การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus megaterium* และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลบีด เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของพริก

Assessment the Efficiency of Antagonist Bacteria, *Bacillus megaterium* and Development of Gel Beads for Control Fusarium Wilt of Chili

จารุณี หนูมาก

Charunee Hnoomak

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Soil Resources Management
Prince of Songkla University
2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus megaterium* และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลบีด เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของพริก

ผู้เขียน นางสาวจารุณี หนูมาก

สาขาวิชา การจัดการทรัพยากรดิน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	**คณะกรรมการสอบ**
.....	.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู)	(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยรัตน์ นิลนนท์)
	.....กรรมการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(รองศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร)
.....	.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ฤดีกร วิวัฒนปฐพี)	(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เพ็งหนู)
	.....กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.ฤดีกร วิวัฒนปฐพี)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus megaterium* และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลบีด เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของพริก

ผู้เขียน นางสาวจารุณี หนูมาก

สาขาวิชา การจัดการทรัพยากรดิน

ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

B. megaterium เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ดี แต่รูปแบบที่นำไปใช้ยังไม่เหมาะสำหรับการควบคุมเชื้อราดังกล่าว ซึ่งเป็นเชื้อราในดินที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของพริก การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา *B. megaterium* เป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบเจลบีดที่มีลักษณะเหมาะสำหรับการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเริ่มจากการคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคจากตัวอย่างดินและพืชที่แสดงอาการของโรคในแปลงปลูกผักของพื้นที่จังหวัดสงขลา ได้ทั้งหมด 40 สายพันธุ์ และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโดยเชื้อ *B. megaterium* ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA พบว่า *B. megaterium* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ 21 สายพันธุ์ โดยมี 5 สายพันธุ์ คือ เชื้อราสายพันธุ์ PPT1(3) SKT1(1) PPT2(3) BFT1(2) และ PPT2(2) ที่มีรัศมีวงใสมากกว่า 3.2 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบประสิทธิภาพสารปฏิปักษ์ โดยใช้ความเข้มข้นของสารปฏิปักษ์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราส่วน 1:1 1:5 และ 1:10 เปรียบเทียบระหว่างไม่ผ่านและผ่านความร้อน (60 80 100 และ 121 องศาเซลเซียส) ผลการทดลองพบว่าทุกอัตราส่วนความเข้มข้นทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อนสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT2(3) และ PPT1(3) ได้ดีที่สุด ซึ่งเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ เป็นเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของพริก โดยสายพันธุ์ PPT2(3) สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *F. oxysporum*

การเตรียมแคลเซียมอัลจิเนตเจลบีดที่มีเอนโดสปอร์ของ *B. megaterium* สามารถเตรียมได้โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต แคลเซียมคลอไรด์ และเส้นผ่านศูนย์กลางรูเข็มที่ต่างกัน และทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ ได้แก่ การพองตัว การอยู่รอด การปลดปล่อยแบคทีเรีย และการสลายตัวของเจลบีด พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 (เส้นผ่านศูนย์กลางรูเข็ม 2 มิลลิเมตร ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.03 โมล ความเข้มข้น

ของโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์) มีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่สุด โดยมีลักษณะกลมสม่ำเสมอ พองตัวได้ดี สามารถสลายตัวได้ดีทั้งในน้ำและในดิน และเชื้อในผลิตภัณฑ์เจลบีดสามารถทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความเข้มแสง 20 วัตต์ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4-8 ได้ดีกว่าเซลล์สด นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2(3) ในดินได้ดี โดยเมื่อเวลาผ่านไป 28 วัน มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 88.21 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บไว้ได้นานถึง 7 เดือน โดยมีปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดเท่ากับ $9.07\pm3.6\times10^{12}$ cfu ต่อกรัม

เมื่อนำผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่ปลูกในเรือนทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี 7 กรรมวิธี จำนวน 6 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่าการใช้ผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2(3)

Thesis Title	Assessment the Efficiency of Antagonist Bacteria, *Bacillus megaterium* and Development of Gel Beads for Control Fusarium Wilt of Chili
Author	Miss Charunee Hnoomak
Major Program	Soil Resources Management
Academic Year	2010

ABSTRACT

B. megaterium is antagonist bacteria that have ability to inhibit *F. oxysporum*. However, the forms in which the bacterium can be applied for control of wilt diseases of chili caused by *F. oxysporum*, are not suitable. Therefore, the objective of this study was to develop a suitable gel bead formulation, containing *B. megaterium*, to control wilt diseases of chili. Forty isolates of soil-borne fungal pathogens were isolated from both soil taken from fields where vegetables had been grown and plant parts with diseased symptom in Songkhla province. These fungi were tested against *B. megaterium*, using dual culture method on PDA. *B. megaterium* inhibited the mycelial growth of 21 isolates of pathogenic fungi. This bacterium, however, was effective in inhibiting the mycelial growth of 5 isolates of the tested fungi (PPT1(3), SKT1(1), PPT2(3), BFT1(2) and PPT2(2)), with the clear zone greater than 3.2 mm. Both non-heated and heated (at 60, 80, 100 and 121 °C) culture filtrates of *B. megaterium* were also effective in inhibiting the mycelial growth of these fungi at the concentration at 1:1, 1:5 and 1:10 (ratio of culture filtrate: PDA medium, v/v), with the inhibition greatest in isolates PPT2(3) and PPT1(3). These fungi had caused wilt disease on chili and the fungi isolate PPT2(3) was subsequently identified as *F. oxysporum*.

Calcium alginate gel beads, containing endospores of *B. megaterium*, were prepared using different concentration of sodium alginate, calcium chloride and different needle diameters. The gel beads were evaluated for their physical and biological properties such as swelling, bacterial release and biodegradation. Gel bead

formulation number 7 (produced with the needle diameter at 2 mm 0.03 M calcium chloride and 3% sodium alginate) was selected as a suitable formulation as this composition produced the suitable physical characteristic of the product with spherical and uniform gel beads. The formulation number 7 also possessed high swelling ability and fast biodegradation in both water and soil. The bacteria in this gel bead were better than the fresh cells in resistant to the physical treatments, such as 20-watt ultraviolet light, at the temperature of 50 $^{\circ}$C and pH of 4-8. They also had high potential to inhibit fungi *F. oxysporum* PPT2(3) in soil up to 28 days (the inhibition reached 88.21 percent). The gel beads were stored for 7 months, with the population of the bacteria at 9.07 ± 3.6 × 10^{12} cfu/g.

