ซึ่งยากต่อการทำความสะอาด

2.5 สูตรสำเร็จรูปแบบแกรนูล

สูตรสำเร็จรูปแบบแกรนูล มีลักษณะเป็นผงยาขนาดใหญ่หรือผงยาที่เกาะกันเป็นก้อนเล็ก ๆ รูปร่างต่าง ๆ กัน มีขนาดประมาณ 2-4 มิลลิเมตร สูตรสำเร็จแกรนูลมีความคงตัวดีกว่ารูปแบบผง เพราะมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอากาศน้อยกว่า อีกทั้งไม่จับตัวเป็นก้อนแข็งเหมือนสูตรสำเร็จแบบผง เปียกน้ำได้ง่ายกว่า (อัจฉรา, 2536) และไม่ฟุ้งกระจาย ซึ่งสะดวกต่อการนำไปใช้ นอกจากนี้ขั้นตอนในการผลิตไม่ยุ่งยากและต้นทุนในการผลิตน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรสำเร็จแบบเม็ด จึงได้รับความสนใจในการพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูล เพื่อควบคุมโรคพืชอย่างแพร่หลาย โดยอมรรัตน์ (2547) ศึกษาพบว่าการใช้สูตรสำเร็จแบคทีเรีย *B. firmus* ในรูปแบบผงคลุกเมล็ดร่วมกับแกรนูลละลายน้ำสำหรับฉีดพ่นสามารถควบคุมและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* ที่เป็นสาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งได้ดีเช่นเดียวกับการใช้สารเคมี iprodione และส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นถั่วหรั่งได้ นอกจากนี้ Wiwattanapatapee และคณะ (2007) ได้พัฒนาแบคทีเรีย *B. megaterium* เป็นสูตรสำเร็จรูปแบบแกรนูลฟู่สำหรับหว่านหรือพ่น ซึ่งมีส่วนประกอบของ citric acid, tartaric acid และ sodium bicarbonate พบว่าสูตรสำเร็จดังกล่าวสามารถควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ที่เป็นสาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวใน

สภาพเรือนทดลองได้ดี มีแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่รอดบนใบและกาบใบข้าวสูงและมีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จสูงถึง 10^9 cfu ต่อกรัม หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 12 เดือน

2.6 สารประกอบสำหรับเตรียมสูตรสำเร็จ

ในการเตรียมสูตรสำเร็จเพื่อควบคุมโรคพืชนั้น นอกจากแบคทีเรียปฏิปักษ์แล้วยังประกอบด้วยสารช่วย (excipient) ซึ่งทำหน้าที่ต่าง ๆ กัน ได้แก่ สารเพิ่มปริมาณ (filler หรือ diluent) สารยึดเกาะ (binder) และสารช่วยแตกกระจายตัว (disintegrant)

2.6.1 สารเพิ่มปริมาณ

สารเพิ่มปริมาณเป็นสารที่เติมลงไปในสูตรสำเร็จเพื่อเพิ่มขนาดหรือน้ำหนักของแกรนูล โดยสารเพิ่มปริมาณต้องมีคุณสมบัติสามารถเข้ากันได้กับตัวยาและสารประกอบอื่นในสูตรสำเร็จ ไม่ดูดความชื้น มีการไหลที่ดี และทำให้แกรนูลมีความแข็งที่เหมาะสม มีการแตกตัวดี ตัวอย่างสารเพิ่มปริมาณ ได้แก่ lactose, sucrose, starch, calcium carbonate, mannitol, calcium sulfate, dibasic calcium phosphate, microcrystalline cellulose และ sorbitol เป็นต้น โดยเฉพาะ lactose เป็นสารเพิ่มปริมาณที่นิยมใช้มากที่สุดเพราะละลายน้ำได้ดี ไม่ดูดความชื้น ค่อนข้างคงตัว มีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลตัวอื่น และมีราคาถูกเมื่อเทียบกับสารเพิ่มปริมาณชนิดอื่น lactose เป็นน้ำตาลที่ได้จากการตกผลึกน้ำนมซึ่งเหลือจากการทำเนยแข็ง มีลักษณะเป็นผงหรือก้อน โดยสูตรสำเร็จที่มี lactose เป็นส่วนประกอบ จะมีข้อดีคือ แกรนูลที่ได้จะแห้งง่ายและมีการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์เร็ว มีความชื้นระหว่าง 4-5 เปอร์เซ็นต์ (ทัดทรง, 2534; ปราโมทย์, 2539)

2.6.2 สารยึดเกาะ

สารยึดเกาะเป็นสารที่ใส่เพื่อให้เกิดการยึดเกาะกันของสารประกอบ ทำให้เกิดการเกาะกันเป็นแกรนูลที่แข็งขึ้น มีขนาดตามต้องการ และได้แกรนูลที่มีความสม่ำเสมอ สารยึดเกาะที่ใช้มีหลายชนิด ทั้งที่เป็นพวกน้ำตาลและสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จากธรรมชาติ เช่น starch, sucrose, acacia, gelatin และ tragacanth และสารที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น polyvinylpyrrolidone (PVP), methyl cellulose เป็นต้น แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบันคือ PVP ซึ่งเป็นสารยึดเกาะที่ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา สามารถละลายได้ทั้งในน้ำ (ทัดทรง, 2534) และตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์และคลอโรฟอร์ม และยังสามารถเติมลงในตำรับในลักษณะของผงแห้งหรือทำเป็นสารละลาย 3-15 เปอร์เซ็นต์ได้ ปริมาณที่ใช้ในตำรับอยู่ในช่วง 1-5 เปอร์เซ็นต์ มีคุณสมบัติในการเป็นสารช่วยในการแตกตัวและมักใช้เป็นตัวนำสำหรับสีที่ละลายในน้ำ (ปราโมทย์, 2539) โดยทั่วไปการทำแกรนูลของผงยาที่ไม่ละลายน้ำควรใช้ PVP ในรูปสารละลายน้ำหรือน้ำผสมแอลกอฮอล์ ส่วนการทำแกรนูลยาที่ละลายน้ำควรใช้ PVP ในรูปละลายในแอลกอฮอล์ สาร PVP มีอิทธิพลต่อขนาด

และคุณสมบัติของแกรนูลที่ได้ เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้แกรนูลมีขนาดโตขึ้น แต่ไม่ทำให้เกิดการไหลดีขึ้น (ทัดทรง, 2534)

2.6.3 สารช่วยแตกกระจายตัว

เป็นสารช่วยให้แกรนูลเกิดการแตกตัวหรือกระจายตัวได้ในเวลาอันสมควร เมื่อแกรนูลสัมผัสกับสารละลายหรือน้ำ การผสมสารช่วยในการแตกตัวทำได้โดยผสมในขั้นตอนก่อนทำเป็นแกรนูล ตัวอย่างของสารที่ช่วยในการแตกตัว เช่น

starch เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี หรือมันฝรั่ง โดยทั่วไปถ้าหากยิ่งมีปริมาณของ starch ในตำรับมาก ยิ่งทำให้มีการแตกตัวที่เร็วขึ้น แต่จะมีปัญหาตามมาคือการเกาะตัวกันและความแข็งของแกรนูลจะลดน้อยลง

alginate เป็นสารช่วยในการแตกตัว อยู่ในกลุ่ม hydrophilic colloid substance จากสาหร่ายทะเล มีจำหน่ายในรูปของ alginic acid หรือเกลือของ alginic acid โดยเฉพาะในรูปของเกลือ sodium alginate มีคุณสมบัติในการชอบน้ำมากกว่าพวกแป้ง ปริมาณที่ใช้ในตำรับนั้นสำหรับ alginic acid จะใช้ในปริมาณ 1–5 เปอร์เซ็นต์ ส่วน sodium alginate 2.5–10 เปอร์เซ็นต์ (จักรพันธ์, 2538)

3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

3.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

3.2 เพื่อพัฒนาสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ สำหรับควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

3.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1.วัสดุ

1.1 วัสดุที่ใช้ในการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์

1.1.1 เมล็ดพันธุ์ผักสลัด

1.1.2 ฟองน้ำเพาะต้นกล้า

1.1.3 กระดาษโฟม

1.1.4 สารละลายธาตุอาหารพืช (ภาคผนวก ก)

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมเองตามสูตร (ภาคผนวก ก)

1.2.1 potato dextrose agar (PDA)

1.2.2 potato dextrose broth (PDB)

1.2.3 PDA double strength

1.2.4 potato carrot agar (PCA)

1.2.5 nutrient agar (NA)

1.3 สารเคมี

1.3.1 สารฆ่าเชื้อราแมนโคแซบ (mancozeb)

1.3.2 น้ำตาลแลคโตส (lactose monohydrate)

1.3.3 sodium alginate

1.3.4 polyvinylpyrrolidone (PVP (k-30))

1.3.5 สารเคมีสำหรับทดสอบการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก)

2. อุปกรณ์

2.1 จานเพาะเชื้อ (peri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

2.2 ขวดรูปชมพู่ (erlenmayer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.3 หลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร

2.4 ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar air flow cabinet)

2.5 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

2.6 ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven)
2.7 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
2.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
2.9 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
2.10 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
2.11 กล้องจุลทรรศน์แบบชนิดแสงธรรมดา
2.12 เครื่องเขย่า (Table rotary shaker)
2.13 เครื่องผสม (Planetary mixer)
2.14 เครื่องวัดความหนืด (Brookfield DV-III Ultra Programmable Rheometer)
2.15 เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
2.16 เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer)
2.17 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)
2.18 เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น

3. วิธีการทดลอง

3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

เก็บตัวอย่างผักสลัดที่แสดงอาการโรคใบจุด จากพื้นที่ที่มีการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ในจังหวัดต่าง ๆ ได้แก่ พระนครศรีอยุธยา กรุงเทพมหานคร นนทบุรี สมุทรปราการ เพชรบุรี กระบี่ ภูเก็ต และสงขลา จำนวน 14 ฟาร์ม นำตัวอย่างพืชมาแยกเชื้อรา *Alternaria* spp. ด้วยวิธี tissue transplanting method โดยใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้ว คีบชิ้นส่วนตัวอย่างพืชที่เป็นโรคมาวางเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร water agar (WA) และบ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตัดปลายเส้นใยเชื้อรา (hyphal tip) ที่เจริญออกจากเนื้อเยื่อพืช ไปวางเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร potato dextrose agar (PDA) เพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ แล้วนำเชื้อราที่แยกได้ไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบชนิดแสงธรรมดา เพื่อคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์เชื้อรา *Alternaria* spp. และนำเชื้อรา *Alternaria* spp. ที่คัดเลือกได้มาแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation) ลงเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร PDA และเก็บเชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ไว้บนอาหาร PDA slant เพื่อใช้สำหรับการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.2 การพิสูจน์การเกิดโรค

3.2.1 การเตรียมเชื้อรา

นำเชื้อรา *Alternaria* spp. สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร potato carrot agar (PCA) ซึ่งเป็นอาหารที่กระตุ้นการผลิตและเพิ่มปริมาณของสปอร์ จากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน และเตรียมเป็นสปอร์แขวนลอย (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ และใช้แท่งแก้วฆ่าเชื้อขูดสปอร์บนผิววุ้นเบา ๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออก นำสปอร์แขวนลอยจากทุกจานเพาะเชื้อมาเก็บรวมกันในบีกเกอร์ปราศจากเชื้อ และกรองผ่านผ้าขาวบางปราศจากเชื้อสองชั้นเพื่อแยกเส้นใยออก นับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ปรับสปอร์แขวนลอยให้มีความเข้มข้น $1x10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2 การเตรียมพืชทดสอบ

เตรียมพืชทดสอบคือผักสลัดชนิดบัตเตอร์เฮด เรดคอรัล และกรีนโอ๊ค โดยทำการปลูกผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์แบบระบบน้ำลึก (DFT) ในสภาพโรงเรือนแบบมุ้งตาข่ายเมื่อผักสลัดมีอายุ 25 วัน จึงทำการทดสอบการเกิดโรค

3.2.3 การปลูกเชื้อ

นำสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Alternaria* spp. ที่ระดับความเข้มข้น $1x10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมได้ มาพ่นบนต้นผักสลัดแต่ละชนิด และนำถุงพลาสติกคลุมต้นผักสลัด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้มีความชื้นเหมาะสมต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา หลังจากนั้นสังเกตและบันทึกการเกิดโรคทุกวัน เป็นเวลา 7-14 วัน โดยประเมินความรุนแรงของโรคด้วยสายตา เกณฑ์วัดระดับการเกิดโรคมีดังนี้

ระดับ 0 หมายถึง ไม่มีอาการโรคใบจุด
ระดับ 1 หมายถึง มีอาการใบจุด 1- 25 เปอร์เซ็นต์
ระดับ 2 หมายถึง มีอาการใบจุด 26- 50 เปอร์เซ็นต์
ระดับ 3 หมายถึง มีอาการใบจุด 51- 75 เปอร์เซ็นต์
ระดับ 4 หมายถึง มีอาการใบจุด 76- 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเกิดโรคแล้วทำการแยกเชื้อราอีกครั้ง จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคอย่างรุนแรง เพื่อนำไปจำแนกชนิดเชื้อและเป็นตัวแทนสำหรับศึกษาต่อไป

3.3 การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Alternaria* sp.

นำเชื้อรา *Alternaria* sp. สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุดที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.2 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยเลี้ยงบนอาหาร PCA และบ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาวัดขนาดของสปอร์ (conidia) และโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) และศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อราเปรียบเทียบกับหนังสืออ้างอิงของ Ellis (1971, 1976)

3.4 การแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดิน จำนวน 125 ตัวอย่าง จากพื้นที่ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง ป่าดิบเขา ป่าดิบแล้ง และป่าดิบชื้น ในเขตพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ ของประเทศไทย มาผึ่งให้แห้ง และนำมาแยกแบคทีเรียด้วยวิธี soil dilution plate method ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยชั่งตัวอย่างดินปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องเขย่าหลอด เป็นเวลา 1-2 นาที และนำสารละลายแบคทีเรียแขวนลอยที่ได้ไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนและลดปริมาณจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ จากนั้นเจือจางน้ำแบคทีเรียแขวนลอยแบบลำดับขั้น ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3} - 10^{-4} แล้วทำการ drop plate บนอาหาร nutrient agar (NA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โคโลนีที่โตเร็ว มีสีขาว สีครีม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร มา streak plate บนอาหาร NA เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว และเก็บเชื้อลงเลี้ยงบนอาหาร NA slant เพื่อใช้ในการทดสอบคุณสมบัติอื่น ๆ ต่อไป

3.5 การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp.

3.5.1 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp.

นำสายพันธุ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากข้อ 3.4 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธีการ dual culture technique โดยนำเชื้อรา *Alternaria* sp. มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเจาะชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อรา *Alternaria* sp. เจริญอยู่ ด้วยเครื่องเจาะรู (cork borer) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร มาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร PDA และปลูกแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 4

จุด บริเวณกึ่งกลางระหว่างจุดศูนย์กลางของจานเพาะเชื้อกับขอบจาน ให้มีระยะห่างเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลอง โดยวัดขนาดความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ระหว่างโคโลนีของเชื้อราและแบคทีเรียปฏิปักษ์ และตัดปลายเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. บริเวณที่ถูกยับยั้งด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไปศึกษาลักษณะเส้นใยเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา และคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุได้ดี ไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.5.2 การตรวจสอบปฏิกิริยาทางเคมีและการสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp.

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp. จากข้อ 3.5.1 มาตรวจสอบปฏิกิริยาทางเคมีและการสร้างเอนโดสปอร์ เพื่อยืนยันว่าเป็นแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

1) การตรวจสอบปฏิกิริยาแกรม (Ryu, 1938) โดยทำการหยดโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 หยด ลงบนแผ่นสไลด์ และแตะเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณ 1 ลูป เกลี่ยลงบน KOH และผสมให้เข้ากัน แล้วยกลูปขึ้น ถ้าเชื้อไม่เหนียวติดลูปแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และคัดเลือกแบคทีเรียแกรมบวกไปทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนโดสปอร์

2) การตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์ นำแบคทีเรียแกรมบวกที่ผ่านการทดสอบแล้ว มาตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่งโมง หยดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ และใช้ลูปแตะแบคทีเรียวางลงบนหยดน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นหยดมาลาไคล์กรีน (malachite green) ความเข้มข้น 5.0 % (w/v) ให้ท่วม นำไปอังบนไอน้ำเป็นเวลา 10 นาที และผ่านน้ำ ปล่อยให้แห้ง ย้อมทับด้วยซาฟรานิน (safranin) ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) เป็นเวลา 15 วินาที ล้างผ่านน้ำ ซับให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา ถ้าแบคทีเรียมีการสร้างเอนโดสปอร์จะติดสีเขียว

3.5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp.

เตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.2 โดยเลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อ *Bacillus* spp. ปริมาณ 2 loop ลงเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร และนำมาวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกส่วนใส (supernatant) ด้วย

เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร และแบ่งส่วนใสที่ผ่านการกรองออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปผ่านความร้อนโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที อีกส่วนหนึ่งไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำส่วนใสแต่ละส่วนที่ผ่านและไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเส้นใยเชื้อราด้วยวิธี pour plate โดยนำไปผสมกับอาหาร PDA double strength ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ วางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว และนำเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน มาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อดังกล่าว สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนส่วนใส ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราจากสูตร (Gamaliel *et al*., 1989) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 100 - \frac{(r^2 \times 100)}{R^2}$$

r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบ

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดควบคุม

คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ดี ไปทดสอบในขั้นต่อไป

3.5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp.

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว PDB ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร และนำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร และนำส่วนใสที่ผ่านการกรองแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปผ่านความร้อนโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ส่วนที่สองไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วดูดส่วนใสที่ได้ของแต่ละส่วน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง และนำ spore suspension ของเชื้อรา *Alternaria* sp. ความเข้มข้น 1 x 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มีส่วนใสของแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าว สำหรับชุดควบคุมใช้อาหารเหลว PDB แทนส่วนใส การทดลองมี 3 ซ้ำ บ่มเลี้ยงเชื้อไว้

เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลองโดยตรวจนับจำนวนสปอร์ (conidia) ของเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่งอกและไม่งอก germ tube จำนวน 100 สปอร์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งการงอกของสปอร์จากสูตร (Mukherjee *et al*., 1996) ดังนี้

$$\text{ร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์} = 100 - \frac{(\text{ร้อยละการงอกของสปอร์ชุดทดสอบ}) \times 100}{(\text{ร้อยละการงอกของสปอร์ชุดควบคุม})}$$

โดยกำหนดให้สปอร์ที่งอก หมายถึง สปอร์ที่งอก germ tube ที่มีความยาวเกินครึ่งหนึ่งของความกว้างของสปอร์เดิม

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp. จำนวน 1 สายพันธุ์เพื่อนำไปทดลองในขั้นต่อไป

3.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp.

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.5.4 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการได้แก่ การติดแกรม รูปร่างเซลล์ การผลิตสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility test) การเจริญแบบต้องการและไม่ต้องการออกซิเจน (oxidation-fermentation test) การย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction) การใช้ซิเทรตเป็นแหล่งคาร์บอน (citrate test) การสร้าง acetoin (VP test) การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease production) การสร้างกรดและแก๊สจากคาร์โบไฮเดรต (acid and gas production carbohydrates) การเจริญในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ และความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. โดยอาศัยหนังสือคู่มือของนันทนา (2537) Mac Faddin (1976,1980) และ Schaad และคณะ (2001) (ภาคผนวก ข)

3.7 การเตรียมสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ

3.7.1 การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp.