In the greenhouse experiment (in randomized complete design (CRD), with 7 treatments and 6 replications), the formulation number 7 was effective to control the wilt disease of chili caused by *F. oxysporum* PPT2(3).

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการตารางภาคผนวก	(10)
รายการภาพ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำ	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	19
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	20
วัสดุ	20
อุปกรณ์	20
วิธีการทดลอง	21
3. ผลการทดลอง	31
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	56
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	65
เอกสารอ้างอิง	68
ภาคผนวก	79
ประวัติผู้เขียน	90

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	การทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีและด้านกายภาพของเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16	13
2.	การใช้เชื้อ *B. megaterium* ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่เกิดจากเชื้อราในดิน	14
3.	ผลิตภัณฑ์อัลจิเนตเจลบีดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปแบบต่างๆ	19
4.	เชื้อราในดินที่แยกได้จากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคในแปลงเกษตรกร	31
5.	ประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในดิน	34
6.	ประสิทธิภาพสารปฏิปักษ์ของเชื้อ *B. megaterium* ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในดิน	36
7.	ความเข้มข้นของสารและขนาดเข็มที่ใช้เตรียมเจลบีด	38
8.	ผลของแสงอัลตราไวโอเลตต่อการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่เวลาต่างๆ	50
9.	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* PPT 1(3) และ *F. oxysporum* PPT2(3) บน PDA ที่ผสมสารละลายดินที่ได้จากการปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ของผลิตภัณฑ์เจลบีด	51
10.	ผลของผลิตภัณฑ์เจลบีดต่อน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเหี่ยวของพริกในสภาพเรือนทดลอง	55

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
1.	สมบัติทางเคมีและกายภาพของดินผสมที่ใช้ทดลองในสภาพเรือนทดลอง	81
2.	สมบัติทางเคมีและกายภาพของดินที่เก็บจากแปลงภาควิชาการจัดการศัตรูพืช	81
3.	การพองตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดที่เวลาต่างๆ จากการกำหนด สูตรดังนี้ กำหนดขนาดเข็ม (ก) กำหนดความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (ข) และ กำหนดความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนต (ค)	82
4.	การปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่เวลาต่างๆ จากการกำหนดสูตรดังนี้ กำหนดขนาดเข็ม(ก) กำหนดแคลเซียมคลอไรด์ (ข) และ กำหนดอัลจิเนต (ค)	83
5.	การสลายตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดในน้ำที่เวลาต่างๆ	84
6.	การปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ในดินที่เวลาต่างๆ	84
7.	การสลายตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดในดินที่เวลาต่างๆ	85
8.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4	85
9.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5	86
10.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6	86
11.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7	86
12.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8	87
13.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเมื่อกระจายตัวในน้ำ	87
14.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเมื่อกระจายตัวในน้ำ	87
15.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเมื่อกระจายตัวในน้ำ	88
16.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในรูปเจลบีดแห้ง	88

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
17.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในรูปเจลบีดแห้ง	88
18.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในรูปเจลบีดแห้ง	89
19.	ปริมาณเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีด หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 เดือน	89

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	วงจรชีวิตของเชื้อรา *Fusarium* spp.	9
2.	สปอร์ (ก) และโคโลนี (ข) ของเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16	12
3.	โครงสร้างการเกิดเจลลักษณะ egg box	17
4.	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT1(3) โดยเชื้อ *B. megaterium* (ก) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ข)	32
5.	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ SKT1(1) โดยเชื้อ *B. megaterium* (ก) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ข)	32
6.	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT2(3) โดยเชื้อ*B. megaterium* (ก) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ข)	33
7.	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ BFT1(2) โดยเชื้อ *B. megaterium* (ก) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ข)	33
8.	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT2(2) โดยเชื้อ *B. megaterium* (ก) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ข)	33
9.	ลักษณะทางจุลสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT1 (3) ชุดทดสอบ (ก) และ เส้นใยเชื้อราชุดควบคุม (ข) เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 400 เท่า	33
10.	ประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์ *B. megaterium* ที่ความเข้มข้นต่างๆ (สารปฏิปักษ์: PDA double strength) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT2(3)	35
11.	ลักษณะ chlamydospore (ก) microconidia (ข) และ macroconidia (ค) ของเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2(3) (ก่อนการพิสูจน์โรค) เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 400 เท่า	37
12.	ลักษณะ chlamydospore (ก) microconidia (ข) และ macroconidia (ค) ของเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2(3) (หลังการพิสูจน์โรค) เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 400 เท่า	38
13.	การพองตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดที่เวลาต่างๆ จากการกำหนดขนาดเข็ม (ก), ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (ข) และความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนต (ค)	39
14.	ลักษณะของผลิตภัณฑ์เจลบีดก่อน (ก) และหลัง (ข)พองตัวในน้ำ	40

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15.	การปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่เวลาต่างๆ จากการกำหนดขนาดเข็ม (ก) ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (ข) และความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนต (ค)	42
16.	การสลายตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดในน้ำที่เวลาต่างๆ	43
17.	การปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ในดินที่เวลาต่างๆ	44
18.	การสลายตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดในดินที่เวลาต่างๆ	44
19.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4	45
20.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5	45
21.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6	46
22.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7	46
23.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8	46
24.	การอยู่รอดของเชื้อ B. megaterium ที่อุณหภูมิต่างๆ (25 องศาเซลเซียส (ก) 37 องศาเซลเซียส (ข) 50 องศาเซลเซียส (ค)) เมื่อกระจายตัวในน้ำ	48
25.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิต่างๆ (25 องศาเซลเซียส (ก) 37 องศาเซลเซียส (ข) 50 องศาเซลเซียส (ค)) ที่อยู่ในรูปบีดแห้ง	49
26.	การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง	52
27.	ลักษณะภาพตัดขวางของผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 จากกล้องจุลทรรศน์แบบ SEM (5 µm) กำลังขยาย 5,000 เท่า (ก) และ ลักษณะพื้นผิวของผลิตภัณฑ์เจบีดสูตรที่ 7 จากกล้องจุลทรรศน์ แบบ SEM (10 µm) กำลังขยาย 2,500 เท่า(ข)	53
28.	ลักษณะอาการโรคเหี่ยวตายทั้งต้น (ก) และ เหี่ยวเหลือง (ข) ของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) ต้นปกติของพริก (ค)	54