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือก มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากัน และปิเปตน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร โดยให้น้ำเลี้ยงเชื้อเคลือบบน

ผิวอาหารให้ทั่ว นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ทำการเก็บสปอร์ของเชื้อโดยการล้างสปอร์ที่เจริญบนผิวอาหารด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2-3 ครั้ง นำสปอร์ที่ได้ไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำลาย vegetative cell แล้วนับจำนวนสปอร์ด้วยวิธี drop plate บนอาหาร plate count agar (PCA) และเก็บสปอร์ไว้ในตู้เย็น เพื่อนำไปเตรียมเป็นสูตรสำเร็จต่อไป

3.7.2 การเตรียมสูตรสำเร็จแกรนูลละลายน้ำ

เตรียมสูตรสำเร็จแกรนูลละลายน้ำสำหรับพ่นด้วยวิธี wet granulation โดยนำสารประกอบต่างๆ ได้แก่ polyvinylpyrrolidone (PVP(k-30)), lactose monohydrate และ sodium alginate ในอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งดัดแปลงจากงานวิจัยของอมรรัตน์ (2547)(ตารางที่ 3) ผสมกับสปอร์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 1 สายพันธุ์ ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมจนมีลักษณะเป็นก้อนหมาดพอเหมาะ นำส่วนผสมที่ได้ผ่านแร่งเบอร์ 16 กดให้ส่วนผสมออกมาเป็นแกรนูล แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำไปผ่านแร่งเบอร์ 14 เพื่อให้มีขนาดสม่ำเสมอ นำสูตรสำเร็จที่ได้ไปประเมินคุณสมบัติในขั้นต่อไป

ตารางที่ 3 สารประกอบของสูตรสำเร็จแกรนูลละลายน้ำ

สารประกอบ	สูตรสำเร็จ				
	1	2	3	4	5
sodium alginate (% w/w)	12.5	10	8.5	7	5.5
PVP (k-30) (% w/w)	12.5	10	8.5	7	5.5
lactose monohydrate (% w/w)	75	80	83	86	89
สปอร์แขวนลอย (x 10^{15}cfu)	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4

ที่มา : ดัดแปลงจากอมรรัตน์ (2547) และสิทธิบัตรเลขที่ 0701001394

3.7.3 การประเมินผลสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ

3.7.3.1 การประเมินผลสมบัติทางกายภาพของสูตรสำเร็จ

1) ทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ โดยนำสูตรสำเร็จมาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละความเข้มข้นใช้แท่งแม่เหล็กคน ที่ความเร็วรอบ

200 รอบต่อนาที จนกระทั่งสูตรสำเร็จละลายน้ำ บันทึกระยะเวลาในการละลายน้ำของแต่ละสูตรสำเร็จ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

2) วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสูตรสำเร็จ นำสูตรสำเร็จมาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

3) วัดค่าความหนืดของสูตรสำเร็จ โดยนำสูตรสำเร็จมาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และนำสารละลายที่ได้มาวัดค่าความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield DV-III Ultra Programmable Rheometer ที่มีขนาดเข็ม SC 4-31 ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.7.3.2 การประเมินผลสมบัติทางชีวภาพของสูตรสำเร็จ

1) ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จ ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จ โดยสุ่มวัด 3 ครั้ง แล้วนำมา drop plate บนอาหาร plate count agar (PCA) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี และคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดในสูตรสำเร็จ (cfu ต่อกรัม)

2) ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. นำสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผลิตได้ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. โดยนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมา pour plate ด้วยอาหาร PDA ตัดชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อรา *Alternaria* sp. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร มาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อที่ทำการ pour plate ไว้แล้ว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) และหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. ตามสูตรเช่นเดียวกับข้อ 3.5.3

3) การทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จบนใบผักสลัด นำสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูล มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณเชื้อประมาณ 10^9 cfu ต่อมิลลิลิตร) แล้วนำไปพ่นบนใบของผักสลัดกรีนโอ๊ค เรดคอรัล และบัตเตอร์เฮด อายุ 25 วัน ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ภายในโรงเรือนมุ้งตาข่าย และตรวจนับปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ติดใบผัก ด้วยวิธี drop plate บนอาหาร PCA หลังจากพ่นทันที และภายหลังจากการพ่นเชื้อ 1 4 7 และ 10 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ย

หลังจากนั้นนำสูตรสำเร็จรูปแบบแกรนูลละลายน้ำที่เหมาะสมและดีที่สุดเพียง 1 สูตร มาศึกษาลักษณะทางจุลสัณฐานวิทยาของสปอร์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จและบนใบผักสลัดหลังจากพ่นสูตรสำเร็จ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

3.7.4 การทดสอบการอยู่รอดและประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน

หลังจากเก็บรักษาสูตรสำเร็จในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 เดือน ทำการทดสอบการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จแต่ละสูตร โดยตรวจนับปริมาณเชื้อครั้งแรกหลังจากผลิตเสร็จและตรวจนับทุกเดือน ด้วยวิธีการ drop plate บนอาหาร PCA นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงทำการนับจำนวนโคโลนี คำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดในสูตรสำเร็จ และทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธี pour plate ด้วยอาหาร PDA แล้วตัดชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อรา *Alternaria* sp. เจริญอยู่ มาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อที่ทำการ pour plate ไว้แล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) และหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา แต่ละการทดสอบทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

จากนั้นคัดเลือกสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลที่เหมาะสมที่สุดจำนวน 1 สูตร เพื่อใช้สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดในระบบไฮโดรโพนิกส์

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำต่อการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

โดยคัดเลือกสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลที่ดีที่สุด ที่ผ่านการประเมินผลสมบัติทางกายภาพและชีวภาพแล้ว 1 สูตรสำเร็จ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดในผักสลัด 3 ชนิด คือ บัตเตอร์เฮด กรีนโอ๊ค และเรดคอรัล ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์แบบระบบน้ำลึก (DFT) ภายในโรงเรือนมุ้งตาข่าย โดยใช้สารละลายธาตุอาหารสูตรของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (KMITL's)(ภาคผนวก ก) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 9 กรรมวิธีการทดลอง แต่ละกรรมวิธีการทดลองประกอบด้วยผักสลัดชนิดละ 5 ต้น

1. พ่นด้วยสารฆ่าเชื้อรา (mancozeb) หลังการปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. 1 วัน
2. พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ก่อนปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. 1 วัน และพ่นซ้ำหลังจากปลูกเชื้อรา 3 และ 5 วัน
3. พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. หลังปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. 1 3 และ 5 วัน
4. พ่นด้วยสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลก่อนปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. 1 วัน และพ่นซ้ำหลังจากปลูกเชื้อรา 3 และ 5 วัน

5. พ่นด้วยสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูล หลังปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. 1 3 และ 5 วัน

6. พ่นด้วยสูตรสำเร็จรูปแบบแกรนูลที่ไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ ก่อนปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. 1 วัน และพ่นซ้ำหลังจากปลูกเชื้อรา 3 และ 5 วัน

7. พ่นด้วยสูตรสำเร็จรูปแบบแกรนูลที่ไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ หลังปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. 1 3 และ 5 วัน

8. ปลูกพืชปกติ

9. ปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. อย่างเดียว

การเตรียมเชื้อรา *Alternaria* sp. โดยเลี้ยงบนอาหาร potato carrot agar (PCA) ซึ่งเป็นอาหารที่กระตุ้นการผลิตและเพิ่มปริมาณของสปอร์ จากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-10 วัน และเตรียมเป็นสปอร์แขวนลอย (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ และใช้แท่งแก้วฆ่าเชื้อขูดสปอร์บนผิววุ้นเบา ๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออก แล้วนำสปอร์แขวนลอยจากทุกจานเพาะเชื้อมาเก็บรวมกันในบีกเกอร์ปราศจากเชื้อ และกรองผ่านผ้าขาวบางสองชั้นเพื่อแยกเส้นใยออก จากนั้นจึงนำมานับปริมาณและปรับสปอร์แขวนลอยให้มีความเข้มข้น 1 x 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. โดยนำแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนตามวิธีข้อ 3.7.1 แล้วปรับให้มีความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับสารฆ่าเชื้อรา mancozeb ใช้อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ส่วนสูตรสำเร็จแกรนูล นำมาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ทำการปลูกเชื้อสาเหตุแบคทีเรียปฏิปักษ์ สารฆ่าเชื้อราและสูตรสำเร็จแกรนูลด้วยเครื่องพ่นมือ (hand sprayer) โดยทำการทดสอบเมื่อผัดสลัดอายุ 25 วัน พ่นปริมาณต้นละ 30 มิลลิลิตร ด้วยน้ำหนักกดที่สม่ำเสมอเพื่อให้ได้ปริมาณของสปอร์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ สูตรสำเร็จแกรนูล และสารฆ่าเชื้อราที่ตกลงบนผิวผักสลัดมีปริมาณที่เท่ากัน ทำการตรวจสอบผลการทดลองหลังจากใส่สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การบันทึกผลการทดลอง

ประเมินความเสียหายที่เกิดจากโรค โดยนับจำนวนใบที่เป็นโรคต่อต้นแล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากจำนวนใบทั้งหมดในแต่ละกรรมวิธี และสุ่มใบล่างต้นละ 5 ใบ มาประเมินความรุนแรงของโรคด้วยสายตา โดยใช้เกณฑ์วัดระดับการเกิดโรคเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3 แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายตามสูตรของสืบศักดิ์ (2540) จากนั้นนำผักสลัดมาตัดแต่งใบที่เป็นโรคออก และนำไปชั่งน้ำหนักสดของผักสลัด

$$\text{เปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลาย} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่ม}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเป็นโรค}}$$

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติและสรุปผลการทดลอง

นำข้อมูลผลการทดลองในแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้โปรแกรม SAS และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT) และนำค่าที่ได้มาสรุปผลการทดลอง

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

จากการเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคใบจุดจากฟาร์มที่มีการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ในจังหวัดต่าง ๆ จำนวน 14 ฟาร์ม พบการเกิดโรคใบจุดในผักสลัดทุกฟาร์ม และพบอาการของโรคได้ทั้งการปลูกในสภาพโรงเรือนปิดที่มีการควบคุมอุณหภูมิภายในโรงเรือน (Evaporative cooling) สภาพโรงเรือนแบบมุ้งตาข่าย และโรงเรือนแบบเปิดหรือสภาพกลางแจ้ง เมื่อนำตัวอย่างผักสลัดที่แสดงอาการโรคใบจุดมาแยกเชื้อรา *Alternaria* spp. ด้วยวิธี tissue transplanting method พบว่าสามารถแยกเชื้อรา *Alternaria* spp. ได้ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4) และคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะโคโลนี ชนิดพืช และพื้นที่เก็บ ได้ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ (ตารางที่ 5) เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคต่อไป

2. การพิสูจน์การเกิดโรค

จากการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *Alternaria* spp.ที่คัดเลือกได้จำนวน 7 สายพันธุ์ บนผักสลัด 3 ชนิด คือ บัตเตอร์เฮด กรีนโอ๊ค และเรดคอรัล พบว่าหลังจากพ่นเชื้อราเป็นเวลา 4 วัน เริ่มปรากฏเป็นแผลจุดเล็ก ๆ สีเหลืองขึ้นที่ด้านบนของใบ โดยพบอาการที่ใบล่างของต้นและต่อมาแผลค่อย ๆ ขยายโตขึ้นเป็นแผลสีน้ำตาลมีลักษณะเป็นวงค่อนข้างกลม ซ้อนกันหลายวง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 เซนติเมตร (ภาพที่ 6) โดยเชื้อราสายพันธุ์ LRC 4-6 ซึ่งแยกได้จากผักสลัดเรดคอรัล จากพื้นที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สามารถทำให้เกิดโรคใบจุดรุนแรงมากที่สุด (ตารางที่ 6) เมื่อเอาชิ้นส่วนของพืชบริเวณที่แสดงอาการของโรคไปวางเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าลักษณะเส้นใยมีลักษณะเหมือนกับที่เลี้ยงในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ครั้งแรกคือมีลักษณะเส้นใยฟูสีเขียวเทา เจริญเป็นวงแหวน จึงคัดเลือกเชื้อรา *Alternaria* sp. สายพันธุ์ LRC 4-6 ไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4 จำนวนสายพันธุ์เชื้อรา *Alternaria* spp. ทั้งหมดที่แยกได้จากพื้นที่ต่าง ๆ

ฟาร์มที่	พื้นที่เก็บ	สภาพการปลูก	จำนวนสายพันธุ์
1	กรุงเทพ	กลางแจ้ง	1
2	กรุงเทพ	โรงเรือนมุ้งตาข่าย	-
3	กรุงเทพ	กลางแจ้ง	2
4	กรุงเทพ	Evaporative Cooling	1
5	อยุธยา	โรงเรือนมุ้งตาข่าย	-
6	นนทบุรี	กลางแจ้ง	1
7	สมุทรปราการ	กลางแจ้ง	1
8	สมุทรปราการ	กลางแจ้ง	1
9	เพชรบุรี	โรงเรือนมุ้งตาข่าย	-
10	เพชรบุรี	โรงเรือนมุ้งตาข่าย	1
11	เพชรบุรี	กลางแจ้ง	1
12	กระบี่	โรงเรือนมุ้งตาข่าย	2
13	ภูเก็ต	โรงเรือนมุ้งตาข่าย	2
14	สงขลา	โรงเรือนมุ้งตาข่าย	2
	รวม		15

ตารางที่ 5 สายพันธุ์เชื้อ *Alternaria* spp. ที่คัดเลือกได้จากผักสลัดในพื้นที่ต่าง ๆ

สายพันธุ์เชื้อ *Alternaria* spp.	พื้นที่เก็บ	ชนิดผักสลัด
LRC 4-6	กรุงเทพมหานคร	เรดคอรัล
LGC 5-1	กรุงเทพมหานคร	สลัดคอส
LB 7-2	นนทบุรี	บัตเตอร์เฮด
LB 8-2	สมุทรปราการ	บัตเตอร์เฮด
LGC 12-2	กระบี่	สลัดคอส
LF 13-4	ภูเก็ต	ฟิลเล่ ไฮเบิร์ก
LB 14-3	สงขลา	บัตเตอร์เฮด

ตารางที่ 6 ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Alternaria* spp. บนผักสลัดแต่ละชนิด

สายพันธุ์เชื้อรา	ระดับการเกิดโรค		
	บัตเตอร์เฮด	กรีนโอ๊ค	เรดคอรัล
LRC 4-6	3	3	2
LGC 5-1	2	1	1
LB 7-2	1	1	0
LB 8-2	1	1	0
LGC 12-2	3	2	2
LF 13-4	1	0	0
LB 14-3	3	2	1

หมายเหตุ

0 = ไม่มีอาการใบจุด
1 = มีอาการใบจุด 1- 25 เปอร์เซ็นต์
2 = มีอาการใบจุด 26-50 เปอร์เซ็นต์
3 = มีอาการใบจุด 51-75 เปอร์เซ็นต์
4 = มีอาการใบจุด 76-100 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 6 ลักษณะอาการโรคใบจุดในผักสลัดบัตเตอร์เฮดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. สายพันธุ์ LRC 4-6

3. การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Alternaria* sp.

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Alternaria* sp. สายพันธุ์ LRC 4-6 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นเชื้อรา *Alternaria longipes* (Ellis & Everh) Mason โดยมีลักษณะของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) เกิดแบบเดี่ยว ๆ หรือเกิดเป็นกลุ่ม มีลักษณะตรงจนถึงหักไปมา หรือโค้งงอ รูปร่างทรงกระบอก สีน้ำตาลเข้ม ผนังเรียบมีผนังกั้น ความกว้าง 3-5 ไมครอน ความยาวมากกว่า 80 ไมครอน ลักษณะสปอร์หรือโคนิเดีย (conidia) เกิดแบบเดี่ยว ๆ มีลักษณะคล้ายกระบอง สีน้ำตาลเข้ม ผนังเรียบ บริเวณปลายด้านหนึ่งพบรอยแผลสีน้ำตาลเข้ม ขนาดความกว้าง 11-21 ไมครอน ความยาว 35-110 ไมครอน ความยาวของ bea□ โดยส่วนใหญ่จะมีความยาว 1/3 ถึง 1/2 ของความยาวของสปอร์ และความกว้าง 2-5 ไมครอน ปลายของ bea□ มีลักษณะโป่งพองและมีผนังกั้น ลักษณะของโคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน มีลักษณะเป็นเส้นใยฟูสีเขียวเทา เจริญเป็นวงแหวนขยายออกไป มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-9 เซนติเมตร (ภาพที่ 7)

ก ข

ภาพที่ 7 เชื้อรา *Alternaria longipes* (Ellis & Everh) Mason

ก. ลักษณะเส้นใยเชื้อรา เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน

ข. ลักษณะโคนิเดีย กำลังขยาย 400 เท่า

4. การแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดิน

เมื่อนำตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าสมบูรณ์ชนิดต่าง ๆ มาแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ด้วยวิธี soil dilution plate method และนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถทนความร้อนได้ และนำมา drop plate บนอาหาร NA พบว่าสามารถแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้ทั้งหมด 356 สายพันธุ์ โดยลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มีรูปร่างไม่แน่นอน มีทั้งสีขาวขุ่น สีครีม ผิวหน้าโคโลนี กลมนูน ผิวด้านและมีทั้งขอบเรียบและไม่เรียบ (ภาพที่ 8) เมื่อเปรียบเทียบจากจำนวนตัวอย่างดิน พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินพื้นที่ป่าดิบชื้นได้มากที่สุดคือประมาณ 5 สายพันธุ์ต่อ 1 ตัวอย่างดิน รองลงมาพื้นที่ป่าเบญจพรรณและป่าดิบแล้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ภาพที่ 8 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เมื่อแยกด้วยวิธี soil dilution plate method ที่ระดับการเจือจาง 10^{-4}

ตารางที่ 7 จำนวนสายพันธุ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างดินป่าสมบูรณ์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดป่า	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนสายพันธุ์
ป่าเบญจพรรณ	40	146
ป่าเต็งรัง	35	59
ป่าดิบเขา	10	5
ป่าดิบแล้ง	20	43
ป่าดิบชื้น	20	103
	รวม	356

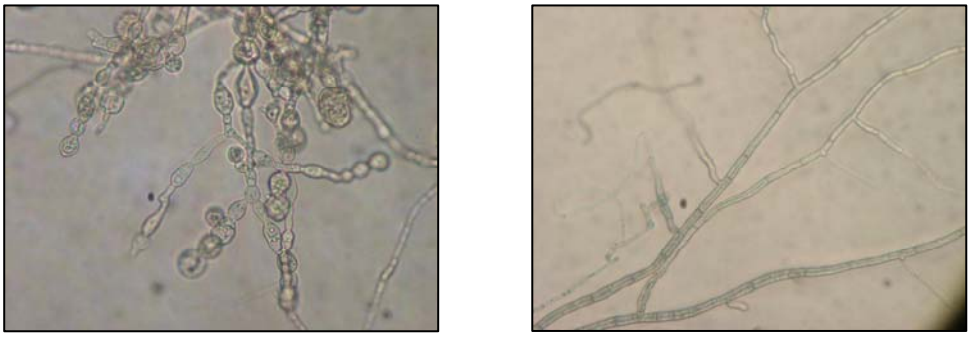
5. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp.

5.1 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp.

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด จำนวน 356 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ด้วยวิธี dual culture technique บนอาหาร PDA พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 20 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD 3-1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด ให้ค่าบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เท่ากับ 10.0 มิลลิเมตร แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับสายพันธุ์ TRTR 2-2, PYMD 1-6 และ RNTR 3-5 ที่เกิดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 9.3, 9.0 และ 8.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ และแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PYMD 3-2 และ KRDE 5-1 เกิดบริเวณยับยั้งน้อยที่สุด คือ 2.3 และ 4.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ จึงทำการคัดเลือกออก(ตารางที่ 8) (ภาพที่ 9)

ภาพที่ 9 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria longipes* LRC 4-6 โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1

เมื่อนำเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 บริเวณที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปตรวจสอบดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา พบว่าบริเวณปลายเส้นใยมีลักษณะรูปร่างแตกต่างไปจากเส้นใยปกติ (ชุดควบคุม) อย่างชัดเจน คือเส้นใยมีลักษณะสั้น บวมกลม โป่งพอง ในขณะที่เส้นใยปกติมีลักษณะปลายเส้นใยงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 10)



ก **ข**

ภาพที่ 10 ลักษณะทางจุลสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria longipes* LRC 4-6 เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1 ภาพจากกล้องชนิดแสงธรรมดากำลังขยาย 400 เท่า (ก) เส้นใยเชื้อราชุดทดสอบ และ (ข) เส้นใยเชื้อราชุดควบคุม

ตารางที่ 8 บริเวณยับยั้งระหว่างเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 และแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

สายพันธุ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp	แหล่งเชื้อ	บริเวณยับยั้ง (มม.)
UDMD 1-1	ป่าเบญจพรรณ จ. อุตรดิตถ์	6.8 def
PYMD 1-6	ป่าเบญจพรรณ จ. พะเยา	9.0 ab
PYMD 3-2	ป่าเบญจพรรณ จ. พะเยา	2.3 h
PYMD 8-3	ป่าเบญจพรรณ จ. พะเยา	8.3 bc
PRMD 6-6	ป่าเบญจพรรณ จ. แพร่	7.0 cde
PRMD 9-1	ป่าเบญจพรรณ จ. แพร่	7.0 cde
NMD 6-2	ป่าเบญจพรรณ จ. น่าน	7.3 cde
LPHMD 3-3	ป่าเบญจพรรณ จ. ลำปาง	7.0 cde
CPTR 1-3	ป่าดิบชื้น จ. ชุมพร	7.0 cde
CPTR 3-2	ป่าดิบชื้น จ. ชุมพร	6.8 def
CPTR 4-9	ป่าดิบชื้น จ. ชุมพร	7.0 cde
TRTR 1-2	ป่าดิบชื้น จ. ตรัง	8.0 bcd
TRTR 2-2	ป่าดิบชื้น จ. ตรัง	9.3 ab
RNTR 3-5	ป่าดิบชื้น จ. ระนอง	8.8 ab
PBDE 1-1	ป่าดิบแล้ง จ. เพชรบูรณ์	5.5 fg
PBDE 2-2	ป่าดิบแล้ง จ. เพชรบูรณ์	6.5 ef
KRDE 5-1	ป่าดิบแล้ง จ. นครราชสีมา	4.8 g
LPDD 3-1	ป่าเต็งรัง จ. ลำพูน	10.0 a
LPDD 3-2	ป่าเต็งรัง จ. ลำพูน	6.0 efg
LPDD 4-2	ป่าเต็งรัง จ. ลำพูน	6.5 ef
ชุดควบคุม		0.0 i
F-test		**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)		9.8

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

5.2 การตรวจสอบปฏิกิริยาทางเคมีและการสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp.

จากการนำแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ได้ดี จำนวน 18 สายพันธุ์ มาตรวจสอบปฏิกิริยาทางเคมีและการสร้างเอนโดสปอร์เพื่อยืนยันว่าเป็นแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยการทดสอบปฏิกิริยาแกรมด้วย KOH ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 18 สายพันธุ์ แสดงปฏิกิริยาแกรมบวกคือไม่มีความเหนียวหนืดติดลูป และเมื่อนำมาตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์ พบว่าสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ทุกสายพันธุ์ โดยเมื่อย้อมด้วยมาลาไคล์กรีนแล้วติดสีเขียว

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp.

จากการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 และผ่านการตรวจสอบปฏิกิริยาแกรมและการสร้างเอนโดสปอร์แล้วว่าเป็นแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 18 สายพันธุ์ มาทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 โดยนำสารปฏิปักษ์ (น้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส) ที่แบคทีเรียผลิตได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เปรียบเทียบกับไม่นึ่งฆ่าเชื้อ ทดสอบโดยวิธี pour plate ผสมกับอาหาร PDA double strength ในอัตราส่วน 1:1 ผลการทดลองพบว่าสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ทุกสายพันธุ์ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม โดยสารปฏิปักษ์ที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ TRTR 2-2 และ RNTR 3-5 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเส้นใยเชื้อราสูงสุด คือ 95.7 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับสายพันธุ์ LPDD 3-1, NMD 6-2, PYMD 8-3 และ PYMD 1-6 (95.3, 95.1, 94.7 และ 94.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่เมื่อนำสารปฏิปักษ์ไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ พบว่าสารปฏิปักษ์ที่ผลิตจากแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD 3-1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด คือ 97.6 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่าสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ LPDD 3-1 และ LPDD 3-2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรามากกว่าที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ ในขณะที่สารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลง (ตารางที่ 9) (ภาพที่ 11)

5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp.

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 18 สายพันธุ์ มาทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม โดยสารปฏิปักษ์ที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ PYMD 8-3 ให้ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดีที่สุด คิดเป็น 94.7 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับแบคทีเรียสายพันธุ์ TRTR 2-2, PYMD 1-6, CPTR 1-3 และ LPDD 3-1 โดยให้ค่าการยับยั้งการงอกของสปอร์คิดเป็น 89.9, 88.6, 87.9 และ 86.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อนำสารปฏิปักษ์ไปผ่านความร้อนโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส พบว่าสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD 3-1 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดีที่สุดคือ 91.6 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ TRTR 2-2 (87.9 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้พบว่าสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ LPDD 3-1 และ LPDD 3-2 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อให้ผลการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อราได้มากกว่าที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ ในขณะที่สารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นให้ผลการยับยั้งลดลง (ตารางที่ 10)

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์เชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา พบว่าสารปฏิปักษ์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมีผลต่อการงอกสปอร์ของเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 อย่างชัดเจน คือ germ tube ที่งอกออกมาจากสปอร์เชื้อรา มีลักษณะสั้นกุดบวมกลม และโป่งพอง ในขณะที่สปอร์ของชุดควบคุมสามารถงอก germ tube ได้ยาวและสามารถเจริญต่อไปได้ (ภาพที่ 12)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD 3-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้งเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราได้ดี จึงคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD 3-1 ไปศึกษาการจำแนกชนิดเชื้อและนำไปเตรียมเป็นสูตรสำเร็จรูปแบบแกรนูลต่อไป

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อและนึ่งฆ่าเชื้อ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6

สายพันธุ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6	
	ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ	นึ่งฆ่าเชื้อ
UDMD 1-1	94.3 a	80.8 cde
PYMD 1-6	94.4 a	84.5 b-e
PYMD 8-3	94.7 a	88.3 abc
PBDE 1-1	80.2 d	76.1 ef
PBDE 2-2	91.0 abc	82.0 cde
PRMD 6-6	92.0 ab	79.3 cde
PRMD 9-1	89.3 abc	76.1 ef
CPTR 1-3	85.5 bcd	76.8 def
CPTR 3-2	84.0 cd	67.6 f
CPTR 4-9	69.8 e	51.5 g
TRTR 1-2	66.6 e	43.9 g
TRTR 2-2	95.7 a	93.6 ab
RNTR 3-5	95.7 a	87.3 a-d
NMD 6-2	95.1 a	87.3 a-d
LPDD 3-1	95.3 a	97.6 a
LPDD 3-2	82.1 d	85.7 b-e
LPDD 4-2	79.3 d	45.0 g
LPHMD 3-3	81.9 d	50.3 g
ชุดควบคุม	0.0 f	0.0 h
F-test	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	3.7	6.0

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

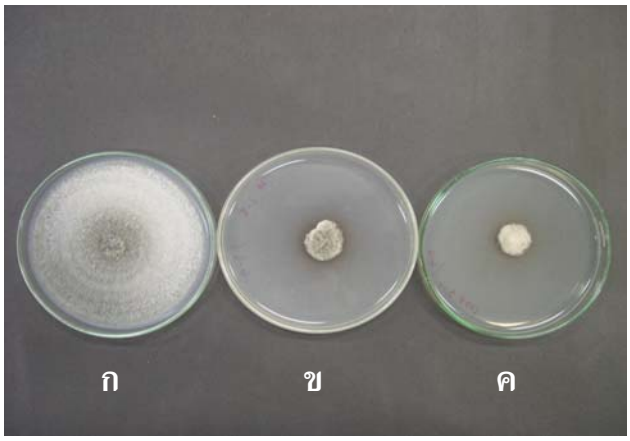
** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อและนึ่งฆ่าเชื้อต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6

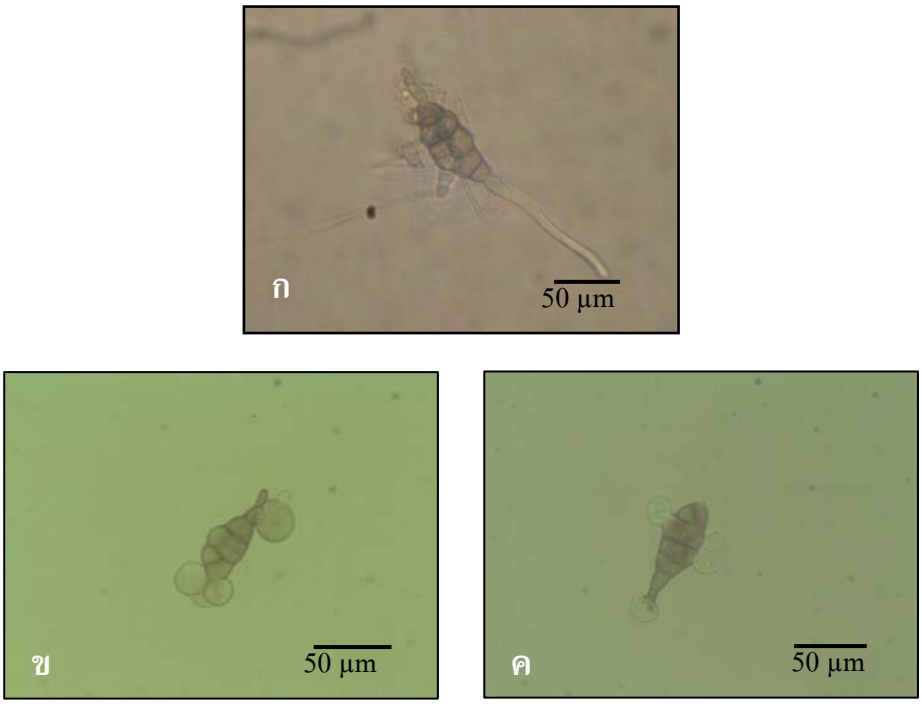
สายพันธุ์แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6	
Bacillus spp.	ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ	นึ่งฆ่าเชื้อ
UDMD 1-1	78.9 cd	51.9 gh
PYMD 1-6	88.6 ab	67.9 cde
PYMD 8-3	93.0 a	79.6 b
PBDE 1-1	81.6 bcd	72.3 bc
PBDE 2-2	86.3 abc	57..5 fg
PRMD 6-6	83.3 bcd	49.5 h
PRMD 9-1	76.2 d	61.9 ef
CPTR 1-3	87.9 ab	63.5 def
CPTR 3-2	81.3 bcd	59.9 efg
CPTR 4-9	47.1 f	8.7 □
TRTR 1-2	47.1 f	11.7 j
TRTR 2-2	89.9 ab	87.9 a
RNTR 3-5	84.3 bcd	78.6 b
NMD 6-2	84.3 bcd	68.2 cde
LPDD 3-1	86.3 abc	91.6 a
LPDD 3-2	61.2 e	71.6 bcd
LPDD 4-2	65.5 e	37.8 i
LPHMD 3-3	17.1 g	1.7 □1
ชุดควบคุม	0.0 h	0.0 l
F-test	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	4.9	6.4

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %



ภาพที่ 11 ขนาดโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria longipes* LRC 4-6 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA double strength ที่ผสมสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1 (ก) ชุดควบคุม (ข) สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งเชื้อ และ (ค) สารปฏิปักษ์นึ่งฆ่าเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 26-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 12 ลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria longipes* LRC 4-6 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB ที่ผสมสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1 ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) ชุดควบคุม (ข) สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ และ (ค) สารปฏิปักษ์นึ่งฆ่าเชื้อ กำลังขยาย 400 เท่า

6. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp.

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากดินป่าเต็งรังในพื้นที่จังหวัดลำพูน มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีเปรียบเทียบกับคู่มือของนันทนา (2537) Mac Faddin (1976, 1980) และ Schaad และคณะ (2001) ผลการทดลองพบว่าสามารถจำแนกชนิดได้เป็น *Bacillus subtilis* โดยมีรูปร่างเซลล์แบบแท่ง ติดสีแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ มีความสามารถในการเคลื่อนที่ สามารถรีดิวส์ไนเทรตให้เป็นไนไตรต์หรือก๊าซไนโตรเจนได้ เจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงได้ ใช้ซิเทรตและน้ำตาลต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน และสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 การทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1

การทดสอบ	*B. subtilis*	*Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1
Gram stain reaction	+	+
Motility test	+	V
Nitrate reduction	+	+
Gelatin liguefaction	+	+
Oxidation-fermentation test	O	O/F
Citrate test	+	V
Voges-Proskauer	+	+
Urease production	V	+
Glucose	A	A
Mannitol	A	A
Arabinose	A	A
Xylose	A	A
Growth in 7.5 % NaCl	+	+
Starch hydrolysis	+	+

ที่มา : Macfaddin (1976, 1980) และ Schaad และคณะ (2001)

หมายเหตุ V = variable result F = fermentation
A = acid O = oxidative

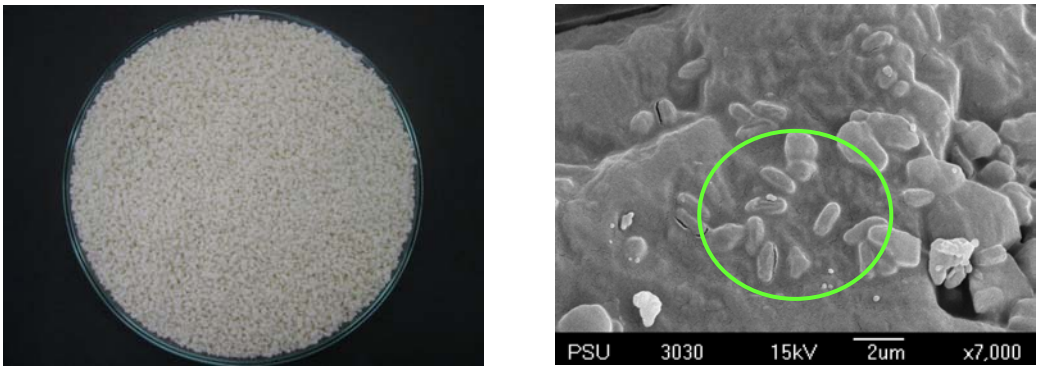
7. การเตรียมสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ

7.1 การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp.

เมื่อนำแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 ที่ผ่านการคัดเลือกมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหาร PDA และตรวจนับปริมาณสปอร์ด้วยวิธีการ drop plate บนอาหาร PCA พบว่ามีปริมาณเชื้อทั้งหมด 2.2 x 10^{14} cfu ต่อมิลลิลิตร

7.2 การเตรียมสูตรสำเร็จแกรนูลละลายน้ำ

การเตรียมสูตรสำเร็จแกรนูลละลายน้ำสำหรับพ่น ด้วยวิธี wet granulation โดยนำสารประกอบได้แก่ sodium alginate, lactose monohydrate และ PVP(□-30) อัตราส่วนต่างๆ (ตารางที่ 3) ผสมกับสปอร์แขวนลอยแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 พบว่าสามารถผลิตสูตรสำเร็จแกรนูลได้ 5 สูตร แต่ละสูตรมีลักษณะเป็นแกรนูล สีขาวครีม และมีสปอร์อยู่บนผิวแกรนูล ดังภาพที่ 13



ก ข

ภาพที่ 13 ก. ผลิตภัณฑ์สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลสูตรที่ 1
ข. ลักษณะจุลสัณฐานวิทยาของสปอร์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 (ในวงกลม) ที่บนผิวสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรที่ 1 จากกล้องจุลทรรศน์แบบ SEM (2 μm) กำลังขยาย 7,000 เท่า

7.3 การประเมินผลสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ

7.3.1 การประเมินผลสมบัติทางกายภาพของสูตรสำเร็จ

7.3.1.1 การทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ เมื่อนำสูตรสำเร็จแกรนูลที่ผลิตได้มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบความสามารถในการละลายน้ำโดยใช้แท่งแม่เหล็กคน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าระยะเวลาในการละลายน้ำอยู่ในช่วง 5-18 และ 10-35 นาที ตามลำดับ โดยสูตรสำเร็จที่ 1 ใช้เวลาในการละลายน้ำมากที่สุด และสูตรสำเร็จที่ 5 ใช้เวลาน้อยที่สุด ทั้งที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ความสามารถในการละลายน้ำของสูตรสำเร็จแกรนูลที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์

สูตรสำเร็จ	เวลาในการละลายน้ำ (นาที)	
	1 เปอร์เซ็นต์	3 เปอร์เซ็นต์
1	17.7 a	35.4 a
2	10.9 b	22.3 b
3	6.3 c	14.7 c
4	5.5 c	13.4 cd
5	5.1 c	10.7 d
F-test	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	5.8	7.4

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT
** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

7.3.1.2 วัดความเป็นกรด-ด่าง ของสูตรสำเร็จ เมื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสูตรสำเร็จที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของสูตรสำเร็จทั้ง 5 สูตร มีค่าเป็นกรดอ่อนถึงเป็นกลาง โดยที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่าที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เล็กน้อย (ตารางที่ 13)

7.3.1.3 วัดความหนืดของสูตรสำเร็จ เมื่อนำสารละลายสูตรสำเร็จแกรนูลความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มาวัดความหนืด เปรียบเทียบกับความหนืดของน้ำกลั่น พบว่าให้ค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยสารละลายของสูตรสำเร็จที่ 1 ทั้งความเข้มข้น 1 และ

3 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความหนืดสูงสุด (8.52 และ 18.90 cps ตามลำดับ) รองลงมาคือสูตรสำเร็จที่ 2 และ 3 ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 13 ความเป็นกรด-ด่างของสูตรสำเร็จแกรนูลที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์

สูตรสำเร็จ	ความเป็นกรด-ด่าง	
	1 เปอร์เซ็นต์	3 เปอร์เซ็นต์
1	6.27 ± 0.02	6.03 ± 0.01
2	6.23 ± 0.01	6.01 ± 0.01
3	6.18 ± 0.04	6.02 ± 0.01
4	6.16 ± 0.02	6.02 ± 0.01
5	6.16 ± 0.01	5.99 ± 0.01
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	6.84 ± 0.10	6.81 ± 0.08

ตารางที่ 14 ความหนืดของสูตรสำเร็จแกรนูลที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์

สูตรสำเร็จ	ความหนืด (cps)	
	1 เปอร์เซ็นต์	3 เปอร์เซ็นต์
1	8.52 a	18.90 a
2	8.15 b	15.72 b
3	7.83 c	12.62 c
4	7.37 d	10.55 d
5	6.92 e	8.96 e
ชุดควบคุม (น้ำ)	2.29 f	2.29 f
F-test	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	0.78	5.68

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

7.3.2 การประเมินผลสมบัติทางชีวภาพของสูตรสำเร็จ

7.3.2.1 ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จ เมื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จด้วยวิธีการ drop plate บนอาหาร PCA พบว่าสูตรสำเร็จแกรนูล สูตรที่ 1 มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์มากที่สุดคือ $7.7 \pm 0.5 \times 10^9$ cfu ต่อกรัม (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูล