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำ

พริกเป็นพืชที่ปลูกมากในประเทศไทย เนื่องจากเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหาร และนอกจากนี้ได้มีการนำไปใช้ใช้ประโยชน์ในหลายๆด้าน เช่น ด้านอุตสาหกรรมอาหารที่ใช้พริกในการปรุงแต่งสีและรส ด้านการแพทย์มีการนำสารแคปไซซิน (capsicin) ที่สกัดได้จากพริกมาใช้ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สำหรับประเทศไทยจากรายงานของสำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์ (2551) พบว่าปริมาณการส่งออกพริกในปี พ.ศ. 2550 มีปริมาณ 30,973 ตัน คิดเป็นมูลค่าถึง 1,419 ล้านบาท จึงนับได้ว่าพริกเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญยิ่งของไทย แม้ว่าในประเทศไทยมีการปลูกพริกกันอย่างแพร่หลาย และปลูกในปริมาณมากก็ตาม เกษตรกรก็ยังประสบปัญหาในการผลิตพริก ทำให้ผลผลิตพริกลดลงและไม่มีคุณภาพ ซึ่งปัญหาที่สำคัญเกิดจากการระบาดของโรค โดยเฉพาะโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. โรคเหี่ยวของพริกระบาดทั่วในพื้นที่ภาคใต้ เนื่องจากสภาพดินเป็นดินกรดจัด หรือเป็นดินเหนียว ทำให้เชื้อรา *Fusarium* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคสามารถเจริญได้ดีในดินดังกล่าว (ปัญญา, 2553) จึงส่งผลให้เกษตรกรนำสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมาใช้เป็นจำนวนมากในแต่ละปี ซึ่งจากรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรในปี พ.ศ. 2552 มีการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืช 118,152 ตัน คิดเป็นมูลค่า 16,816 ล้านบาท เมื่อเทียบกับปี พ.ศ.2545 มีการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพียง 39,634 ตัน คิดเป็นมูลค่า 9,116 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช ทำให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม เนื่องจากในการใช้สารเคมีแต่ละครั้งจะใช้ประโยชน์ได้เพียง 25 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลืออีก 75 เปอร์เซ็นต์ จะกระจายสะสมในดิน น้ำ อากาศ และผลผลิต (อานัฐ, 2550) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและเกษตรกรผู้ใช้สารเคมี จากข้อจำกัดข้างต้น จึงมีการนำวิธีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีมาใช้อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและควรได้รับการส่งเสริมอย่างยิ่งเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมเชื้อราในดินที่ก่อให้เกิดโรคพืชหลายชนิด เช่น *B. firmus* ควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* (Pengnoo *et al.,* 2006) *B. subtilis* ควบคุมโรคเน่าคอดินของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* (Ugoji and

Laing, 2008) ควบคุมโรคเน่าคอดินของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* (Ongena *et al.,* 2004) และควบคุมโรคเหี่ยวของถั่วแขกที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. Lentis (El-Hassan and Gowen, 2006) นอกจากนี้มีรายงานการนำ *B. megaterium* ไปใช้ในการควบคุมและยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด Bertagnolli และคณะ (1996) รายงานว่า *B. megaterium* B153-2-2 สามารถผลิตเอนไซม์ 2 ชนิด คือ endoproteinase และ phospholipase ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรครากเน่าของถั่วเหลือง และ *B. megaterium* c 96 สามารถสร้างสารปฏิปักษ์เพื่อยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรครากเน่าของมะเขือเทศ (Omar *et al.,* 2006) นอกจากนี้ *B. megaterium* มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคโคนเน่าของมะเขือเทศได้ดีเทียบเท่ากับเชื้อ *B. polymyxa* *B. subtilis* และเชื้อรา *Trichoderma* *Streptomyces* (อรอุษา และคณะ, 2549) และนอกจากนี้ยังมีเชื้อ *B. megaterium* อีกหนึ่งสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี คือ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 ซึ่งแยกได้จากดินในนาข้าวที่จังหวัดสตูล (Kanjanamaneesathian *et al*., 1998) ซึ่งเชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ใช้เวลาเจริญเติบโตประมาณ 24-48 ชั่วโมง และยังทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างได้ดี และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี พบว่าเป็นแบคทีเรียกรัมบวก มีเซลล์แบบแท่ง สร้างเอนโดสปอร์ สร้างเอนไซม์ amylase urease และ gelatinase เพื่อย่อยแป้ง ยูเรีย และเจลาตินได้ และยังสามารถทนอยู่ได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 8 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนี้ พบว่าสารปฏิปักษ์ของ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 นึ่งฆ่าเชื้อ (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งในข้าวได้สูงถึง 84 เปอร์เซ็นต์ (Kanjanamaneesathian *et al*., 1998; Pengnoo *et al*., 2000)

การใช้ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 ในรูปแบบเซลล์สด มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ แต่การนำไปใช้จริงในแปลงเกษตรกรมักประสบปัญหา คือ จำนวนแบคทีเรียลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งเกิดจากทั้งปัจจัยทางชีวภาพและปัจจัยทางกายภาพ ปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ การแก่งแย่งอาหาร การเกิดปฏิปักษ์กับจุลินทรีย์อื่น และการถูกล่าจากโปรโตซัว เป็นต้น ส่วนปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ปริมาณความชื้น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างของดิน รังสีอุลตราไวโอเลต (UV) มลพิษ ปริมาณออกซิเจน และอาหารที่ไม่เหมาะสมเป็นต้น วิธีการหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาการอยู่รอดของ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 คือ การห่อหุ้ม (encapsulation) ด้วยพอลิเมอร์ในรูปผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบ

แกรนูลลอยน้ำ เพลเลตลอยน้ำ และแบบแกรนูลฟู่ พบว่า ผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 รูปแบบนี้สามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ได้ดี (Wiwattanapatapee *et al*., 2004; Kanjanamaneesathian *et al*., 2007; Wiwattanapatapee *et al*., 2007) แต่ไม่เหมาะกับการนำมาใช้ในดิน เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้หว่านในน้ำซึ่งเหมาะกับการใช้ในนาข้าว

เจลบีดเป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบหนึ่งที่แบคทีเรียถูกห่อหุ้มด้วยพอลิเมอร์ สามารถปกป้องแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อม มลพิษ และปัจจัยอื่นๆ ที่กล่าวมา การเตรียมเจลบีดสามารถเตรียมได้ง่ายและต้นทุนการผลิตต่ำ โดยเลือกใช้พอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวได้ในธรรมชาติและมีความปลอดภัยที่ใช้ทางเภสัชกรรม นอกจากนี้การเลือกใช้อัตราส่วนของพอลิเมอร์ ตลอดจนสภาวะการเตรียมที่เหมาะสมจะทำให้ได้เจลบีดที่มีคุณสมบัติปลดปล่อยเชื้อแบคทีเรียออกมาในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งสามารถลดความถี่ในการใส่เจลบีดในดินได้อีกด้วย ฉะนั้นการใช้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเจลบีดที่ปลดปล่อยเชื้อออกมาในปริมาณที่เหมาะสมและสามารถควบคุมโรคได้เป็นระยะเวลานาน (Elcin, 1995; Dey *et al*., 2003; Otsu *et al*., 2003; Liu *et al*., 2008)

แม้ว่า *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ที่ก่อให้เกิดโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ดีก็ตาม แต่การนำเชื้อดังกล่าวมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลบีดนั้น มีเป้าหมายเพื่อให้เชื้อดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินได้อย่างกว้างขวางและครอบคลุมยิ่งขึ้น จึงได้มีการคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินที่ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 สามารถยับยั้งได้ เพื่อช่วยให้การพัฒนาและการนำไปใช้ควบคุมโรคโดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวประสบความสำเร็จตามวัตถุประสงค์ทุกประการ โดยเริ่มต้นตั้งแต่การผลิตสปอร์ของ *B. megaterium* ให้มีปริมาณเพียงพอและมีคุณภาพเหมาะสม การเตรียมและพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์เจลบีด การศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ ขนาดเจลบีด การอยู่รอด การปลดปล่อยเชื้อ การสลายตัวของพอลิเมอร์ และการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคในเรือนทดลอง ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทดสอบและมีคุณภาพดีสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมโรคพืชโดยใช้คลุกดินได้อีกด้วย

2. ตรวจเอกสาร

2.1 พริก

พริกอยู่ในวงศ์ Salanaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Capsicum* spp. พริกมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปอเมริกา ต่อมาได้มีการปลูกกระจายไปยังประเทศต่างๆ ซึ่งในปัจจุบันมีการปลูกพริกกันทั่วโลก และมีสายพันธุ์ที่แตกต่างกันไป จึงทำให้พริกแต่ละสายพันธุ์มีขนาด รูปร่าง สี และกลิ่นที่แตกต่างกัน พริกเป็นผักที่มีความสำคัญในชีวิตประจำวันของคนไทย เนื่องจากคนไทยนิยมนำพริกมาประกอบอาหาร ใช้เป็นส่วนประกอบของยารักษาโรคบางชนิด ทั้งนี้เพราะว่าพริกเป็นพืชที่ทำให้อาหารมีรสเผ็ด มีคุณค่าทางอาหาร มีสีสันสวยงาม จึงทำให้พริกเป็นผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกหนึ่งชนิด (พิทักษ์, 2540; อร่าม, 2543)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ระบบรากของพริกมีรากแก้ว ต้นพริกที่โตเต็มที่รากฝอยจะแผ่ออกไปหากินด้านข้างในรัศมีเกินกว่า 1 เมตร และหยั่งลึกลงไปในดินกว่า 1.20 เมตร รากฝอยจะหนาแน่นมากในบริเวณรอบๆ ต้นใต้ผิวดินลึกประมาณ 60 เซนติเมตร ส่วนของ ลำต้นตั้งตรง สูงประมาณ 30.5-76.2 เซนติเมตร กิ่งจะเจริญจากลำต้นเพียง 1 กิ่ง แล้วแตกออกเป็น 2 กิ่ง และเพิ่มเป็น 4 กิ่ง 8 กิ่ง 16 กิ่ง ไปเรื่อยๆ พริกเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ใบเป็นแบบใบเดี่ยวมีลักษณะแบนเรียบ เป็นมัน มีขนบ้างเล็กน้อย ใบมีรูปร่างตั้งแต่รูปไข่ไปจนกระทั่งเรียวยาว มีขนาดแตกต่างกัน ส่วนของดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ คือ มีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ภายในดอกเดียวกัน โดยปกติมักพบเป็นดอกเดี่ยว ดอกเกิดที่ข้อตรงมุมที่เกิดใบหรือกิ่งก้านดอกอาจตรงหรือโค้ง และในส่วนของผลพริก มีทั้งผลเดี่ยวและผลกลุ่ม ขนาดของผลมีตั้งแต่ขนาดผลเล็ก ไปจนกระทั่งมีขนาดผลใหญ่ ผนังผลมีตั้งแต่บางจนถึงหนาขึ้นอยู่กับพันธุ์ ผลอ่อนมีทั้งสีเหลืองอ่อน สีเขียวเข้ม และสีม่วง เมื่อผลสุกอาจเปลี่ยนเป็นสีแดง ส้ม เหลือง น้ำตาล ขาวนวลหรือสีม่วง พร้อมๆกับการแก่ของเมล็ดในผลควบคู่กันไป ผลพริกมีความเผ็ดแตกต่างกันไป บางพันธุ์เผ็ดจัด บางพันธุ์ไม่เผ็ดเลยหรือเผ็ดน้อย ฐานของผลอาจแบ่งออกเป็น 2-4 ห้อง เมล็ดจะเกิดเกาะรวมกันอยู่ที่รก (placenta) ซึ่งมีตั้งแต่โคนจนปลายผล สำหรับในส่วนของเมล็ดพริก มีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าเมล็ดมะเขือเทศแต่มีรูปร่างที่คล้ายกัน คือ มีรูปร่างกลมแบน มีสีเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาล ผิวเรียบ ผิวไม่ค่อยมีขนเหมือนเมล็ดมะเขือเทศ มีร่องลึกอยู่ทางด้านหนึ่งของเมล็ด เมล็ดจะติดอยู่กับรก เมล็ดพริกมีชีวิตอยู่ได้นานประมาณ 2-4 ปี (พิทักษ์, 2540)

2.1.2. การจำแนกพันธุ์พริก

การจำแนกพันธุ์พริกในประเทศไทยนิยมจำแนกตามความเผ็ดและตามขนาดผล ดังนี้ (พิทักษ์, 2540; กองบรรณาธิการฐานเกษตรกรรม, 2541)