สูตรสำเร็จ	ปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* (cfu/กรัม)
1	$7.7 \pm 0.5 \times 10^9$
2	$5.3 \pm 0.8 \times 10^9$
3	$5.1 \pm 0.6 \times 10^9$
4	$4.7 \pm 0.5 \times 10^9$
5	$4.9 \pm 0.4 \times 10^9$

หมายเหตุ : แบคทีเรียปฏิปักษ์เริ่มต้น มีปริมาณ 2.2×10^{14} cfu ต่อมิลลิลิตร

7.3.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. longipes* ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูลต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 โดยวิธี pour plate ด้วยอาหาร PDA พบว่าสูตรสำเร็จแกรนูลทั้ง 5 สูตร สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดี โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) (ตารางที่ 16) (ภาพที่ 14)

7.3.2.2 การทดสอบความสามารถในการอยู่รอดบนใบผักสลัดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จ จากการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดบนใบผักสลัดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จแกรนูล หลังจากพ่นสูตรสำเร็จบนผักสลัดทันที และหลังจากพ่นเป็นเวลา 1 4 7 และ 10 วัน พบว่าสูตรสำเร็จที่ 1 มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ติดอยู่บนใบผักสลัดทั้ง 3 ชนิดมากที่สุด (ตารางที่ 17) และเมื่อนำส่วนใบผักสลัดที่พ่นด้วยสูตรสำเร็จแกรนูล มาดูลักษณะการติดบนใบผักสลัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์ติดกระจายตัวอยู่ทั่วบริเวณผิวใบ (ภาพที่ 15-17)

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรต่างๆ ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6

สูตรสำเร็จ	การยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)
1	98.6 a
2	98.6 a
3	98.5 a
4	98.3 a
5	98.2 a
ชุดควบคุม (น้ำ)	0.0 b
F-test	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	0.45

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT
** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ภาพที่ 14 ลักษณะการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Alternaria longipes* LRC 4-6 โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรที่ 1 เมื่อทดสอบโดยวิธีการ pour plate ด้วยอาหาร PDA และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

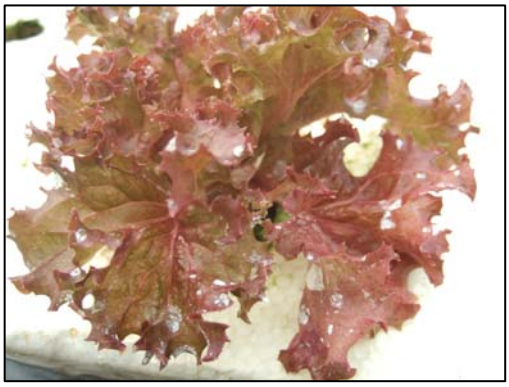
ตารางที่ 17 ปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 บนใบผักสลัด หลังจากพ่นด้วยสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรต่างๆ เป็นเวลา 1 4 7 และ 10 วัน

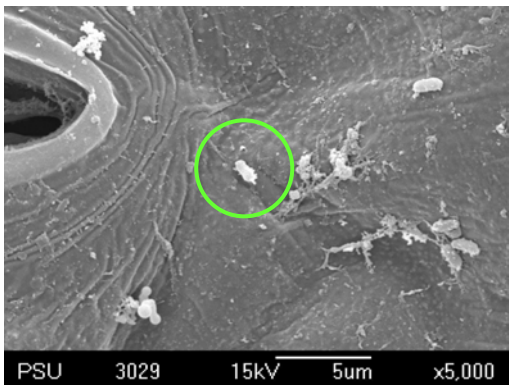
สูตรสำเร็จ	ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ ($\times 10^6$ cfu/กรัม)														
	เริ่มต้น			หลังพ่น 1 วัน			หลังพ่น 4 วัน			หลังพ่น 7 วัน			หลังพ่น 10 วัน		
	BH	RC	GO	BH	RC	GO	BH	RC	GO	BH	RC	GO	BH	RC	GO
1	370 a	470 a	425	72.5 a	76.5 ab	87.0 a	8.6 a	64.0 a	40.5	3.4 a	30.0 a	26.5 a	1.2 a	7.5 a	7.0 a
2	365 a	435 a	385	69.5 a	79.0 a	88.5 a	7.6 a	46.0 b	39.5	2.9 ab	17.0 b	26.0 a	1.1 ab	7.0 a	4.5 a
3	270 b	430 a	365	41.0 b	67.0 bc	64.0 b	8.1 a	35.5 b	35.5	2.5 ab	13.0 bc	18.5 ab	0.5 bc	2.5 b	6.5 a
4	190 c	280 b	360	35.0 b	59.0 c	58.5 b	6.0 b	36.5 b	39.0	2.3 b	13.2 bc	18.5 ab	0.8 abc	2.5 b	1.4 b
5	175 c	265 b	340	34.0 b	56.5 c	52.0 b	3.9 c	38.5 b	38.0	2.2 b	7.0 c	7.2 b	0.2 c	0.6 b	0.9 b
F-test	**	**	ns	**	**	**	**	**	ns	**	**	**	**	**	**
C.V (%)	12.6	12.1	17.8	10.7	7.3	10.9	9.35	18.4	11.6	15.8	24.9	29.1	38.5	29.5	32.7

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

GO = ผักสลัดกรีนโอ๊ค RC = ผักสลัดเรดคอรัล BH = ผักสลัดบัตเตอร์เฮด

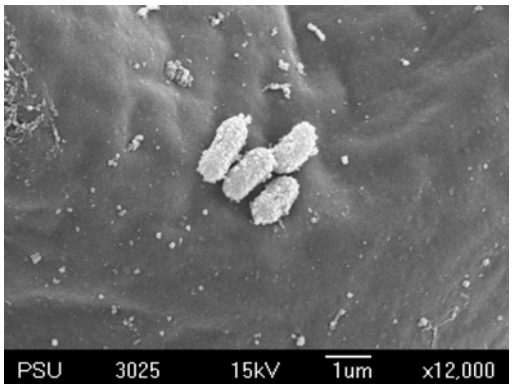




ก ข

ภาพที่ 15 ก. ลักษณะการติดบนใบของสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรที่ 1 หลังจากพ่นบนใบผักสลัดเรดคอรัล เป็นเวลา 7 วัน

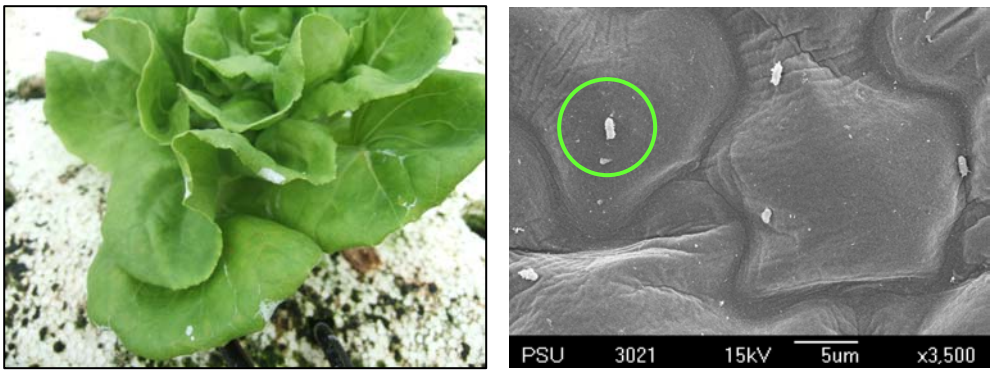
ข. จุลสัณฐานวิทยาของสปอร์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* LPDD 3-1 (ในวงกลม) บนใบผักสลัดเรดคอรัล จากกล้องจุลทรรศน์แบบ SEM (5 µm) กำลังขยาย 5,000 เท่า



ก ข

ภาพที่ 16 ก. ลักษณะการติดบนใบของสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรที่ 1 หลังจากพ่นบนใบผักสลัดกรีนโอ๊ค เป็นเวลา 7 วัน

ข. จุลสัณฐานวิทยาของสปอร์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* LPDD 3-1 บนใบผักสลัดกรีนโอ๊ค จากกล้องจุลทรรศน์แบบ SEM (1 µm) กำลังขยาย 12,000 เท่า



ก ข

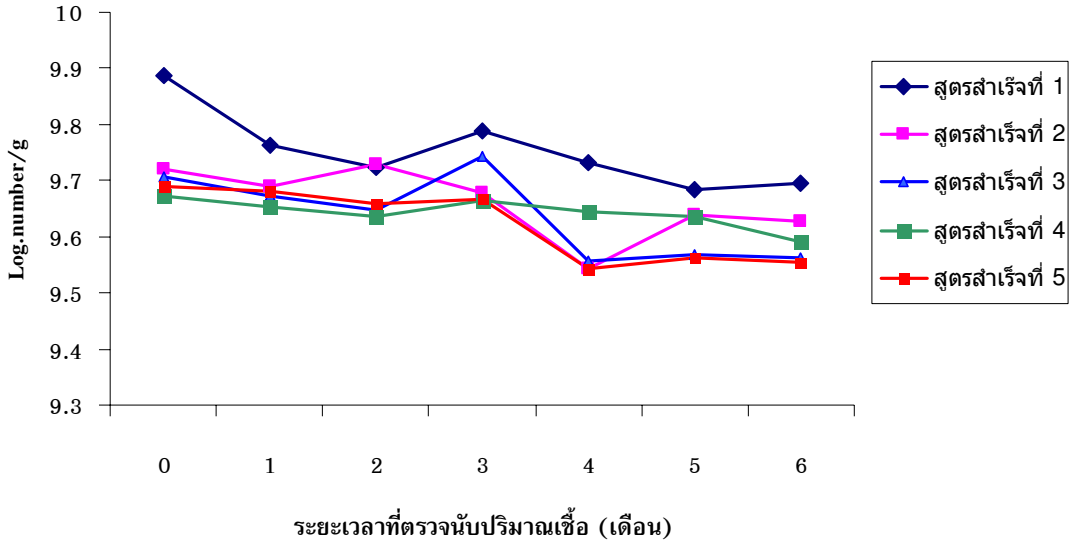
ภาพที่ 17 ก. ลักษณะการติดบนใบของสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรที่ 1 หลังจากพ่นบนใบผักสลัดบัตเตอร์เฮด เป็นเวลา 7 วัน

ข. จุลสัณฐานวิทยาของสปอร์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* LPDD 3-1 (ในวงกลม) บนใบผักสลัดบัตเตอร์เฮด จากกล้องจุลทรรศน์แบบ SEM (5 µm) กำลังขยาย 3,500 เท่า

7.4 การทดสอบการอยู่รอดและประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน

เมื่อเตรียมและผลิตสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำเสร็จแล้วบรรจุใส่ถุงพลาสติกและเก็บในภาชนะที่มีฝาปิด และวางเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสูตรสำเร็จแต่ละสูตร ตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จ และทำการทดสอบต่อไปทุกเดือนเป็นระยะเวลา 6 เดือน ผลการทดลองพบว่าสูตรสำเร็จทั้ง 5 สูตร มีความคงสภาพ กล่าวคือ มีลักษณะสี และแกรนูล เหมือนครั้งแรกที่ผลิตเสร็จ ไม่ปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น มีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดในสูตรสำเร็จสูง คือ 10^9 cfu ต่อกรัม โดยสูตรสำเร็จที่ 1 มีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดสูงสุด อัตราการลดลงของเชื้อน้อยมากหลังจากเก็บไว้นาน 6 เดือน (ภาพที่ 18)

เมื่อนำสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลที่เตรียมได้และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ด้วยวิธี pour plate พบว่าสูตรสำเร็จทั้ง 5 สูตร สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ดีแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม โดยให้ค่าการยับยั้งเชื้อรามากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ และแต่ละเดือนมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราลดลงน้อยมาก (ตารางที่ 18)



ภาพที่ 18 ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูล หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน

ตารางที่ **18** ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูล สูตรต่าง ๆ ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6

สูตรสำเร็จ	การยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)						
	เริ่มต้น	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน
1	98.6 a	98.6 a	98.2 a	98.6 a	98.4 a	98.1 a	98.2 a
2	98.6 a	98.4 ab	98.2 a	97.9 b	97.9 ab	97.7 a	97.9 a
3	98.5 a	98.0 ab	98.1 a	97.9 b	97.9 ab	97.5 a	97.7 a
4	98.3 a	97.7 b	98.2 a	97.0 c	97.4 b	97.4 a	96.2 b
5	98.2 a	97.7 b	97.7 a	97.4 bc	97.7 ab	95.3 b	96.2 b
ชุดควบคุม	0.0 b	0.0 c	0.0 b	0.0 d	0.0 c	0.0 c	0.0 c
F-test	**	**	**	**	**	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	0.45	0.41	0.54	0.40	0.47	0.47	0.66

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

จากการประเมินผลสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของสูตรสำเร็จแกรนูลพบว่า สูตรสำเร็จที่ 1ซึ่งประกอบด้วย sodium alginate 12.5 เปอร์เซ็นต์ PVP(□30) 12.5 เปอร์เซ็นต์ lactose monohydrate 75 เปอร์เซ็นต์ และสปอร์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 จำนวน 4.4 x 10^{15}cfu มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับพ่นเพื่อควบคุมโรคใบจุด โดยใช้เวลาในการละลายน้ำประมาณ 30 นาที สารละลายที่ได้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง และให้ค่าความหนืดสูงที่สุด นอกจากนี้มีปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดในสูตรสำเร็จสูง สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ได้ดี และมีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดบนใบผักสลัดสูงสุด ดังนั้นจึงคัดเลือกสูตรสำเร็จแกรนูลสูตรที่ 1 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ต่อไป

8. การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ ต่อการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 รูปแบบแกรนูลละลายน้ำสูตรที่ 1 ในการควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 เปรียบเทียบกับการใช้สารฆ่าเชื้อรา mancozeb และสปอร์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 โดยทำการทดสอบบนผักสลัดสามชนิดคือกรีนโอ๊ค เรดคอรัล และบัตเตอร์เฮด ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์แบบระบบน้ำลึกในโรงเรือนมุ้งตาข่าย และประเมินความเสียหายของโรคโดยนับจำนวนใบที่เป็นโรคต่อต้น แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากจำนวนใบทั้งหมด ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรคบนผักสลัดทั้งสามชนิดของแต่ละกรรมวิธีการทดลองให้ผลแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยในผักสลัดกรีนโอ๊คและบัตเตอร์เฮดให้ผลสอดคล้องกันคือ กรรมวิธีที่พ่นด้วยสารฆ่าเชื้อรา mancozeb ให้เปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรคต่ำสุด (12.0 และ 15.7 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีการปลูกพืชปกติ (12.0 และ 22.7 เปอร์เซ็นต์) กรรมวิธีพ่นสูตรสำเร็จแกรนูลก่อนปลูกเชื้อรา 1 วัน + หลังปลูกเชื้อรา 3 และ 5 วัน (20.0 และ 22.7 เปอร์เซ็นต์) และกรรมวิธีพ่นสปอร์แขวนลอยก่อนปลูกเชื้อรา 1 วัน + หลังปลูกเชื้อรา 3 และ 5 วัน (19.8 และ 35.5 เปอร์เซ็นต์) ส่วนเปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรคในผักสลัดเรดคอรัลพบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยสารฆ่าเชื้อรา mancozeb ให้เปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรคต่ำสุดคือ 10.3 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างจากกรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง รองลงมากรรมวิธีพ่นสูตรสำเร็จแกรนูลก่อนปลูกเชื้อรา 1 วัน + หลังปลูกเชื้อรา 3 และ 5 วัน และกรรมวิธีพ่นสปอร์แขวนลอยก่อนปลูกเชื้อรา 1 วัน + หลังปลูกเชื้อรา 3 และ 5 วัน ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ใบเท่ากันคือ 19.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การลดลงของโรคบนใบผักสลัดโดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุอย่างเดียว พบว่ากรรมวิธีพ่นสูตรสำเร็จแกรนูลก่อนปลูกเชื้อรา 1 วัน + หลังปลูกเชื้อรา 3 และ 5 วัน สามารถลดการเกิดโรคบนผักสลัดกรีนโอ๊ค เรดคอรัล

และบัตเตอร์เฮด ได้ 53.2 57.9 และ 65.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีพ่นด้วยสารฆ่าเชื้อรา mancozeb สามารถลดการเกิดโรคได้สูงถึง 71.0 77.9 และ 76.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 19)

เมื่อสุ่มใบล่างของผักสลัดต้นละ 5 ใบ มาประเมินความรุนแรงของโรคด้วยสายตา โดยใช้เกณฑ์วัดระดับการเกิดโรคเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3 แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายใบ พบว่าให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกันกับค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค กล่าวคือกรรมวิธีพ่นสารฆ่าเชื้อรา mancozeb ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายใบในผักสลัดทั้งสามชนิดต่ำที่สุด (กรีนโอ๊ค 14.0 เรดคอรัล 10.0 และบัตเตอร์เฮด 23.0 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ กรรมวิธีปลูกพืชปกติ (กรีนโอ๊ค 15.0 เรดคอรัล 15.0 และบัตเตอร์เฮด 34.0 เปอร์เซ็นต์) และกรรมวิธีพ่นสูตรสำเร็จแกรนูลก่อนปลูกเชื้อรา 1 วัน + หลังปลูกเชื้อรา 3 และ 5 วัน (กรีนโอ๊ค 26.0 เรดคอรัล 20.0 และบัตเตอร์เฮด 39.0 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละกรรมวิธีการทดลองกับกรรมวิธีชุดควบคุม พบว่าทุกกรรมวิธีการทดลองสามารถลดดัชนีการทำลายลงได้ โดยกรรมวิธีพ่นสารฆ่าเชื้อรา mancozeb สามารถลดดัชนีการทำลายบนผักสลัดทั้งสามชนิดได้มากที่สุด (มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือกรรมวิธีปลูกพืชปกติ และกรรมวิธีพ่นสูตรสำเร็จแกรนูลก่อนปลูกเชื้อรา 1 วัน + หลังปลูกเชื้อรา 3 และ 5 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 20)

สำหรับน้ำหนักของผลผลิต เมื่อนำต้นผักสลัดทั้งสามชนิดที่ตัดแต่งใบที่เป็นโรคออก และมาชั่งน้ำหนักสดต่อต้น พบว่าน้ำหนักสดของผลผลิตในแต่ละกรรมวิธีมีค่าแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารฆ่าเชื้อรา mancozeb ให้น้ำหนักสดของผลผลิตมากที่สุด คือผักสลัดกรีนโอ๊ค 53.7 กรัมต่อต้น เรดคอรัล 43.6 กรัมต่อต้น และและบัตเตอร์เฮด 123.1 กรัมต่อต้น แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีปลูกพืชปกติ (47.3 47.3 และ 107.8 กรัมต่อต้น) และกรรมวิธีพ่นสูตรสำเร็จแกรนูลก่อนปลูกเชื้อรา 1 วัน + หลังปลูกเชื้อรา 3 และ 5 วัน (44.1 43.6 และ 117.6 กรัมต่อต้น) ส่งผลให้กรรมวิธีการทดลองดังกล่าวสามารถเพิ่มน้ำหนักผลผลิตได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีชุดควบคุม (ตารางที่ 21)

เมื่อเปรียบเทียบกรรมวิธีที่พ่นตำรับต่าง ๆ ก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุกับกรรมวิธีที่พ่นตำรับต่าง ๆ หลังปลูกเชื้อราสาเหตุ พบว่าทุกกรรมวิธีที่พ่นตำรับก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุมีแนวโน้มในการควบคุมโรคใบจุดได้ดีกว่ากรรมที่พ่นตำรับหลังปลูกเชื้อราสาเหตุ โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายใบต่ำกว่า จึงส่งผลให้น้ำหนักสดของผักสลัดทั้งสามชนิดมีค่ามากกว่ากรรมวิธีที่พ่นตำรับหลังปลูกเชื้อราสาเหตุ