2.1.2.1 การจำแนกพันธุ์พริกตามความเผ็ด สารที่ให้ความเผ็ดของพริก คือ สารแคปไซซิน (Capsaicin) พริกที่มีสารแคปไซซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักนั้นจัดว่าเป็นความเผ็ดสูงสุด ส่วนพริกที่มีความเผ็ดน้อยลงไปจะมีสารแคปไซซินลดลง โดยสามารถแบ่งพริกตามความเผ็ดได้ 3 กลุ่มดังนี้

1) กลุ่มที่มีความเผ็ดมาก เป็นพริกที่มีความเผ็ดตั้งแต่ 70,000-175,000 สโควิลล์ พริกกลุ่มนี้มีผลขนาดเล็ก มีความเผ็ดสูง ได้แก่ พันธุ์ตาบาสโก (Tabasco)

2) กลุ่มที่มีความเผ็ดปานกลาง เป็นพริกที่มีความเผ็ดตั้งแต่ 35,000-70,000 สโควิลล์ มักใช้ผสมกับเครื่องเทศอื่นในการปรุงรสอาหาร ได้แก่ พริกขี้หนู พริกจินดา พริกซี่ฟ้า พริกมัน ห้วยสีทน หัวเรือ ช่อ มข. เป็นต้น

3) กลุ่มที่มีความเผ็ดน้อยหรือไม่เผ็ด เป็นพริกที่มีความเผ็ดน้อยกว่า 0-35,000 สโควิลล์ ผลมีขนาดใหญ่ ทรงผลกรมหรือกลมรี เนื้อหนา ได้แก่ พริกหยวก พริกหวาน เป็นต้น

2.1.2.2 การจำแนกพันธุ์พริกตามขนาดของผล สามารถแบ่งตามขนาดของผลได้ 2 ขนาด คือ พริกใหญ่และพริกเล็กหรือพริกขี้หนู

1) พริกใหญ่ เป็นพริกที่มีความยาวของผลมากกว่า 5 เซนติเมตร แบ่งเป็น 2 พวก คือ พริกที่มีความยาวผลระหว่าง 5-10 เซนติเมตร ได้แก่ พริกซี่ฟ้า พริกเหลือง พริกมัน พริกมันพิชัย พริกบางช้าง และพริกที่มีความยาวผลมากกว่า 10 เซนติเมตร ได้แก่ พริกสิงคโปร์ พริกหนุ่ม

2) พริกเล็กหรือพริกขี้หนู เป็นพริกที่มีความยาวไม่เกิน 5 เซนติเมตร แบ่งเป็น 2 พวก คือ พริกที่มีความยาวผลระหว่าง 2-5 เซนติเมตร ได้แก่ พริกพันธุ์ห้วยสีทน 1 พริกจินดา พริกชลบุรี พริกหัวเรือ เป็นต้น และพริกที่มีความยาวผลไม่เกิน 2 เซนติเมตร ได้แก่ พริกขี้หนูสวน พริกขี้หนูหอม พริกกะเหรี่ยง พริกขี้นก

2.1.3 ประโยชน์ของพริก

พริกเป็นแหล่งเบต้าแคโรทีน ซึ่งมีเบต้าแคโรทีนอยู่ถึง 140.77 ไมโครกรัม เทียบหน่วยเรตินัล (คำนวณจากน้ำหนัก 100 กรัม) มีแคลเซียม 76 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 82 มิลลิกรัม เหล็ก 1.6 มิลลิกรัม วิตามินซี 86 มิลลิกรัม โปรตีน 4.1 กรัม วิตามินบี1 บี2 และไนอะซิน พริกสามารถนำพริกไปปรุงแต่งรสชาติและสีสันของอาหาร นอกจากนี้พริกยังมีประโยชน์ทางด้านยา

รักษาโรค เช่น ช่วยบรรเทาอาการไข้หวัดทำให้หายใจได้สะดวกขึ้น ลดความอ้วน ลดความอุดตันของเส้นเลือด ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง ลดปริมาณสารโคแลสเตอรอล บรรเทาอาการเจ็บปวด และช่วยให้อยากอาหาร พริกบางชนิดมีต้นขนาดเล็ก ผลดก มีหลายสี เช่น สีส้ม ม่วง แดง และขาว จึงเหมาะในการนำไปปลูกเป็นไม้ประดับได้อีกด้วย (มโนวิทย์, 2547; ธนวัฒน์, 2553)

2.1.4 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

พริกสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตสำหรับพริกเผ็ดประมาณ 20-30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส ทำให้ดอกร่วง หรือพบอาการเป็นแผลไหม้ที่ผล ส่งผลให้ผลผลิตพริกลดลง การปลูกพริกในช่วงฤดูฝนควรยกแปลงสูงเพื่อให้มีการระบายน้ำได้ดี ซึ่งพริกที่ปลูกในช่วงฤดูนี้มักมีเชื้อโรคทำลายบริเวณผล ฤดูปลูกพริกที่เหมาะสมควรอยู่ในฤดูหนาว โดยมีช่วงหยอดเมล็ดเพาะกล้าประมาณเดือนตุลาคมถึงต้นเดือนธันวาคม พริกสามารถเจริญเติบโตได้ในดินทุกชนิด แต่สามารเจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนปนทรายอินทรียวัตถุสูงระบายน้ำดี ความเป็นกรด-ด่างเหมาะสม 5.5-6.5 พริกไม่ชอบน้ำขังการปลูกพริกไม่ควรปลูกซ้ำที่เดิมเกิน 2 ครั้ง เพราะจะเป็นแหล่งสะสมโรคและแมลง ทำให้การป้องกันกำจัดได้ยาก (จำลอง, 2553; พิทักษ์, 2540)

2.1.5 การเก็บเกี่ยว

การเก็บเกี่ยวผลผลิตพริก โดยทั่วไปจะเริ่มเก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุ 60 วันหลังจากย้ายปลูก ซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะประจำพันธุ์ด้วย สำหรับพริกขี้หนูและพริกชี้ฟ้ามีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 70-95 วัน พริกยักษ์มีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 60-80 วันโดยทั่วไปพริกจะให้ผลผลิตได้นาน 6-7 เดือน ถ้าดูแลรักษาดีก็จะเก็บผลได้นานถึง 1 ปี (กองบรรณาธิการฐานเกษตรกรรม, 2541)