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรคและการลดลงของใบที่เป็นโรคใบจุดของผักสลัดในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในโรงเรือนไฮโดรโพนิกส์

กรรมวิธีการทดลอง	ใบที่เป็นโรคต่อต้น (%)			ใบที่เป็นโรคลดลง (%)		
	GO	RC	BH	GO	RC	BH
1. สารฆ่าเชื้อรา mancozeb	12.0 d	10.3 c	15.7 d	71.0 a	77.9 a	76.3 a
2. สปอร์แขวนลอยก่อนปลูกเชื้อรา + หลังปลูกเชื้อรา	19.8 cd	19.4 b	35.5 d	51.7 ab	58.8 b	47.4 b
3. สปอร์แขวนลอยหลังปลูกเชื้อรา	28.0 bc	26.5 b	36.9 c	31.1 cd	43.5 b	45.2 b
4. สูตรสำเร็จแกรนูลก่อนปลูกเชื้อรา + หลังปลูกเชื้อรา	20.0 cd	19.4 b	22.7 d	53.2 ab	57.9 b	65.9 a
5. สูตรสำเร็จแกรนูลหลังปลูกเชื้อรา	23.2 c	25.0 b	33.3 c	43.6 bc	47.0 b	50.6 b
6. สูตรสำเร็จไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนปลูกเชื้อรา + หลังปลูกเชื้อรา	34.4 ab	40.6 a	55.0 b	20.3 de	16.3 c	18.9 c
7. สูตรสำเร็จไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังปลูกเชื้อรา	41.5 a	44.9 a	50.7 b	6.6 e	7.6 c	27.7 c
8. ปลูกพืชปกติ	12.0 d	23.3 b	22.7 d	70.7 a	50.9 b	66.0 a
9. ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อราอย่างเดียว)	41.5 a	48.0 a	67.9 a	0.0 f	0.0 c	0.0 d
F-test	**	**	**	**	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	19.0	15.8	13.2	29.3	27.4	16.6

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

GO = ผักสลัดกรีนโอ๊ค RC = ผักสลัดเรดคอรัล BH = ผักสลัดบัตเตอร์เฮด

ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลายใบและการลดลงของดัชนีการทำลายใบของผักสลัดในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในโรงเรือนไฮโดรโพนิกส์

กรรมวิธีการทดลอง	ดัชนีการทำลายใบ (เปอร์เซ็นต์)			เปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลายลดลง		
	GO	RC	BH	GO	RC	BH
1. สารฆ่าเชื้อรา mancozeb	14.0 c	10.0 e	23.0 f	71.9 a	78.3 a	70.7 a
2. สปอร์แขวนลอยก่อนปลูกเชื้อรา + หลังปลูกเชื้อรา	26.0 b	21.0 cd	50.0 cd	47.4 b	54.9 ab	37.1 cd
3. สปอร์แขวนลอยหลังปลูกเชื้อรา	29.0 b	32.0 b	57.0 c	41.8 b	30.4 c	28.3 d
4. สูตรสำเร็จก่อนปลูกเชื้อรา + หลังปลูกเชื้อรา	26.0 b	20.0 cd	39.0 e	47.5 b	56.4 ab	50.4 bc
5. สูตรสำเร็จหลังปลูกเชื้อรา	28.0 b	29.0 bc	47.0 d	43.1 b	37.4 bc	40.8 cd
6. สูตรสำเร็จไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนปลูกเชื้อรา + หลังปลูกเชื้อรา	46.0 a	37.8 b	70.0 b	8.9 c	24.4 c	12.3 e
7. สูตรสำเร็จไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังปลูกเชื้อรา	42.0 a	37.0 b	70.0 b	15.7 c	20.9 c	12.4 e
8. ปลูกพืชปกติ	15.0 c	15.0 de	34.0 e	60.0 a	68.3 a	57.5 ab
9. ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อราอย่างเดียว)	51.0 a	47.0 a	80.0 a	0.0 c	0.0 d	0.0 e
F-test	**	**	*	**	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	18.6	20.2	10.5	31.5	31.9	24.2

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

*,** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ 99 % ตามลำดับ

GO = ผักสลัดกรีนโอ๊ค RC = ผักสลัดเรดคอรัล BH = ผักสลัดบัตเตอร์เฮด

ตารางที่ 21 น้ำหนักสดและเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดของผักสลัดในแต่ละกรรมวิธีการทดลองในโรงเรือนไฮโดรโพนิกส์

กรรมวิธีการทดลอง	น้ำหนักสดของผลผลิต (กรัม/ต้น)			เปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสด		
	GO	RC	BH	GO	RC	BH
1. สารฆ่าเชื้อรา mancozeb	53.7 a	43.6 ab	123.1 a	65.2 a	42.9 a	52.4 a
2. สปอร์แขวนลอยก่อนปลูกเชื้อรา + หลังปลูกเชื้อรา	41.5 b	35.1 bc	99.7 ab	53.8 ab	29.9 a	40.4 ab
3. สปอร์แขวนลอยหลังปลูกเชื้อรา	27.3 c	33.3 cd	83.2 bc	32.0 bc	25.8 a	29.4 bc
4. สูตรสำเร็จก่อนปลูกเชื้อรา + หลังปลูกเชื้อรา	44.1 ab	43.6 ab	117.3 a	57.1 a	43.4 a	49.7 a
5. สูตรสำเร็จหลังปลูกเชื้อรา	37.5 b	34.7 c	105.2 ab	49.6 ab	28.8 a	43.9 ab
6. สูตรสำเร็จไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนปลูกเชื้อรา + หลังปลูกเชื้อรา	20.2 c	31.3 cd	72.5 cd	10.9 cd	21.2 ab	18.4 c
7. สูตรสำเร็จไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังปลูกเชื้อรา	26.3 c	31.6 cd	72.7 cd	28.9 bc	22.4 ab	18.7 c
8. ปลูกพืชปกติ	47.3 ab	45.0 a	107.8 ab	60.0 a	44.7 a	46.1 ab
9. ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อราอย่างเดียว)	18.7 c	25.0 d	57.9 d	0.0 d	0.0 b	0.0 d
F-test	**	**	**	**	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	16.4	13.3	14.5	34.1	43.5	27.9

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

GO = ผักสลัดกรีนโอ๊ค RC = ผักสลัดเรดคอรัล BH = ผักสลัดบัตเตอร์เฮด

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

งานทดลองนี้เป็นการนำวิธีการทางชีววิธีโดยนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพมาใช้ในการควบคุมโรคพืช ซึ่งการนำสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินป่าธรรมชาติภายในประเทศมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตร เป็นแนวทางที่เป็นผลดียิ่งต่อประเทศทั้งในด้านการพึ่งพาตนเอง และลดการนำเข้าสารเคมีและชีวภัณฑ์จากต่างประเทศ อีกทั้งเป็นการลดปริมาณการตกค้างของสารเคมีในผลผลิตและสิ่งแวดล้อม เกิดความปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค และเป็นแนวทางที่สามารถพัฒนาไปสู่การเกษตรที่ยั่งยืนได้ สำหรับโรคพืชที่ทำการศึกษาคือโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ ที่มีเชื้อสาเหตุมาจากเชื้อรา *Alternaria* spp. ซึ่งเป็นโรคที่ปัจจุบันพบระบาดเข้าทำลายพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของผักสลัดลดลงเป็นอย่างมาก โดยมีขั้นตอนการศึกษาเริ่มจากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักสลัด และทำการพิสูจน์การเกิดโรคเพื่อหาสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด นำไปจำแนกชนิดของเชื้อ และทำการเก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. และทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียดังกล่าวในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดสำหรับนำไปพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จรูปแบบแกรนูลละลายน้ำ และใช้ทดสอบการควบคุมโรคใบจุดในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

จากการสำรวจการเกิดโรคใบจุดจากฟาร์มที่มีการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ในจังหวัดต่างๆ จำนวน 14 ฟาร์ม พบการเกิดโรคใบจุดในผักสลัดทุกฟาร์ม และพบอาการของโรคได้ทั้งการปลูกในโรงเรือนปิดที่มีการควบคุมอุณหภูมิภายในโรงเรือน (vaporative cooling) โรงเรือนแบบมุ้งตาข่าย และโรงเรือนแบบเปิดหรือสภาพกลางแจ้ง ทั้งนี้อาจเนื่องจากการปลูกพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์มีอุณหภูมิและความชื้นภายในโรงเรือนสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโรคพืชและการแพร่ระบาดของแมลง (Menzies *et al*., 1996) นอกจากนี้เชื้อรา *Alternaria* spp. เป็นเชื้อราที่สามารถขยายพันธุ์และแพร่กระจายได้ง่าย โดยปลิวไปกับลม ติดไปกับแมลง น้ำฝน หรือน้ำที่ใช้ในระบบพ่นฝอย ก่อให้เกิดการระบาดหรือแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นหรือต้นข้างเคียงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟาร์มที่ปลูกในระบบเปิดหรือสภาพกลางแจ้งที่สภาพแวดล้อมรอบๆแปลงปลูก มีผลต่อการเกิดโรคใบจุดมาก เพราะโดยธรรมชาติของเชื้อรานี้

สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งบนพืชที่มีชีวิตและตายแล้ว (Thomma, 2003) ดังนั้นต้นพืชหรือวัชพืชทั้งใต้โต๊ะปลูกและบริเวณรอบแปลงปลูก จะเป็นแหล่งอาศัยของเชื้อราสาเหตุได้ดี ด้วยเหตุนี้ ในช่วงหน้าร้อนที่มีการให้น้ำระบบพ่นฝอยเพื่อลดอุณหภูมิแก่ผักสลัด ทำให้สปอร์เชื้อราปลิวไปกับน้ำพ่นฝอยกระจายไปอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดการระบาดของโรคใบจุดทั่วทั้งแปลง นอกจากนี้เหตุผลอีกประการที่ทำให้เกิดโรคใบจุดระบาดเข้าทำลายผักสลัด เนื่องจากพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์โดยส่วนใหญ่มีความต้านทานต่อโรคน้อยกว่าพืชที่ปลูกบนดิน เพราะผักที่เจริญเติบโตเร็วมักมีเซลล์ที่อวบน้ำ ผนังเซลล์บาง ทำให้เชื้อโรคเข้าทำลายได้ง่าย (จิระเดช, 2547) และการปลูกพืชระบบนี้มีเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์น้อย ทำให้ไม่มีการปกป้องตามธรรมชาติต่อเชื้อโรคพืช (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2550)

เมื่อนำตัวอย่างผักสลัดที่แสดงอาการโรคใบจุดคือเป็นแผลสีน้ำตาล เป็นวงแหวนซ้อนกัน มาแยกเชื้อราสาเหตุ พบว่าแยกเชื้อรา *Alternaria* spp. ได้ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4) โดยสามารถแยกได้จากทุกฟาร์ม แต่มี 3 ฟาร์ม เมื่อนำตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคมาแยกบนอาหาร PDA ปรากฏว่าเกิดการปนเปื้อนกับเชื้อจุลินทรีย์อื่นจนไม่สามารถแยกเชื้อรา *Alternaria* spp. ให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ และคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรา *Alternaria* spp. ที่มาจากพื้นที่ต่างกัน จากผักชนิดต่างกัน และมีลักษณะเส้นใยต่างกัน ได้จำนวน 7 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4) สำหรับนำไปพิสูจน์การเกิดโรคเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดรุนแรงที่สุด

2. การพิสูจน์การเกิดโรค

จากการนำเชื้อรา *Alternaria* spp. ที่คัดแยกได้ จำนวน 7 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการเกิดโรคใบจุดบนผักสลัดบัตเตอร์เฮด กรีนโอ๊ค และเรดคอรัล พบว่าเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์ สามารถทำให้เกิดโรคอยู่ในระดับที่ไม่รุนแรงมาก อาจเนื่องจากมีปัจจัยในการเกิดโรคไม่เหมาะสม โดยในขณะที่ทำการทดลองสภาพอากาศค่อนข้างร้อนและมีความชื้นต่ำ ทำให้เกิดอาการของโรคช้าและไม่รุนแรง ซึ่งสภาพแวดล้อมที่เหมาะต่อการเกิดโรคใบจุดคือภูมิอากาศมีความชื้นสูง มีหมอกน้ำค้างจัด หรือฝนตกติดต่อกันเป็นเวลานาน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์อยู่ในช่วง 24-30 องศาเซลเซียส (ศักดิ์, 2537) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์ ก่อให้เกิดโรคใบจุดในผักสลัดบัตเตอร์เฮดได้รุนแรงกว่าผักสลัดเรดคอรัลและกรีนโอ๊ค ซึ่งอาจเป็นเพราะลักษณะใบและส่วนประกอบของใบพืชอาศัยแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน จึงส่งผลให้เกิดความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคได้ต่างกัน โดยใบผักสลัดบัตเตอร์เฮดมีลักษณะอ่อนและนิ่ม (นิพนธ์, 2550) และอวบน้ำมากกว่าใบผักสลัดเรดคอรัลและกรีนโอ๊ค ซึ่งอาจจะทำให้เชื้อสาเหตุเข้าสัมผัสหรือแทรกซึม และดูดซับธาตุอาหารจากใบพืชได้ดีกว่า จึงทำให้ผักสลัดบัตเตอร์เฮดแสดงอาการโรคใบจุดได้มากกว่า โดยเชื้อสาเหตุอาจจะเข้าทำลายพืชโดยการสร้างสารพิษเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อพืชหรือผลิตสารยับยั้งการสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของ

พืช หรืออาจจะผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่ย่อยสลายโครงสร้างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์พืช (พรทิพย์, 2533) ทำให้พืชเกิดการอ่อนแอและแสดงอาการของโรคได้ สำหรับเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่สามารถก่อให้เกิดโรคใบจุดรุนแรงมากที่สุดบนผักสลัดทั้ง 3 ชนิด คือสายพันธุ์ LRC 4-6 (ตารางที่ 6) ซึ่งแยกได้จากผักสลัดเรดคอรัล จากฟาร์มในพื้นที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร ซึ่งเป็นฟาร์มที่พบการเกิดโรคทั้งโรครากเน่าและโรคใบจุด ระบาดทำความเสียหายให้กับพืชค่อนข้างรุนแรง (โดยเฉพาะในผักสลัดบัตเตอร์เฮด เรดคอรัล และกรีนโฮ๊ค) เนื่องจากสภาพแวดล้อมรอบ ๆ แปลงปลูกดังกล่าว มีต้นไม้ล้อมรอบ และมีพวกวัชพืชต่าง ๆ ทั้งบริเวณรอบและใต้โต๊ะปลูกเป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจเป็นพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุได้เป็นอย่างดี ด้วยเหตุนี้จึงสามารถคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรา *Alternaria* sp. ที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดรุนแรงได้ และจากการสังเกตพบว่าผักสลัดบัตเตอร์เฮดเกิดโรคใบจุดค่อนข้างรุนแรง แต่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างผักได้เพราะผักดังกล่าวปลูกอยู่ในพื้นที่ด้านใน ซึ่งเจ้าของฟาร์มอนุญาตให้เก็บตัวอย่างเฉพาะบริเวณรอบนอก จึงเก็บตัวอย่างได้เฉพาะผักสลัดเรดคอรัลซึ่งปลูกอยู่บริเวณริมนอกสุด

ลักษณะอาการโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. สายพันธุ์ LRC 4-6 เริ่มสังเกตเห็นเป็นจุดเล็ก ๆ สีเหลืองขึ้นบนใบหลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 4 วัน ต่อมาแผลค่อย ๆขยายใหญ่ขึ้นเป็นวงกลมซ้อนกันหลายวง มีสีน้ำตาลถึงดำ ซึ่งพบอาการได้ชัดเจนหลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 10 วัน โดยสามารถพบอาการของโรคมากที่สุดที่บริเวณใบล่างหรือใบแก่ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อต้นผักสลัดโตขึ้น ขนาดของทรงพุ่มจะกว้างขึ้น ระยะระหว่างต้นจึงชิดกันมากจนแสงแดดส่องเข้าไปไม่ถึง ทำให้บริเวณทรงพุ่มมีความชื้นสูง ซึ่งเหมาะต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุได้ดี (ศักดิ์, 2537) และเมื่อนำชิ้นส่วนผักสลัดที่แสดงอาการของโรคมาวางเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง พบว่ามีลักษณะเส้นใยฟูสีเขียวปนเทาเหมือนกับที่เลี้ยงในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ครั้งแรก (ภาพที่ 7)

3. การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Alternaria* sp.

เมื่อนำเชื้อรา *Alternaria* sp. สายพันธุ์ LRC 4-6 ที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดรุนแรง มาจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ปรากฏว่าเป็นเชื้อรา *Alternaria longipes* โดยมีลักษณะของโคนิดิโอฟอร์เกิดแบบเดี่ยว ๆ หรือเกิดเป็นกลุ่ม มีลักษณะตรงจนถึงหักไปมา หรือโค้งงอ รูปร่างทรงกระบอก สีน้ำตาลเข้ม ผนังเรียบมีผนังกั้น สปอร์มีลักษณะคล้ายกระบอง สีน้ำตาลเข้ม ผนังเรียบ ขนาดความกว้าง 11-21 ไมครอน ความยาว 35-110 ไมครอน ปลายของ beak มีลักษณะโป่งพองและมีผนังกั้น ลักษณะโคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-9 เซนติเมตร ลักษณะเส้นใยฟูสีเขียวเทา เจริญเป็นวงแหวนขยายออกไป ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคใบจุดในผักโดยเชื้อราชนิดนี้ งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีเชื้อรา *Alternaria* sp. หลายชนิดที่สามารถก่อให้เกิดโรคใบจุดในพืชได้ เช่น เชื้อรา *A. zinnia*, *A.*

helianthi และ *A. alternata* ก่อให้เกิดโรคใบจุดในทานตะวัน (สำอาง, 2534) *A. brassicicola* และ *A. brassicae* สาเหตุโรคใบจุดในพืชตระกูลกะหล่ำ (สกุลศักดิ์, 2540; เทอดพันธ์, 2548) *A. porri* สาเหตุโรคใบจุดสีม่วงของหอมญี่ปุ่น *A. solani* สาเหตุโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ และ *A. cucumerina* สาเหตุโรคใบจุดของแตงกวาญี่ปุ่น (สุคนธ์ทิพย์, 2543)

4. การแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดิน

เมื่อนำตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าธรรมชาติชนิดต่าง ๆ มาแยกแบคทีเรีย พบว่าสามารถแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้ทั้งหมด 356 สายพันธุ์ โดยสามารถแยกได้จากดินพื้นที่ป่าดิบชื้นมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบจากตัวอย่างดินที่เท่ากัน คือประมาณ 5 สายพันธุ์ต่อ 1 ตัวอย่างดิน รองลงมาพื้นที่ป่าเบญจพรรณและป่าดิบแล้ง ซึ่ง *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ อากาศ ส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินป่าธรรมชาติ (Bull *et al*., 1992) เช่น ป่าดิบชื้น ป่าเบญจพรรณ ป่าดิบแล้ง และป่าเต็งรัง ซึ่งเป็นป่าเขตร้อนที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง โดยในพื้นที่ 1 ตารางกิโลเมตร สามารถพบพันธุ์ไม้และพันธุ์สัตว์ได้หลายร้อยชนิด มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตและมีความสมดุลของระบบนิเวศ อาจกล่าวได้ว่าเกือบทุกตารางนิ้วจะมีสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งอาศัยอยู่ (สมศักดิ์, 2552) เพราะภายใต้สภาพป่าที่สมบูรณ์ แร่ธาตุอาหารจะถูกดูดซับและอนุรักษ์ให้คงอยู่และหมุนเวียนในระบบอย่างสมดุล (นิวัติ, 2546) ซึ่งในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงจะพบกลุ่มจุลินทรีย์ในดินได้มากถึงพันล้านเซลล์ต่อดินหนึ่งกรัม (สุบัณฑิต, 2549) อีกทั้งดินในสภาพป่าธรรมชาติไม่ปนเปื้อนจากสารเคมี จึงมีโอกาสทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีความหลากหลายและมีศักยภาพสูงในการควบคุมเชื้อโรคพืชได้ โดย Lisboa และคณะ (2006) สามารถแยกแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* จากดินป่าไม้พื้นเมืองของประเทศบราซิล ซึ่งเชื้อดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการผลิตสาร bacteriocin ยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียได้ดี

5. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp.

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 โดยนำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้จำนวน 356 สายพันธุ์มาทดสอบด้วยวิธีการ dual culture technique บนอาหาร PDA ผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 18 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ได้ดีแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม (ตารางที่ 9) โดยทำให้เกิดบริเวณยับยั้งขึ้น

ระหว่างแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเชื้อราสาเหตุ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากบริเวณของชุดควบคุมหรือบริเวณที่เชื้อราไม่สัมผัสกับแบคทีเรียปฏิปักษ์อย่างชัดเจน การเกิดบริเวณยับยั้งอาจเนื่องจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ปลดปล่อยสารบางอย่างออกมาที่สามารถละลายน้ำและแพร่ซึมเข้าไปในอาหารวุ้น ซึ่งสารที่ปล่อยออกมามีฤทธิ์ที่สามารถต่อต้านเชื้อราได้ (สุชล, 2539) ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเข้าใกล้หรือไม่สามารถเจริญผ่านแบคทีเรียไปได้ โดยสังเกตได้จากการมีบริเวณยับยั้งที่กว้าง และเมื่อนำเส้นใยเชื้อราบริเวณที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าบริเวณปลายเส้นใยแตกต่างไปจากเส้นใยปกติอย่างชัดเจน กล่าวคือ เส้นใยมีลักษณะสั้น บวมและโป่งพอง ผนังเซลล์หนาขึ้น (ภาพที่ 9) ในขณะที่ปลายเส้นใยปกติไม่บวมและสามารถงอกเป็นสายยาวได้ โดยปกติเส้นใยเชื้อรามีการเจริญทางปลายยอด ส่วนที่กำลังเจริญคือส่วนปลายของเส้นใย (hyphal tip) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเติบโต โดยเฉพาะสารไคติน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ที่ทำให้เส้นใยเชื้อรายืดยาวออกไปได้ ดังนั้นส่วนปลายของเส้นใยเชื้อราเป็นส่วนที่ไวต่อสารเคมีต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา แสดงให้เห็นว่าสารที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ปลดปล่อยออกมามีผลต่อการเจริญของเชื้อรา โดยอาจจะยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อรา และทำให้การนำสารเข้าออกเซลล์ผิดปกติ ส่งผลให้เชื้อราไม่สามารถแบ่งตัวต่อไปได้ (สมใจ, 2531) จึงมีลักษณะเส้นใยบวมและมีผนังหนาขึ้น หากเป็นเช่นนี้นานอาจทำให้เซลล์ตายได้ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของสุมาลีและคณะ (2542) ที่พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* N□1 และ N□2 สามารถสร้างสารปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุของโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ โดยทำให้ปลายเส้นใยของเชื้อราที่สัมผัสกับแบคทีเรียปฏิปักษ์แสดงอาการผิดปกติ และไม่สามารถก่อโรคในพืชได้ และเพื่อเป็นการยืนยันว่าสารที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ผลิตออกมา มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *A. longipes* LRC4-6 อย่างแท้จริง จึงนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ 18 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้ มาทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6

การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 18 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้สร้างสารปฏิปักษ์ แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 โดยวิธีการ pour plate ผสมกับอาหาร PDA double strength นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน วัดผลการทดลองโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยสารปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ คือสารที่มีฤทธิ์ทำให้ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบมีขนาดเล็กกว่าชุดควบคุมซึ่งใช้อาหารเหลว PDB แทนสารปฏิปักษ์ ผลการทดลองพบว่าสารปฏิปักษ์ที่ผลิตจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกสายพันธุ์ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม เนื่องจากเมื่อเลี้ยงเชื้อราลงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ เชื้อราอาจดูดซับสารปฏิปักษ์เข้าไปในเส้นใย และไปมีผลรบกวน

หรือขัดขวางกระบวนการเติบโตระยะใดระยะหนึ่งของเชื้อรา ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อราหยุดชะงักหรือโตช้ากว่าปกติ ทำให้โคโลนีที่ได้มีขนาดเล็กกว่าโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบ (ภาพที่ 10) โดยสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD 3-1 ทั้งที่ไม่นึ่งและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเท่ากับ 95.3 และ 97.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 10) และเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. longipes* พบว่าให้ผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการทดสอบสารปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา กล่าวคือสารปฏิปักษ์ที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ผลิตขึ้นทั้งที่ไม่นึ่งและนึ่งฆ่าเชื้อสามารถยับยั้งการงอกของเชื้อราได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม (ตารางที่ 11) โดยสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD 3-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดีที่สุด แม้ผ่านความร้อนสูง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารปฏิปักษ์ที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 18 สายพันธุ์ ผลิตออกมา มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 อย่างแท้จริง โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดีแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม ซึ่งอาจเนื่องจากสารปฏิปักษ์มีผลขัดขวางหรือรบกวนต่อการเติบโตของเชื้อรา หรือยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (สมใจ, 2531) เส้นใยเชื้อราจึงหยุดชะงักการเจริญ นอกจากนี้มีผลให้ germ tube ที่งอกออกมาจากสปอร์เชื้อรา มีลักษณะสั้นกุด บวมกลมและโป่งพอง (ภาพที่ 11) ซึ่งสปอร์เชื้อราเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคในพืช โดยสปอร์จะปลิวไปตกบนพืช เมื่อมีความชื้นหรือสภาวะที่เหมาะสมสปอร์จะงอก germ tube และสร้าง appressorium เพื่อเกาะผิวพืชและแทงทะลุเข้าไปในเซลล์ของพืช (พรทิพย์, 2533) ถ้าสารใดสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ก็มีศักยภาพที่จะยับยั้งหรือชะลอการเกิดโรคได้ โดยสารปฏิปักษ์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นอาจมีส่วนประกอบเป็นสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ ซึ่งสารเหล่านี้สามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคได้ (Shogi, 1978) เพราะในธรรมชาติมีอาหารอยู่อย่างจำกัดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิด ดังนั้นถ้าจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้ ก็เท่ากับเป็นการลดคู่แข่งในการเจริญ (Gottieb, 1976) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Kong และคณะ (1997) ที่พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis B. cereus* และ *B. mycoides* ที่แยกได้จากใบทานตะวัน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. helianthi* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดในทานตะวันได้ดี โดยทำให้ germ tube ที่งอกออกมาจากสปอร์เชื้อรา มีลักษณะบวมพองและผนังเซลล์หนาขึ้น และจากการศึกษาของ Perello และคณะ (2002) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และ *Penicillium lilacinus* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. triticimaculan* ที่เป็นสาเหตุของโรคทางใบของข้าวสาลีได้

นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่าสารปฏิปักษ์ที่ผลิตจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีความคงตัวสูง สามารถทนต่ออุณหภูมิ (ความร้อน) สูงได้ โดยเฉพาะสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD 3-1 เมื่อนำไปผ่านความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดี อาจเนื่องจากสารปฏิปักษ์มีส่วนประกอบที่ทนหรือไม่สลายเมื่อสัมผัสความร้อนหรืออุณหภูมิสูง ซึ่งสารปฏิปักษ์ดังกล่าวอาจเป็นสารปฏิชีวนะประเภทเปปไทด์ หรือกลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่างและเสถียรที่อุณหภูมิสูง (Priest, 1977) หรือกลุ่มของสารระเหย (Chaurasia *et al*., 2005) ที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านหรือทำลายเชื้อก่อโรคพืชได้ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Von der Weid และคณะ (2003) ที่ศึกษาพบว่าสารปฏิปักษ์ของ *Paenibacillus peoriae* NRRLBD-62 ซึ่งแยกได้จากดิน มีความเสถียรหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ และช่วงความเป็นกรด-ด่าง ที่กว้าง เมื่อทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *Micrococcus* spp. และ *Agrobacterium tumefaciens* ที่เป็นสาเหตุของโรคปุ่มปม พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ดี และ Leelasuphakul และคณะ (2006) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS 89-24 ทนต่อความร้อนได้ดี และยังคงยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคของข้าวได้ดี

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1 สามารถยับยั้งเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ได้ดี เมื่ออยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีธาตุอาหารต่าง ๆ สมบูรณ์ ดังนั้นเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงในการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปควบคุมโรคใบจุดในสภาพธรรมชาติ จึงควรพัฒนาให้อยู่รูปแบบที่เหมาะสม โดยมีส่วนประกอบที่ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการควบคุมโรค เช่น สารช่วยในการแตกตัว สารช่วยยึดเกาะ เพื่อให้แบคทีเรียมีความคงตัวและสามารถยึดติดบนใบผักได้ สารปฏิปักษ์ที่แบคทีเรียผลิตยังคงออกฤทธิ์ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคได้ดี เช่นเดียวกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ

6. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp.

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1 ไปจำแนกชนิดของเชื้อ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีรูปร่างเซลล์แบบแท่ง ติดสีแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ มีความสามารถในการเคลื่อนที่ สามารถรีดิวส์ไนเทรตให้เป็นไนไตรต์หรือก๊าซไนโตรเจนได้ เจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงได้ ใช้ซิเทรตและน้ำตาลต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน และสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ โดยทั่วไปแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ 5-20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูง 45-55 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีเมื่อมีอากาศและความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง และมีการสร้าง

เอนโดสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมแปรปรวนได้ดี (Boer and Diderichsen, 1991) และเป็นเชื้อที่ได้มีการศึกษาแล้วว่ามีความปลอดภัยในการนำมาใช้ (Westers *et al*., 2004) ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมามีการนำ *B. subtilis* มาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มักพบอาศัยอยู่ภายในพืชโดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อพืชที่อยู่อาศัย สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิดในขณะเดียวกันสามารถแข่งแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ ในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน ปรับตัวให้ทนต่อสภาพอากาศร้อนชื้นได้ดี และแบคทีเรีย *B. subtilis* บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารพวก toxic metabolite บางชนิดที่เป็นประโยชน์ในการนำมากระตุ้นให้พืชเกิดความทนทานต่อเชื้อสาเหตุของโรคพืชที่เข้าทำลาย(นลินีและคณะ, 2534) แบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชได้หลายชนิดเช่น *A. helianthi* สาเหตุโรคใบจุดในทานตะวัน (Kong *et al*., 1997) *Cercospora beticola* สาเหตุโรคใบจุดในซูการ์บีท (Collins and Jacobsen, 2003) *Pestalotiopsis mangiferae*, *Botryodiplodia theobromae* และ *Macrophoma mangiferae* สาเหตุโรคใบจุดในมะม่วง (Okigbo and Osuine, 2003) *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรครากเน่าในมะเขือเทศ (Szczech and Shoda, 2004) และโรคกาบใบแห้งของข้าว (Leelasuphakul *et al*., 2006)

7. การเตรียมสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ

การนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปเซลล์สดมาใช้ในการควบคุมโรคพืชมีข้อจำกัดในเรื่องความคงตัวของเชื้อต่ำ ไม่สะดวกในการนำไปใช้ เก็บรักษายากและระยะเวลาในการเก็บรักษาสั้น ส่งผลให้ลดประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้อยู่ในรูปแบบที่มีความคงตัวสูง สะดวกในการนำไปใช้และเก็บรักษาได้นานโดยไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการควบคุมโรคพืช โดยรูปแบบหนึ่งที่น่าสนใจคือสูตรสำเร็จแกรนูล ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีความคงตัวดีเพราะมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอากาศน้อย ไม่จับตัวเป็นก้อนแข็งเหมือนสูตรสำเร็จแบบผง และเปียกน้ำได้ง่ายกว่า (อัจฉรา, 2536) และไม่ฟุ้งกระจาย ซึ่งสะดวกต่อการนำไปใช้ อีกทั้งขั้นตอนและเครื่องมือในการผลิตไม่ยุ่งยากและซับซ้อน และต้นทุนในการผลิตน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรสำเร็จแบบเม็ด ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 ที่คัดเลือกได้ มาเตรียมและพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูล โดยนำสปอร์แขวนลอยของ *B. subtilis* LPDD 3-1 ผสมกับสารประกอบ ได้แก่ sodium alginate, PVP(k-30) และ lactose monohydrate ในอัตราส่วนต่าง ๆ (ตารางที่ 3) เมื่อทำการประเมินผลสูตรสำเร็จพบว่าสูตรสำเร็จที่ผลิตได้มีลักษณะเป็นแกรนูลสีขาวครีม ไม่จับตัวเป็นก้อนแข็ง และมีความสม่ำเสมอของแบคทีเรียปฏิปักษ์เท่ากันทั้งสูตร แสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องมือและวิธีการเตรียมสูตรและความเหมาะสมของส่วนประกอบในสูตรสำเร็จ โดยสูตรสำเร็จที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย sodium alginate 12.5 เปอร์เซ็นต์ PVP(k-30) 12.5 เปอร์เซ็นต์ lactose monohydrate 75 เปอร์เซ็นต์ และสปอร์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 จำนวน 4.4 x 10^{15} cfu มี

คุณสมบัติที่เหมาะสมที่สุด กล่าวคือหลังจากผ่านขั้นตอนกระบวนการผลิตมีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอดในสูตรสำเร็จสูงสุด (7.7 ± 0.5 × 10^9 cfu ต่อกรัม) และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 เดือน พบว่ามีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดสูงและค่อนข้างคงตัว (10^9 cfu ต่อกรัม) อัตราการลดลงของแบคทีเรียปฏิปักษ์น้อยมากถึงแม้เก็บไว้นาน 6 เดือน และไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ทั้งนี้การที่ปริมาณเชื้อในสูตรสำเร็จมีอัตราการลดลงต่ำ อาจเนื่องจากการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมแปรปรวนได้ดีมาผลิตเป็นสูตรสำเร็จ และการที่แบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่ในสูตรสำเร็จรูปแบบแกรนูล เชื้อสามารถจับอยู่ได้ทั้งที่บริเวณผิวภายนอกและภายในแกรนูล ซึ่งเชื้อที่อยู่ภายในแกรนูลสามารถที่จะช่วยป้องกันไม่ให้ถูกรบกวนจากสภาพแวดล้อมภายนอกได้ จึงทำให้สูตรสำเร็จมีปริมาณเชื้ออยู่รอดสูงและมีความคงตัวมากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wiwattanapatapee และคณะ (2007) ที่นำสปอร์แขวนลอยของแบคทีเรีย *B. megaterium* มาพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จรูปแบบแกรนูลฟู่สำหรับพ่นหรือหว่านเพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 เดือน ยังคงมีแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีชีวิตรอดในสูตรสำเร็จปริมาณสูงถึง 10^9 cfu ต่อกรัม นอกจากนี้สูตรสำเร็จแกรนูลสูตรที่ 1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ได้ดี (98.6 เปอร์เซ็นต์) โดยแต่ละเดือนมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลงน้อยมาก (ภาพที่ 18) แสดงว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถมีชีวิตรอดในสูตรสำเร็จได้และยังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ดีถึงแม้จะใช้ระยะเวลาในการเก็บรักษาที่นานขึ้น และเมื่อทดสอบการติดใบและความสามารถในการอยู่รอดบนใบผักสลัดหลังจากพ่นสูตรสำเร็จเป็นเวลา 1 4 7 และ 10 วัน พบว่าสูตรสำเร็จที่ 1 สามารถฉีดพ่นได้ง่ายไม่อุดตันหัวฉีด และมีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอดบนใบผักสลัดสูงสุด โดยหลังจากพ่นสูตรสำเร็จเป็นเวลา 10 วัน ยังมีแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่รอดบนใบผักสลัดกรีนโอ๊ค เรดคอรัล และบัตเตอร์เฮด สูงถึง 7.0 x 10^6 7.5 x 10^6 และ 1.2 x 10^6 cfu ต่อกรัมพืช ตามลำดับ (ตารางที่ 18) ซึ่งอาจเนื่องจากสูตรสำเร็จที่ 1 มี sodium alginate เป็นส่วนประกอบมากกว่าสูตรสำเร็จอื่น ๆ ซึ่งสารตัวนี้มีคุณสมบัติทั้งช่วยในการยึดเกาะและช่วยในการแตกกระจายตัว ทำให้มีค่าความหนืดที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มากที่สุด (18.90 cps) ส่งผลให้เชื้อสามารถยึดติดอยู่บนใบผักสลัดได้นาน สอดคล้องกับการศึกษาของอมรรัตน์ (2547) พบว่า หลังจากพ่นสูตรสำเร็จที่มีสารยึดเกาะเป็นส่วนประกอบในปริมาณมาก เป็นเวลานาน 7 วัน ยังมีแบคทีเรีย *B. firmus* อยู่รอดบนใบและก้านใบของถั่วหรั่งถึง 2.2 x 10^6 และ 3.3 x 10^6 cfu ต่อกรัมพืช ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม ความสามารถของแบคทีเรียในการติดอยู่บนใบพืชแต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้นอกจากขึ้นอยู่กับสารช่วยในการยึดเกาะแล้ว ลักษณะโครงสร้างของใบพืชนั้น ๆ น่าจะเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการ ซึ่งผักสลัดเรดคอรัลและกรีนโอ๊คมีลักษณะใบเจริญเป็นกระจุกและหยิกเป็นคลื่น ส่วนใบผักสลัดบัตเตอร์เฮดมีลักษณะผิวใบมันและลื่นเหมือนเคลือบด้วยน้ำมัน (นิพนธ์, 2550) ด้วยเหตุนี้เมื่อพ่นสูตรสำเร็จ

ลงบนใบผักสลัดเรดคอรัลและกรีนโอ๊คทำให้เชื้อสามารถยึดติดอยู่บนใบได้มากกว่าผักสลัดบัตเตอร์เฮด

จากเหตุผลข้างต้น สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลสูตรที่ 1 จึงมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการควบคุมโรคใบจุดในผักสลัด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Burges (1998) ที่กล่าวว่า สูตรสำเร็จที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชที่ดีต้องเป็นสูตรที่สามารถเตรียมได้ง่าย จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่พัฒนาเป็นสูตรสำเร็จต้องมีปริมาณของเชื้อที่ใกล้เคียงกันและได้มาตรฐานทุกครั้งที่ผลิต ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคคงที่และสม่ำเสมอ มีอายุการเก็บรักษานาน อยู่ในรูปที่เหมาะสมซึ่งสามารถนำไปใช้งานได้ง่าย ดังนั้นจึงคัดเลือกสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลสูตรที่ 1 ไปควบคุมโรคใบจุดในผักสลัดที่ปลูกในโรงเรือนระบบไฮโดรโพนิกส์ต่อไป

8. การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ ต่อการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