2.2 โรคเหี่ยวของพริก

โรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. สามารถระบาดและสร้างความเสียหายเกือบทุกแห่งที่มีการปลูกพริก ซึ่งโรคดังกล่าวระบาดรุนแรงในภูมิอากาศอบอุ่นและในสภาพดินทรายของเขตร้อน (ศศิธร, 2549; Agrios, 1988) จากรายงานของ Fravel และคณะ (2003) พบว่าเชื้อรา *F. oxysporum* เป็นสาเหตุหนึ่งของโรคเหี่ยวในพริกชี้ฟ้า มักระบาดมากในช่วงที่อากาศมีความชื้นสูง ต้นพริกชี้ฟ้าที่เป็นโรคนี้มักแสดงอาการของโรคในระยะที่กำลัง

ผลิดอกออกผล เนื่องจาก *F. oxysporum* เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน ถ้ามีการปลูกพืชซ้ำในบริเวณเดิมจึงทำให้กิดการระบาดของโรค นอกจากนี้ Sahi และ Khalid (2007) พบว่าเชื้อรา *F. oxysporum* เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของพริกหวาน (*Capsicum annuum* L.) ได้อีกด้วย

2.3 โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp.

2.3.1 เชื้อรา *Fusarium* spp.

จำแนกหมวดหมู่ทางวิทยาศาสตร์ (Classification) ดังนี้ (Sharma, 1989)

Division	Eumycota
Sub-Division	Deuteromycotina
Class	Hyphomycetes
Order	Moniliales
Family	Tuberculariaceae
Genus	Fusarium

ลักษณะทางสันฐานวิทยาของเชื้อราของเชื้อรา *Fusarium* spp. คือ ลักษณะของไมโครคอนนิเดีย (microconidia) ใสไม่มีสี จำนวน 1-2 เซลล์ รูปร่างกลมจนถึงรี มีขนาดอยู่ในช่วง 5-12 × 2.2-3.5 ไมครอน ส่วน macroconidia ลักษณะใสไม่มีสี ลักษณะหัวท้ายเรียวแหลมคล้ายรูปเคียว หรืออาจมน จำนวน 3-5 septate มีขนาดแตกต่างกันไป เช่น conidia ที่มี 3 septate จะมีขนาดอยู่ในช่วง 27-46 × 3-5 ไมครอน conidia ที่มี 4 septate จะมีขนาดอยู่ในช่วง 35-60 × 3-5 ไมครอน ส่วน conidia ที่มี 6-7 septate จะมีขนาดอยู่ในช่วง 50-66 × 3.5-5 ไมครอน โดย conidia ส่วนใหญ่ที่พบจะมีจำนวน 3 septate ส่วน chlamydospores มีลักษณะกลม ผิวเรียบ ผนังหนา มีเซลล์เดียว สร้างเมื่อเส้นใยมีอายุมาก ผลิตบริเวณกลางหรือปลายส้นใย ลักษณะโคโลนีมีหลายสี ตั้งแต่สีขาว สีพีช สีชมพู สีเทา และสีม่วง (ศศิธร, 2549; Booth, 1971)

2.3.2 ลักษณะอาการของโรค

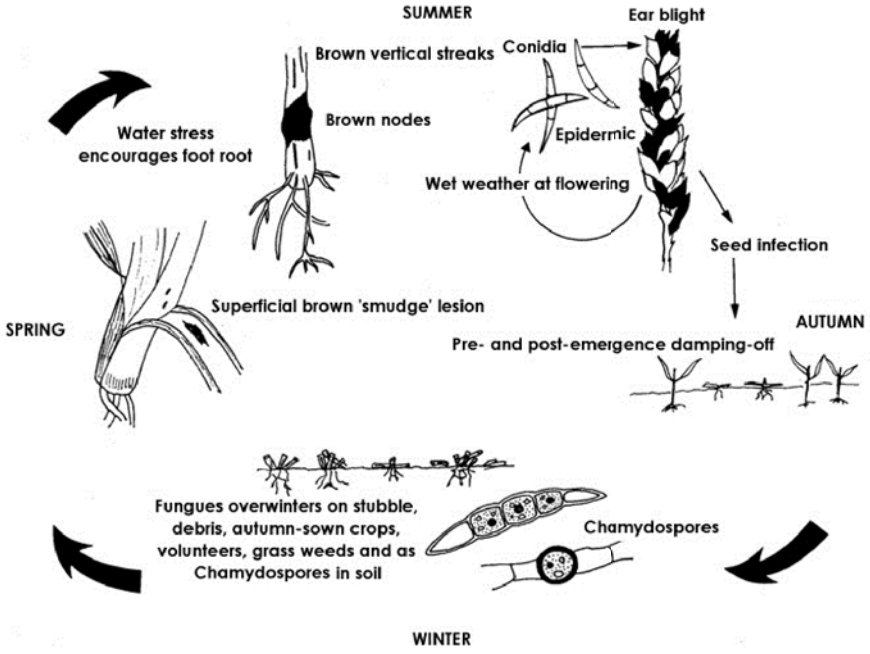
ใบเหลือง เหี่ยวลู่ลง และหลุดร่วงในที่สุด เมื่อถอนต้นขึ้นมาพบว่าโคนต้นและรากถูกทำลาย เปลือกล่อนหลุด เห็นเนื้อภายในรากและลำต้นเป็นสีน้ำตาลเข้ม เมื่อความชื้นพอเหมาะอาจพบเชื้อราสาเหตุโรคเจริญอยู่ที่บริเวณโคนต้น ลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวฟู ถ้าเชื้อราเข้าทำลายตั้งแต่ต้นพริกยังเล็กอาจทำให้เกิดอาการเน่าคอดิน ทำให้กล้าแห้งตายล้มพับเป็นหย่อมๆ ต้นที่รอด

ตายจะแคระแกรน ถ้าเชื้อราเข้าทำลายในระยะที่พริกโต เริ่มติดดอกออกผลแล้ว จะทำให้ชะงักการเจริญเติบโต ดอกผลร่วงและอาจถึงตายได้ถ้าเชื้อสาเหตุโรครุนแรงและสภาพแวดล้อมเหมาะต่อการเกิดโรค (ศศิธร, 2549)

2.3.3 การแพร่ระบาดของโรค

คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) จะถูกสร้างขึ้นในช่วงที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อหรือขาดพืชอาศัยที่อ่อนแอต่อโรค เป็นโครงสร้างที่ช่วยให้เชื้อราสามารถอยู่ข้ามฤดูได้ดี การแพร่ระบาดของโรคในแปลงอาจเกิดโดยมีเชื้อติดอยู่ในเศษซากพืชที่ตกค้างอยู่ในดิน เมื่อปลูกพริกหรือพืชที่อ่อนแอต่อโรคซ้ำลงไป เชื้อที่ตกค้างอยู่ในดินจะเข้าสู่พืชก่อให้เกิดการติดเชื้อทำให้พืชเป็นโรค การระบาดของโรคสู่แปลงข้างเคียงหรือบริเวณอื่นๆอาจเกิดโดยเชื้อติดไปกับน้ำ การเคลื่อนย้ายดิน อุปกรณ์ทางการเกษตร หรือติดไปกับเมล็ดพันธุ์พืช และเข้าสู่พืชได้ทางบาดแผลที่รากและโคนต้น ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม พืชจะแสดงอาการเหี่ยวให้เห็นภายใน 2 สัปดาห์ หลังจากได้รับเชื้อ การพัฒนาอาการของโรคจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อ สภาพแวดล้อม และพันธุ์ของพริกที่อ่อนแอต่อโรค โรคเหี่ยวมักระบาดและสร้างความเสียหายมากในแปลงปลูกพริกที่ปลูกซ้ำที่ต่อเนื่องกันมากกว่า 3 รุ่น โดยไม่มีการเขตกรรมเพื่อลดปริมาณเชื้อในแปลงที่ดีพอ (ศศิธร, 2549; ศักดิ์, 2537)

วงจรชีวิตของเชื้อ เริ่มขึ้นเมื่อพืชเจริญเติบโตในดินที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ในดิน ฝักเมล็ด หรือเศษซากพืชในรูปของโคนิเดีย (conidia) ซึ่ง conidia จะสร้างเจิร์มทิวป์ (germ tube) และเส้นใยจะงอกแทงผ่านปลายรากโดยตรงหรือผ่านทางบาดแผล เส้นใยจะเจริญผ่าน cortex ของรากไปยังช่องว่างระหว่างเซลล์ และเมื่อเจริญมาถึงท่อลำเลียงก็จะแผ่ขยายไปถึงลำต้น และยอดของต้นพืช ในขณะที่อยู่ในท่อลำเลียง เส้นใยเส้นใยจะมีการแตกแขนงและสร้าง microconidia ซึ่งจะถูกปลดปล่อยและแพร่กระจายไปยังท่อลำเลียงของพืช เส้นใยจะแทงผ่านไปยังเซลล์ที่อยู่ติดกันและจะผลิต microconidia ต่อไป (ภาพที่ 1) (Agrios, 1988 อ้างโดย อภิญญา, 2551; Parry, 1990)



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Fusarium* spp.

ที่มา : Parry, 1990

2.4 ปัจจัยที่ทำให้เชื้อรา *Fusarium* spp.

ปัจจัยที่ทำให้เชื้อรา *Fusarium* spp. เข้าทำลายพืช (ศศิธร, 2549; ศักดิ์, 2537; Koike *et al*., 2003; Engelhard, 1993) มีดังนี้

2.4.1 โครงสร้างดิน

ขนาดอนุภาคและโครงสร้างของดินเกี่ยวข้องกับปริมาณก๊าซออกซิเจนในดิน ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเกิดโรคในระบบรากของพืชอีกด้วย คือ ในดินที่มีการถ่ายเทอากาศ และการระบายน้ำดี จะช่วยลดการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อราในดินได้ ส่วนในดินที่มีการระบายน้ำเลว จะส่งผลให้การอยู่รอด และการแพร่กระจายของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินที่เกิดขึ้นได้ดี ซึ่งเชื้อรา *Fusarium* spp. จะเกิดการระบาดรุนแรงในดินที่เป็นดินเปียกมากกว่าดินแห้ง

2.4.2 ความเป็นกรด-ด่าง ของดิน

ความเป็นกรด-ด่างของดินเกี่ยวข้องกับการเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ในดินทั้งที่เป็นสาเหตุโรคและไม่เป็นสาเหตุโรค ซึ่งมีผลส่งเสริมหรือลดการเกิดโรคของพืชได้

ซึ่งเชื้อรา *Fusarium* spp. สามารถเจริญได้ดีในดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4-7 (Latiffah *et al*., 2007)

2.4.3 ความชื้นในดิน

ความชื้นในดิน ได้แก่ ปริมาณน้ำในดิน หรือความสามารถในการอุ้มน้ำของดินนั้น ดินที่มีความชื้นสูง (ความชื้นตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป) และความชื้นต่ำ (ความชื้นต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์) มีผลต่อการงอก และการเข้าทำลายพืชของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน ซึ่งเชื้อรา *Fusarium* spp.เป็นเชื้อราที่ต้องการความชื้นต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ในการเข้าทำลายพืช

2.4.4 แสง

แสงมีผลช่วยเร่งหรือยับยั้งการเพิ่มหรือลดจำนวนของเชื้อ โดยแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ซึ่งมีช่วงคลื่นสั้นอาจจะทำให้เซลล์ของเชื้อราตาย หรือทำให้หมดความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับพืชได้ และนอกจากนี้แสงมีผลโดยตรงต่อพืช ถ้าพืชได้รับแสงไม่เพียงพอ จะแสดงอาการเหลืองซีด แคระแกรน อ่อนแอไม่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม ซึ่งส่งผลให้เชื้อราโรคพืชเข้าทำลายได้ง่าย เร็ว และรุนแรง

2.4.5 อุณหภูมิ

ในดินที่มีอุณหภูมิต่ำ (ต่ำกว่า 18 องศาเซลเซียส) การพัฒนาของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินหลายชนิดช้าลงและส่งผลให้ความรุนแรงของโรคลดลงด้วย ส่วนในดินที่มีอุณหภูมิอบอุ่น (24-32 องศาเซลเซียส) การเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจะเจริญขึ้นอย่างรวดเร็วและสามารถก่อโรคได้รุนแรงขึ้น ซึ่งเชื้อรา *Fusarium* spp. สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส

2.4.6 ธาตุอาหารพืช

ธาตุอาหารพืช ได้แก่ ธาตุไนโตรเจน และธาตุฟอสฟอรัส เมื่อมีการเพิ่มธาตุดังกล่าวลงไปในดินในปริมาณที่สูง จะสามารถเพิ่มความรุนแรงของโรคเหี่ยวในมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. ได้ ในขณะที่เมื่อมีการเพิ่มปริมาณของธาตุโพแทสเซียมและธาตุแคลเซียมในปริมาณที่สูงก็จะสามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวในมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. ลงได้