เมื่อนำสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 รูปแบบแกรนูลสูตรที่ 1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 บนผักสลัด 3 ชนิด (กรีนโอ๊ค เรดคอรัล และบัตเอตร์เฮด) โดยปลูกผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์แบบระบบน้ำลึก (DFT) ในสภาพโรงเรือนมุ้งตาข่าย เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์กับสารฆ่าเชื้อรา mancozeb สปอร์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ และสูตรสำเร็จที่ไม่ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีการใช้สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ สารฆ่าเชื้อรา mancozeb และสปอร์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ให้ผลในการควบคุมโรคใบจุดในผักสลัดทั้ง 3 ชนิดได้ดีแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (ปลูกเชื้อราอย่างเดียว) โดยกรรมวิธีการใช้สารฆ่าเชื้อรา mancozeb สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด สามารถลดเปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรคและดัชนีการทำลายใบได้มากที่สุด ส่งผลให้ได้ค่าน้ำหนักของผลผลิตผักสลัดมากกว่ากรรมวิธีอื่น สำหรับกรรมวิธีที่ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีรองลงมา คือกรรมวิธีปลูกพืชปกติกรรมวิธีพ่นสูตรสำเร็จก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุ 1 วัน และพ่นซ้ำหลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 3 และ 5 วัน และกรรมวิธีพ่นสปอร์แขวนลอยก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุ 1 วัน และพ่นซ้ำหลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 3 และ 5 วัน (ตารางที่ 19-21)

เมื่อเปรียบเทียบการใช้สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์กับการใช้สารฆ่าเชื้อรา mancozeb พบว่ากรรมวิธีพ่นสูตรสำเร็จก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุ 1 วัน และพ่นซ้ำหลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 3 และ 5 วัน มีแนวโน้มในการควบคุมโรคได้ดีใกล้เคียงกับการใช้สารฆ่าเชื้อรา mancozeb กล่าวคือมีเปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรคและน้ำหนักสดของผักสลัดไม่แตกต่างทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกรรมวิธีการใช้สารฆ่าเชื้อรา mancozeb กับกรรมวิธีการพ่นสูตรสำเร็จแบคทีเรีย

ปฏิปักษ์หลังปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 1 3 และ 5 วัน พบว่ากรรมวิธีการใช้สารฆ่าเชื้อรา mancozeb สามารถควบคุมโรคได้ดีกว่าอย่างชัดเจน กล่าวคือ ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรค และดัชนีการเข้าทำลายใบต่ำกว่า และให้ค่าน้ำหนักของผลผลิตของผักสลัดทั้งสามชนิดมากกว่า

เมื่อเปรียบเทียบการใช้สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์กับการใช้สปอร์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรค ดัชนีการเข้าทำลายใบ และน้ำหนักสดของผักสลัดไม่แตกต่างกัน แต่การใช้สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งกรรมวิธีการพ่นก่อนปลูกเชื้อราและหลังปลูกเชื้อราสาเหตุ โดยเฉพาะกรรมวิธีพ่นสูตรสำเร็จก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุ 1 วัน และพ่นซ้ำหลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 3 และ 5 วัน มีแนวโน้มในการควบคุมโรคใบจุดบนผักสลัดทั้งสามชนิดได้ดีกว่ากรรมวิธีการพ่นสปอร์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งก่อนปลูกและหลังปลูกเชื้อรา ซึ่งผลดังกล่าวอาจสันนิษฐานได้ว่าสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์มีสารยึดเกาะเป็นส่วนประกอบ เมื่อพ่นลงไปบนใบผักสลัดทำให้แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถติดอยู่ได้มากและนานกว่าสปอร์แขวนลอย โดยจากการทดสอบการติดใบและความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จบนผักสลัด หลังจากพ่นสูตรสำเร็จเป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอดบนใบผักสลัดในปริมาณสูง (ตารางที่ 18)

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการใช้สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์และสปอร์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุกับหลังปลูกเชื้อราสาเหตุ) ในการควบคุมโรคใบจุด พบว่าการใช้สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์และสปอร์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยวิธีการพ่นก่อนปลูกเชื้อรา 1 วัน และพ่นซ้ำหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุ มีแนวโน้มในการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดได้ดีกว่าการใช้สูตรหลังจากเกิดโรคแล้ว ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้สูตรสำเร็จก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุ แบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จที่ใส่ลงไปช่วยควบคุมเชื้อสาเหตุที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติบนผักสลัด ทำให้ช่วยลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคลง และเมื่อปลูกเชื้อสาเหตุลงไปแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ยังมีชีวิตอยู่ไปช่วยควบคุมเชื้อสาเหตุได้ระดับหนึ่งก่อนที่เชื้อสาเหตุเจริญลุกลามไปยังบริเวณส่วนอื่นของใบ และเมื่อใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ซ้ำอีกในวันที่ 3 และ 5 หลังจากปลูกเชื้อรา จึงส่งเสริมให้การควบคุมโรคมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีใช้เพื่อป้องกันโรคมากกว่าการกำจัดหรือรักษา (Lurie, 1998) ซึ่งการใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ลงไปก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุ ทำให้แบคทีเรียมีโอกาสเจริญและสามารถครอบครองพื้นที่ ดูดซึมอาหารได้ก่อนเชื้อสาเหตุ รวมทั้งอาจเหนี่ยวนำให้ใบพืชเกิดการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุได้ หรือแบคทีเรียเองสามารถผลิตสารออกมายับยั้งการเจริญของรา ซึ่งเหตุการณ์นี้เป็นกลไกธรรมชาติในการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต (นิพนธ์, 2539 ; Spadaro and Gullino, 2004) ผลการทดลองนี้เป็นไปในทำนองเดียวกับการศึกษาของภรณี (2546) ที่พบว่าวิธีการปลูกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* ThB-I-54 ก่อนปลูกเชื้อรา *Rhizoctonia solani* เป็นเวลา 2 วัน สามารถควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งได้ดี 74.4 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาของ Yoshida และคณะ (2001) พบว่าการใช้สารปฏิปักษ์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* RC-2

โดยวิธีการใส่สารปฏิปักษ์ก่อนปลูกเชื้อรา *Colletotrichum dematium* สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมัลเมอรี่ได้ดี ในขณะที่การใช้สารปฏิปักษ์หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุ ไม่สามารถควบคุมโรคดังกล่าวได้

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่าสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 รูปแบบแกรนูลละลายน้ำที่ผลิตขึ้น สามารถควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ในผักสลัดที่ปลูกในสภาพโรงเรือนไฮโดรโพนิกส์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรรมวิธีการพ่นสูตรสำเร็จก่อนปลูกเชื้อรา 1 วัน เพื่อป้องกันเชื้อราที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติก่อนการเข้าทำลายของเชื้อรา และพ่นซ้ำหลังจากปลูกเชื้อราเป็นเวลา 3 และ 5 วัน เพื่อควบคุมและรักษาหลังจากเชื้อราเข้าทำลายผักแล้ว มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีใกล้เคียงกับการใช้สารฆ่าเชื้อรา mancozeb ดังนั้นสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 รูปแบบแกรนูลน่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพชนิดหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ทดแทนสารเคมีในการควบคุมโรคใบจุดในผักสลัดได้ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. สรุป

1.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

การเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคใบจุดจากฟาร์มที่มีการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ในจังหวัดต่าง ๆ พบการเกิดโรคใบจุดในผักสลัดทุกฟาร์ม เมื่อนำตัวอย่างผักสลัดที่แสดงอาการโรคใบจุดมาแยกเชื้อรา *Alternaria* spp. พบว่าสามารถแยกเชื้อราสาเหตุ *Alternaria* spp. ได้ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ และสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน มาจากพืชและพื้นที่แตกต่างกันได้จำนวน □สายพันธุ์

1.2 การพิสูจน์การเกิดโรค

การทดสอบพิสูจน์โรคของเชื้อรา *Alternaria* spp. บนผักสลัดชนิดบัตเตอร์เฮด กรีนโอ๊ค และเรดคอรัล พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ LRC 4-6 ซึ่งแยกได้จากผักสลัดเรดคอรัล จากพื้นที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สามารถทำให้เกิดโรคใบจุดรุนแรงมากที่สุด

1.3 การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Alternaria* sp.

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Alternaria* sp. สายพันธุ์ LRC 4-6 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นเชื้อรา *Alternaria longipes* (□llis & □verh) Mason

1.4 การแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดิน

เมื่อนำตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าสมบูรณ์ชนิดต่าง ๆ ของประเทศไทย จำนวน 125 ตัวอย่าง มาแยกแบคทีเรีย พบว่าสามารถแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้ทั้งหมด 356 สายพันธุ์ โดยแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินพื้นที่ป่าดิบชื้นได้มากที่สุด รองลงมาพื้นที่ป่าเบญจพรรณและป่าดิบแล้ง

1.5 การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp.

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 18 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดี โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD 3-1 ซึ่งแยกได้จากดินป่าเต็งรังในพื้นที่จังหวัดลำพูน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด ให้ค่าบริเวณยับยั้งเท่ากับ 10.0 มิลลิเมตร

การตรวจสอบปฏิกิริยาทางเคมีและการสร้างเอนโดสปอร์เบื้องต้น พบว่าแบคทีเรียทั้ง 18 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์ที่ผลิตจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าสารปฏิปักษ์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ LPDD 3-1 ทั้งที่ไม่ผ่านและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเจริญของเส้นใยและการงอกสปอร์ของเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ได้ดี โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 95.3 และ 9□.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ 86.3 และ 91.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์เชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 พบว่าสารปฏิปักษ์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมีผลทำให้ germ tube ที่งอกออกมาจากสปอร์เชื้อรา มีลักษณะสั้นกุดบวมกลมโป่งพอง และไม่สามารถเจริญต่อไปได้

1.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp.

การทดสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาและทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LPDD 3-1 ได้เป็น *Bacillus subtilis*

1.7 การเตรียมสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ

การเตรียมสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ สามารถผลิตสูตรสำเร็จแกรนูลได้ 5 สูตร เมื่อประเมินผลสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของสูตรสำเร็จแกรนูล พบว่าสูตรสำเร็จที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย sodium alginate 12.5 เปอร์เซ็นต์ PVP(K-30) 12.5 เปอร์เซ็นต์ lactose monohydrate □5 เปอร์เซ็นต์ และสปอร์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 จำนวน 4.4 x 10^{15} cfu มีคุณสมบัติที่เหมาะสม โดยใช้เวลาในการละลายน้ำประมาณ 30 นาที สารละลายที่ได้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง และให้ค่าความหนืดสูงที่สุด (18.90 cps) นอกจากนี้มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในสูตรสำเร็จหลังจากผลิตและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็น

เวลา 6 เดือน ในปริมาณสูงและค่อนข้างคงตัว (10^9 cfu ต่อกรัม) สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *A. longipes* LRC 4-6 ได้ดี และมีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดบนใบผักสลัดสูงสุด

1.8 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำต่อการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

กรรมวิธีพ่นด้วยสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ ก่อนปลูกเชื้อรา *A. longipes*. LRC 4-6 เป็นเวลา 1 วัน และพ่นซ้ำหลังจากปลูกเชื้อราเป็นเวลา 3 และ 5 วัน สามารถควบคุมโรคใบจุดในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ได้ดีใกล้เคียงกับกรรมวิธีใช้สารฆ่าเชื้อรา mancozeb โดยให้เปอร์เซ็นต์ใบที่เป็นโรคบนผักสลัดกรีนโอ๊ค เรดคอรัล และบัตเตอร์เฮด 20.0 19.4 และ 22. เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุอย่างเดียว พบว่าสามารถลดการเกิดโรคใบจุดบนผักสลัดได้ถึง 53.2 5 .9 และ 65.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่งผลให้เพิ่มน้ำหนักสดของผักได้สูงถึง 5 .1 43.4 และ 49. เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. ข้อเสนอแนะ

การนำสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 มาใช้ในการควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *A. longipes* ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งในการช่วยลดปัญหาการเกิดโรคดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาการใช้สูตรสำเร็จในการควบคุมโรคใบจุดในสภาพแปลงปลูกระบบไฮโดรโพนิกส์หลาย ๆ พื้นที่ เพื่อเป็นการยืนยันถึงประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จเมื่อใช้ในสภาพพื้นที่ที่มีสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน และศึกษาความคงตัวและปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จเมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาที่นานขึ้น เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต รวมทั้งการนำสูตรสำเร็จไปประยุกต์ใช้ควบคุมเชื้อก่อโรคในพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น เพื่อเป็นการส่งเสริมการควบคุมโรคโดยชีววิธี ทดแทนการใช้สารเคมี ซึ่งจะส่งผลให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และเป็นแนวทางในการรักษาสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืนในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2550. เอกสารประกอบการฝึกอบรมการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินรุ่นที่ 8. กรุงเทพมหานคร : คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังร่วมกับวารสารเคหการเกษตร.

คำขอรับสิทธิบัตร. 2550. กรรมวิธีเตรียมสูตรตำรับแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลสำหรับฉีดพ่นเพื่อควบคุมโรคพืช เลขที่ 0701001394 ลงวันที่ 23 มีนาคม 2550.

จักรพันธ์ ศิริธัญญาลักษณ์. 2538. ยาเม็ด : การผลิต วิจัย และพัฒนา. ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2547. การควบคุมโรคผักโดยชีววิธี. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีในการปลูกผักระบบไม่ใช้ดินและภายในโรงเรือน รุ่นที่ 1 จัดโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยร่วมกับคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2547 หน้า 1-32.

ชวนพิศ บุญชิตสิริกุล. 2549. ผลของอุณหภูมิต่อเชื้อราปฏิปักษ์และการควบคุมเชื้อ *Alternaria brassicicala* (Schweinitz) โดยชีววิธี. ว. เกษตร 22 : 223-233.

ชำนาญ เขียวอำไพ. 2550. การทำสวนผัก. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์เกษตรสยามบุ๊คจำกัด.

ดิเรก ทองอร่าม. 2547. ปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน หลักการจัดการผลิตและเทคโนโลยีการผลิตเชิงธุรกิจในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ธรรมรักษ์การพิมพ์.

ดิเรก ทองอร่าม. 2550. การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน หลักการจัดการผลิตและเทคโนโลยีการผลิตเชิงธุรกิจในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์พิมพ์ดีการพิมพ์.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ถวัลย์ พัฒนาเสถียรพงศ์. 2534. การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์พรานนกการพิมพ์.

ทัดทรง ทั่วทิพย์. 2534. ยาเม็ด. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์.

เทอดพันธ์ ธรรมรัตนพงษ์. 2548. ชีววิทยาและการก่อให้เกิดโรคของ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดกวางตุ้งและกระตุ้นเพื่อให้ต้านทานต่อโรคก่อนการเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นลินี จาริกภากร, พาณี หนูนิ่ม, บุญมี วารินสะอาด, พิรุณ จันทนกุล และมนูญ อเนกชัย. 2534. การป้องกันการกำจัดโรคข้าวโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*. ว. วิจัยข้าว. 1 : 42-53.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

นิพนธ์ ไชยมงคล. 2550. ผักสลัด/ผักกาดหอม. [Online]. Available: http://www. agric-pro.mju.ac.th/web-veg/plantlist/p4.htm. [2008 November 3].

นิพนธ์ ทวีชัย. 2539. งานวิจัยด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. แก่นเกษตร. 24 : 53-62.

นิวัติ เรืองพานิช. 2546. นิเวศวิทยาทรัพยากรธรรมชาติ.กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์.

ปราโมทย์ ทิพย์ดวงตา. 2539. ยาเม็ด. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2533. โรคพืชวิทยาขั้นสูง. โครงการผลิตสิ่งตีพิมพ์ทางเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2548. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการการใช้จุลินทรีย์ในการ ควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp. ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. กรุงเทพมหานคร: คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ภรณี สว่างศรี. 2546. การคัดเลือกและการผลิตมวลชีวภาพเชื้อรา *Trichoderma harzianum* Rifai เพื่อใช้ควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง (*Vigna subterranean* (L.) Verd.) ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* Kuhn. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มนูญ ศิรินุพงศ์. 2544. การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินสู่การปฏิบัติในประเทศไทย. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันจำกัด. กรุงเทพมหานคร : คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์.

ศุภลักษณ์ มณีแสง. 2551. การคัดเลือก *Bacillus* spp. สำหรับใช้ควบคุมโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อราของถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Fruw.) โดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สกุลศักดิ์ โฮฬารสกุล. 2540. โรคของพืชประเภทผักและการควบคุม. ภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรและอุตสาหกรรม สถาบันราชภัฏลำปาง.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2540. การจัดการโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ. 2543. ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการควบคุมโรคใบจุดออลเทอ-นาเรียของกะหล่ำปลี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุชล แก้วพรหม. 2539. การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุญาณี พงษ์ธนานิกร. 2549. พรีไบโอติกและโพรไบโอติก : อาหารสุขภาพ. [Online]. Available : www.pharm.chula.ac.th/clinic101_5/article/ra ib89p f. [2008 November 3].

สุนิดา เมืองโคตร และบวรศักดิ์ ลีนานนท์. 2551. การประยุกต์ใช้ *Bacillus* sp. เป็นโพรไบโอติกในโซเกิร์ต. วิทย.กษ. 39(พิเศษ) : 453-456.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2549. จุลชีววิทยาทางดิน. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์. 2551. โพรไบโอติก. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 23 : 56-59.

สุมาลี เหลืองสกุล, เสริมสิน ศิริวัฒนา, สมใจ ศิริโภค และขจีนาฏ โพธิเวชกุล. 2542. การคัดเลือกแบคทีเรียแอนทาโกนีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *Fusarium oxysporum*. ว. วิทย. (มศว). 15 : 59-80.

สุวีณา รัตนชัยวงศ์. 2538. การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช : ความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม. ใน เอกสารการประชุมสัมมนาเชิงปฏิบัติการการใช้เชื้อจุลินทรีย์

ในการควบคุมศัตรูพืช จัดโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและกรมวิชาการเกษตร ณ โรงแรมรามาการ์เด็นท์ วิภาวดีรังสิต 20-23 พฤศจิกายน 2538.

สมใจ เอี่ยมพรรัตน์. 2531. ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ที่แยกได้และผลของสารปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของบักเตรีที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมศักดิ์ สุขวงค์. 2552. ป่าเขตร้อน คุณค่าความหลากหลายของสรรพสิ่ง. [Online]. Available: http://www.seub.or.th/libraryindex/forest/forest_025.htm. [2009 July 15].

โสระยา ร่วมรังสี. 2543. การผลิตพืชแบบไม่ใช้ดิน. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

สำอาง วงศ์แก้ว. 2534. ชีววิทยาและการก่อให้เกิดโรคของ *Alternaria* spp. สาเหตุโรคใบไหม้และลำต้นไหม้ของทานตะวันในประเทศไทยและการประเมินความเสียหาย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2538. แร่ธาตุอาหารพืชสวน. ขอนแก่น : สำนักพิมพ์ศิริภัณฑ์ ออฟเซ็ท.

อนุรักษ์ พ่วงผล. 2542. พืชผักสวนครัวเสริมรายได้. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์อักษรไทย.

อมรรัตน์ ชุมทอง. 2547. การคัดเลือกและการพัฒนาสูตรตำรับของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง (*Vigna subterranean* (L.) Verdc.) ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* Kuhn. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อัจฉรา อุทิศวรรณกุล. 2536. รูปแบบเภสัชภัณฑ์. กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. 4th ed. New York : Academic Press.

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Amsterdam : Academic Press.

Alvindia, D.G. and Natsuaki, K.T. 2009. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA 14 isolate from banana fruit surface against banana crown rot causing pathogens. Crop Protect. 28 : 236-242.

Arunyanart, P., Nilpanit, N., Sirisantana, W. and Disthaporn, S. 2001. Effectiveness of bioproduct of *Bacillus subtilis* to control rice sheath blight disease. J. Thai Agricul.

Research 19 : 4-12.

Asaka, O. and Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 4081-4085.

Bertagnolli, B.L., Dal Soglio, F.K. and Sinchair, J.B. 1996. Extracellular enzyme profiles of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* isolate 2B-12 and of two antagonists, *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 and *Trichoderma harzianum* isolate Th008. I. Possible correlations with inhibition of growth and biocontrol. Physiol. Molec. Plant Pathol. 48 :145-160.

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

Bull, A.T., Goodfellow, M. and Slater, J.H. 1992. Biodiversity as a source of innovation of biotechnology. Ann. Rev. Microbiol. 46 : 219-252.

Burges, H.D. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides . Kluwer Academic Publisher.

Chaurasia, B., Pandeya, A., Palnib, L.M.S., Trivedia, P., Kumara, B. and Colvinc, N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. Microbiol. Res. 160 : 75-81.

Chen, T.W. and Wu, W.S. 1999. Biological control of carrot black rot. Phytopathol. 147 : 99-104.

Chiou, A.L. and Wu, W.S. 2003. Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for control of lily grey mold (*Botrytis elliptica*). Phytopathol. 151 : 13-18.

Collins, D.P. and Jacobsen, B. 2003. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. Biol. Control 26 : 153-161.

Duc, L., Hong, H., Barbosa, T., Cutting, S. and Henriques, A. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. Appl. Environ. Microbiol. 70 : 2161-2171.

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

Ellis, M.B. 1976. More Dematiaceous Hypomycetes. Aberystwyth : Cambrian News.

Gamaliel, A., Katan, J. and Cohen, E. 1989. Toxicity of chloronitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as related to their structure. Phytoparasitica. 17 : 101-105.

Gottieb, D. 1976. The production and role of antibiotics in soil. J. Antibiotic. 29 : 987-1000.

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. Aca. Biochem. Biophys. 38 : 233-240.

Hedges, L.J. and Lister, C.E. 2005. Nutritional attributes of salad vegetables. Crop and Food Research Confidential Report No. 1473. [Online]. Available: http://vegfed.designcom.co.nz/resoures/crop_food_report_salad.pdf. [2007 October 6].

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

Intanoo, W., Chamswarng, C. and Sutthisa, W. 2002. Biological control of Chinese kale leaf spot caused by *Alternaria brassicicola* with antagonistic microorganisms. In The proceeding of 40th Kasetsart University Annual Conference, 4-7 February 2002. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Kanjanamaneesathian, M., Wiwattanapatapee, R., Pengnoo, A., Oungbho, K. and Chumthong, A. 2007. Efficacy of novel formulations of *Bacillus megaterium* in suppressing sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. Plant Pathol. 6 : 195-201.

Kim, H.J., Lee, S.H., Kim, C.S., Lim, E.K., Choi, K.H., Kong, H.G., Kim, D.W., Lee, S.W. and Moon, B.J. 2007. Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. Microbio. Biotech. 17 : 438-444.

Kong, G.A., Kochman, J.K. and Brown, J.E. 1997. Phylloplane bacteria antagonistic to the sunflower pathogen *Alternaria helianthi*. Austral. Plant Pathol. 26 : 85-97.

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

Lisboa, M.P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J.A.P. and Brandelli, A. 2006. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloloquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. Int. Microbiol. 9 : 111- 118.

Lorenz, O.A. and Maynard, D.N. 1980. Knott's Handbook for Vegetable Growers. 2nd ed. New York : John Wiley and Son Press.

Lurie, S. 1998. Postharvest heat treatment. Posthav. Biol. Technol. 14 : 257-269.

Mac Faddin, J.F. 1976. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. Maryland : Waverly Press.

Mac Faddin, J.F. 1980. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. USA : Waverly Press.

Marten, P., Bruckner, S. and Luth, P. 1999. Plant growth promotion of different cultivated plant and biological control of soil borne phytopatogenic fungi by *Bacillus subtilis* strain B2G. J. Plant Dis. Protect. 106 : 74-81.

Menzies, J.G., Ehret, D.L. and Stan, S. 1996. Effect of inoculum density of *Pythium aphanidermatum* on the growth and yield of cucumber plants grown in recirculating nutrient film culture. Can. J. Plant Pathol. 18 : 50-54.

Mukherjee, P.K., Saha, B.P., Pal, M. and Das, J. 1996. Antifungal activities of the leaf extract of *Cassia tora* Linn. (Fam. Leguminosae). Phytother. Res. 10 : 521-522.

Muslim, A., Horinouchi, H. and Hyakumachi, M. 2003. Control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with hypovirulent binucleate *Rhizoctonia* in soil and rock wool systems. Plant Dis. 87 : 739-747.

Obagwu, J. and Korsten, L. 2003. Intergrated 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, R.N. and Osuine, M.I. 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.

Pengnoo, A., Wiwattanapatapee, R., Chumthong A. and Kanjanamaneesathian, M. 2006. Bacterial antagonist as seed treatment to control leaf blight disease of bambara groundnut (*Vigna subterranean*). World J. Microbiol. Biotechnol. 22 : 9-14.

Perello, A., Simon, M.R. and Arambarri, A.M. 2002. Interactions between foliar pathogens and the saprophytic microflora of the wheat (*Triticum aestivum* L.) phylloplane. J. Phytopathol. 150 : 232-243.

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

Romeiro, R.S., Filho, L., Vieira Junior, J.R., Silva, H.S.A., Baracat-Pereira, M.C. and Carvalho, M.G. 2005. Macromolecules released by plant growth promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. Phytopathol. 153 : 120-123.

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

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

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

Shogi, J. 1978. Recent chemical studies on peptide antibiotics from the genus *Bacillus*. Adv. Appl. Microbiol. 24 : 187-214.

Si, A., Ezziyyani, M., Egea-Gilabert, C. an Can ela, M.E. 2003. Selecting bacterial strains for use in the biocontrol of iseases cause by *Phytophthora capsici* an *Alternaria alternata* in sweet pepper plants. Biologia Plantarum. 47 : 569-574.

Si iqui, Z.A. 2007. Biocontrol of *Alternaria triticina* by plant growth promoting rhizobacteria on wheat. Arch. Phytopathol. Plant Protect. 40 : 301-308.

Simmon, E.G. 1997. Alternaria thems an variations. Mycotaxon. 65 :1-91.

Spa aro, D. an Gullino, M.L. 2004. State of art an prospects of the biological control of postharvest fruit iseases. Foo Microbiol. 91 : 185-194.

Szczech, M. an Sho a, M. 2004. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* amping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combine with *Burkholderia cepacia*. Phytopathol. 152 : 549-556.

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

Thomma, B.P.H.J. 2003. *Alternaria* spp. : from general saprophyte to specific parasite. Molec. Plant Pathol. 4 : 225-236.

Vaseeharan, B. an Ramasamy, P. 2003. Control pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtillis* BT23, apossible probiotic treatment for black tiger shrim *P. momodon*. Appl. Microbiol. 36 : 83-87.

Von Der Wei , I., Alviano, D.S., Santo, A.LS., Soares, R.M.A., Alviano, C.S. an Sel in, L. 2003. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broa spectrum of phytopathogenic bacteria an fungi. Appl. Microbiol. 95 : 1143-1151.

Walker, W.A. an Duffy, L.C. 1998. Diet an bacterial colonization : Role of probiotics an prebiotics. Nutr. Biochem. 9 : 668-675.

Westers, L., Westers, H. an Quax, W.J. 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical protein : a biotechnological approach to optimize the host organism. Biochem. Biophys. Acta. 1694 : 299-310.

Wiwattanapatapee, R., Pengnoo, A., Kanjanamaneesathian, M., Nilratana, L. and Jantharangsri, A. 2004. Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice:formulations, viability and bacterial release studies. J. Control. Rel. 95 : 453-460.

Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A., Pengnoo, A. and Kanjanamaneesathian, M. 2007. Effervescent fast-disintegrating bacterial formulation for biological control of rice sheath blight. J. Control. Rel. 119 : 229-235.

Wu, W.S., Wu, H.C. and Li, Y.L. 2007. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for control of *Alternaria cosmosa* and *Alternaria patula* of *Cosmos sulfurous* (Yellow cosmos) and *Tagetes patula* (French Marigold). Phytopathol. 155 : 670-675.

Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T. Hatakeaks, K. and Shirata, A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry. Phytopathol. 91 : 181-187.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและสารเคมี

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

1.2 Potato dextrose broth (PDB)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

1.3 Potato dextrose double strength (PDA double strength)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	30	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

1.4 Potato carrot agar (PCA)

Potato	20	กรัม
Carrot	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

1.5 Nutrient agar (NA)

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม

Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

1.6 Nutrient broth (NB)

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

2. สูตรอาหารสำหรับทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

2.1 Motility medium

Beef extract	3	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Agar	4	กรัม
Peptone	10	กรัม
Gelatin	80	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

2.2 Hugh and Leifson' s OF medium

Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	0.30	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5.00	กรัม
Peptone	2.00	กรัม
Agar	3.00	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

นำสารประกอบต่างๆ มาละลายน้ำ แล้วปรับค่าพีเอชให้ได้ประมาณ 7.1 จากนั้นเติม bromthymol blue ลงไป เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วนำไปต้มให้วุ้นละลาย บรรจุใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที และเติมสารละลายกลูโคส (เตรียมโดยละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร) ปริมาตรหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

2.3 Nutrient gelatin

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

2.4 Simmons citrate medium

Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	0.20	กรัม
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	1.00	กรัม
Ammonium dihydrogen phosphate ($NH_4H_2PO_4$)	1.00	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5.00	กรัม
Sodium citrate	2.00	กรัม
Agar	15.00	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้ได้ 6.8-6.9

2.5 Voges-Proskauer medium

Polypeptone หรือ buffered peptone	7	กรัม
Dextrose หรือ glucose	5	กรัม
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้ได้ 6.8

2.6 Christensen's urea agar

Peptone	1	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
Monopotassium phosphate (KH_2PO_4)	2	กรัม
Glucose	1	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

นำสารประกอบต่าง ๆ มาละลายน้ำ ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.8-6.9 แล้วเติมฟีนอลเรด (phenol red) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที วางอาหารให้อุณหภูมิประมาณ 52 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลายยูเรีย ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปิเปตอาหารดังกล่าวใส่หลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางทำเป็น slant

2.7 Starch agar

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

2.8 0.1% peptone broth

Peptone	1	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

2.9 Potassium nitrate medium

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Potassium nitrate (KNO_3)	1	กรัม
Agar	12	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

2.10 7% NaCl medium

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	70	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

3. สารเคมีสำหรับทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

3.1 Lugol's iodine

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

3.2 10% α-napthol

Alpha napthol	10	กรัม
Ethanol 95%	100	มิลลิลิตร

3.3 Malachite green solution

Malachite green	5	กรัม
Distilled water	95	มิลลิลิตร

3.4 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 B เข้าด้วยกัน แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายที่ได้บรรจุใส่ขวดสีชา

3.5 Counterstain

Stock solution

Safranin	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	100	มิลลิลิตร

Working solution

Stock solution	10	มิลลิลิตร
Distilled water	90	มิลลิลิตร

3.6 Kovac

ρ- Dimethylaminabenzaldehyde	10	กรัม
Hydrogen chloride (HCl)	50	มิลลิลิตร
Alcohol	150	มิลลิลิตร

4. สารละลายธาตุอาหารพืชสำหรับปลูกผักสลัดสูตรของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (KMITL's) (ต่อน้ำ 20 ลิตร)

Solution A

$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	3.767	กรัม
Fe-EDTA	0.123	กรัม

Solution B

KNO_3	1.796	กรัม
KH_2PO_4	0.653	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.037	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	4.756	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	1.016	กรัม
$MnSO_4.H_2O$	14.194	กรัม
H_3BO_3	8.894	กรัม
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.343	กรัม

ค่าพีเอช 5.8-6.0

ค่าการนำไฟฟ้า 1.9-2.0 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร

ภาคผนวก ข

การทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

การทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมีอาศัยหนังสือคู่มือของนันทนา, 2537; Mac Faddin (1976,1980) และ Schaad และคณะ (2001) โดยทดสอบดังนี้

1. การย้อมแกรม (gram stain)

นำ *Bacillus* sp. ปริมาณ 1 ลูป มาละลายในน้ำที่หยดไว้บนสไลด์ เกลี่ยให้เป็นแผ่นบาง นำไปผ่านความร้อนบนเปลวไฟเร็ว ๆ 2-3 ครั้ง หยดสารละลายคริสตัลไวโอเลท (crystal violet) วางทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น ซับด้วยกระดาษทิชชู หยดสารละลายไอโอดีน (iodine) ให้ท่วมบริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง และหยดแอลกอฮอล์ 95% ลงไปอย่างรวดเร็ว (ประมาณ 15-25 วินาที) เอียงสไลด์แล้วล้างแอลกอฮอล์ออกด้วยน้ำ เพื่อหยุดปฏิกิริยาชะล้างสี จากนั้นย้อมทับด้วยสารละลายซาฟลานิน (safranin) ทิ้งไว้ 10 วินาที ล้างด้วยน้ำแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง หาก *Bacillus* sp. ย้อมติดสีน้ำเงินแสดงว่าเป็นแกรมบวก

2. การย้อมแคปซูล (capsule stain)

หยดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85% NaCl) ลงบนสไลด์ และนำ *Bacillus* sp. ปริมาณ 1 ลูป มาเกลี่ยเป็นแผ่นบาง หยดสีนิโกรซิน (nigrosin) เกลี่ยให้แห้ง ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ การอ่านผล ถ้าพื้นหลังเป็นสีดำ ตัวแบคทีเรียสีใส อ่านผลเป็นลบ (ไม่มี capsule) ถ้าเห็นเป็นวงใสรอบเซลล์ อ่านผลเป็นบวก (มี capsule)

3. การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility test)

นำ *Bacillus* sp. อายุ 24 ชั่วโมง stab ตรง ๆ เพียงครั้งเดียว ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร motility medium (ประมาณ 2/3 ของส่วนสูงของอาหาร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง การอ่านผล ถ้าเห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอย stab หรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณรอย stab แต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหลอดขุ่นกว่าเดิม แสดงว่าเชื้อมีความสามารถในการเคลื่อนที่ อ่านผลเป็นบวก

4. การเจริญแบบต้องการและไม่ต้องการออกซิเจน (oxidation-fermentation test)

นำ *Bacillus* sp. อายุ 24 ชั่วโมง stab ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Hugh and Leifson's OF medium จำนวน 2 หลอด หลอดหนึ่งปิดทับอาหารด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้หนาประมาณ 2 เซนติเมตร เพื่อทำให้อยู่ในสภาพที่ขาดอากาศ อีกหลอดไม่ต้องเติมพาราฟินเหลว บ่มที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง การอ่านผล ดูการเกิดกรดในหลอดอาหาร (สังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง) ถ้าเกิดกรดในหลอดทั้งที่ปิดทับและไม่ปิดทับด้วยพาราฟิน แสดงว่าเกิดการ fermentation แต่ถ้าเกิดเฉพาะในหลอดที่ไม่ได้ปิดทับด้วยพาราฟิน แสดงว่าเกิดการ oxidation

5. การสร้างสารอินโดล (idole test)

นำ *Bacillus* sp. อายุ 24 ชั่วโมง ลงเลี้ยงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร 0.1% peptone broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และหยดโคแวค (kovac) ลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้เพื่อตรวจผล การอ่านผล ถ้าเกิดชั้นสีแดงลอยอยู่แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างสารอินโดลได้ อ่านผลเป็นบวก

6. การย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction)

เขี่ย *Bacillus* sp. ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณ 1 ลูป ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร nutrient gelatin นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำหลอดอาหารดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง การอ่านผล ถ้าอาหารในหลอดทดลองไม่แข็งหลังจากวางไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยเจลาตินได้ อ่านผลเป็นบวก

7. การใช้ซิเทรตเป็นแหล่งคาร์บอน (citrate test)

นำ *Bacillus* sp. อายุ 24 ชั่วโมง ลงเลี้ยงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Simmons citrate medium บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง การอ่านผล ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อนั้นสามารถใช้ซิเทรตเป็นแหล่งคาร์บอน อ่านผลเป็นบวก

8. การสร้าง acetoin (Voges-Proskauer test)

นำ *Bacillus* sp. อายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณ 1 ลูป ลงเลี้ยงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Voges-Proskauer medium บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลาย 10% α-napthol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเติมสารละลาย

โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KHO) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 10-15 นาที การอ่านผล ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้น อ่านผลเป็นบวก

9. การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease test)

นำ *Bacillus* sp. อายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณ 1 ลูป ลงเลี้ยงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Christensen's urea agar slant บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผล ถ้าบริเวณผิวอาหารเปลี่ยนเป็นสีแดงม่วง แสดงว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้ อ่านผลเป็นบวก

10. การสร้างกรดและแก๊สจากคาร์โบไฮเดรต (acid and gas production carbohydrates test)

นำ *Bacillus* sp. อายุ 24 ชั่วโมง stab ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร Hugh and Leifson OF medium ที่ประกอบด้วยน้ำตาลแต่ละชนิดได้แก่ กลูโคส (glucose) แมนนิทอล (manitol) อะราบิโนส (arabinose) และไซโลส (xylose) อย่างละ 2 หลอด หลอดหนึ่งปิดทับด้วยพาราฟินเหลวให้หนาประมาณ 2 เซนติเมตร ส่วนอีกหลอดไม่ต้องปิดทับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน การอ่านผล การเกิดแก๊สสังเกตจากโพรงแก๊สในหลอดอาหาร การเกิดกรดสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

11. การเจริญใน 7% NaCl (growth in 7% NaCl)

นำ *Bacillus* sp. อายุ 24 ชั่วโมง ลงเลี้ยงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร 7% NaCl medium slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผล หากเชื้อเจริญในอาหารดังกล่าวได้ แสดงว่าสามารถทนต่อเกลือที่ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ได้

12. การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis test)

นำ *Bacillus* sp. อายุ 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร starch agar บ่มเชื้อไว้ที่ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นหยดลูกอล ไอโอดีน (lugol's iodine) ลงบนอาหารที่มีโคโลนีของเชื้อ การอ่านผล ถ้ารอบ ๆ โคโลนีของเชื้อไม่มีสี แต่บริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ มีสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อสามารถย่อยแป้งได้ อ่านผลเป็นบวก หากบริเวณรอบ ๆ โคโลนีมีสีน้ำเงินเหมือนกับบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถย่อยแป้งได้ อ่านผลเป็นลบ

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 ในสูตรสำเร็จแกรนูล หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน

สูตรสำเร็จ	ปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* LPDD 3-1 ($X10^9$ cfu/กรัม)						
	เริ่มต้น	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่ 5	เดือนที่ 6
1	7.7 ± 0.5	5.8 ± 0.3	5.3 ± 0.8	6.2 ± 0.7	4.7 ± 0.6	4.8 ± 0.5	4.5 ± 0.5
2	5.3 ± 0.8	4.9 ± 0.7	5.4 ± 0.8	4.8 ± 1.1	3.5 ± 0.6	4.5 ± 0.3	4.2 ± 0.5
3	5.1 ± 0.6	4.7 ± 0.8	5.3 ± 0.4	5.5 ± 0.6	3.6 ± 0.7	3.7 ± 0.4	3.7 ± 0.3
4	4.7 ± 0.5	4.5 ± 0.5	4.3 ± 0.9	4.6 ± 0.7	4.7 ± 0.9	4.3 ± 0.9	3.9 ± 0.6
5	4.9 ± 0.4	4.8 ± 0.7	4.6 ± 0.6	4.6 ± 0.7	3.5 ± 0.6	3.7 ± 0.7	3.6 ± 0.4

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาววานิด รอดเนียม
รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010620052
วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2543

ทุนการศึกษา

1. ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ
2. ทุนบัณฑิตศึกษาสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

1. วานิด รอดเนียม วิจิตร์ ตันมาละ บุญมา ดีแสง ปฐมพงศ์ วงษ์เลี้ยง มานะ กาญจนมณีเสถียร และอัจฉรา เพ็งหนู. 2552. ผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อเชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดหอมที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์. ว. โรคพืช. 23 : 31-40.