2.5 หลักการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรคพืช

แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีนั้น ควรมีลักษณะดังนี้ (Baker and Cook, 1974 อ้างโดยประเสริฐ, 2542)

2.5.1 สามารถเพิ่มจำนวน เจริญได้รวดเร็ว บุกรุก และเข้าครอบครองพื้นที่ได้ดี มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ผันแปร และสามารถเจริญอยู่ได้รอบรากพืช หรือบนต้นพืช

2.5.2 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีการออกฤทธิ์เข้าทำลายเชื้อก่อโรคได้หลายชนิด อย่างมีประสิทธิภาพในระดับที่มีความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะต่ำ และสารปฏิชีวนะไม่ถูกดูดซับหรือถูกทำลายเมื่ออยู่ในดิน

2.5.3 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ไม่ยับยั้งจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อื่นๆ ที่ใช้ร่วมกัน และไม่ส่งผลกระทบ หรือทำความเสียหายต่อพืชปลูก

2.5.4 มีสปอร์ที่ทนต่อความร้อนการถูกทำลาย และการถูกต่อต้านจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้เจริญได้ง่าย และเร็วกว่าหรือเท่ากับเชื้อก่อโรค

2.6 ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ *B. megaterium*

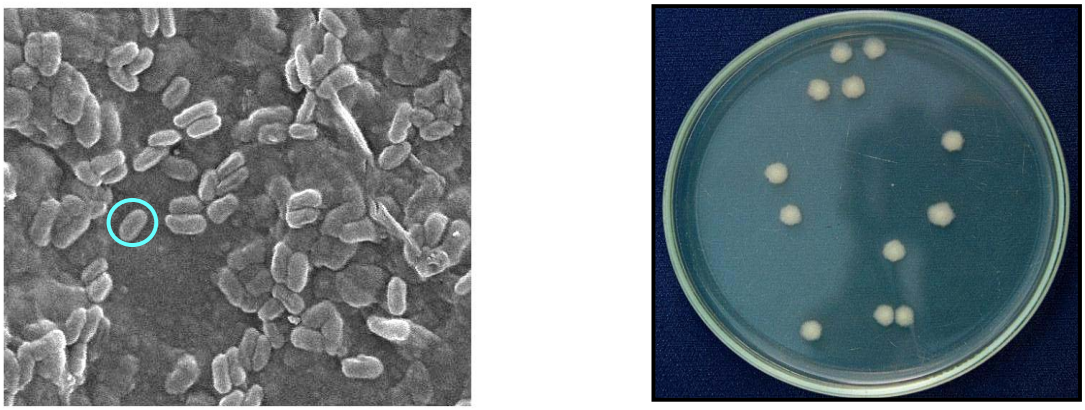
B. megaterium เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Bacillaceae สกุล *Bacillus* ติดสีกรัมบวก มีรูปร่างเซลล์แบบ bacilli (รูปแท่ง) มีขนาดความกว้าง 0.05-2.5 ไมโครเมตร และความยาว 1.2-10.0 ไมโครเมตร (ศุภยางค์, 2547) ลักษณะของโคโลนีเป็นสีครีมถึงน้ำตาล รูปร่างกลม ขอบโคโลนีไม่เรียบ ผิวของโคโลนีมีลักษณะด้าน หนา และทึบแสง บางครั้งมีรอยย่นที่ผิวของโคโลนี *B. megaterium* เป็นเชื้อที่เจริญเร็ว ใช้เวลาในการเจริญประมาณ 24 ชั่วโมง และสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 30-45 องศาเซลเซียส และสามารถอยู่ได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 80 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี

B. megaterium ใช้เวลาในการสร้างสปอร์ 10 ชั่วโมง ซึ่งการสร้างสปอร์จะเกิดขึ้นในกรณีที่เกิดภาวะขาดแคลนอาหาร การสร้างสปอร์เริ่มจาก vegetative cell ปกติเมื่อเกิดสภาวะขาดแคลนอาหาร จะมีการแบ่งเซลล์และสร้างผนังกั้นขึ้นมาแยกเซลล์ แต่เนื้อเยื่อยังคงเจริญต่อไป และมีสปอร์ที่ไม่สมบูรณ์อยู่ในเนื้อเยื่อ จากนั้นจะเกิด cortex ขึ้นระหว่างเนื้อเยื่อ ซึ่งมีการสะสมแคลเซียม และ dipicolinic acid มีโปรตีนห่อหุ้มรอบๆ cortex และจะมีสปอร์ที่สมบูรณ์เกิดขึ้น

จากนั้นเอนไซม์ภายในเซลล์ทำลาย sporangium เพื่อปล่อยสปอร์ออกมาในเมื่อมีอาหารสมบูรณ์ (Freese *et al.,* 1975)

B. megaterium สายพันธุ์ 16 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในนาข้าว จังหวัดสตูล (Kanjanamaneesathian *et al.*, 1998) เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งขนาดความกว้าง 0.76-0.95 ไมโครเมตร และความยาว 1.95-1.99 ไมโครเมตร (ภาพที่ 2(ก)) ลักษณะโคโลนี สีน้ำตาลอ่อน รูปร่างกลม ขอบไม่เรียบ (ภาพที่ 2(ข)) เจริญเติบโตเร็ว ใช้เวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนอกจากนี้ยังเป็นเชื้อที่สามารถเพาะเลี้ยง และผลิตสปอร์ได้ง่ายด้วยอาหารที่มีวัสดุราคาถูกเป็นส่วนประกอบหลัก ได้แก่ มันฝรั่ง มันเทศ มันสำปะหลัง ข้าวเจ้า ข้าวกล้อง ข้าวเหนียว และลูกเดือย ซึ่งวัสดุดังกล่าว มีต้นทุนการผลิตต่ำ (19.85-28.00 บาท/ลิตร) (Pengnoo *et al.*, 2005) มีคุณสมบัติทั้งทางด้านชีวเคมีและด้านกายภาพ ดังตารางที่ 1

(ก) **(ข)**



ภาพที่ 2 สปอร์ (ก) และโคโลนี (ข) ของเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16

ตารางที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติทางด้านชีวเคมีและด้านกายภาพของเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16

การทดสอบ	คุณสมบัติ
Gram strain	+
Morphology	Rod
Endospore	+
Capsule	+
Motility	+
O-F glucose	O/F
Gelation liquefaction	+
Citrate	+
Urease	+
Glucose	A
8% NaCl	G
Starch hydrolysis	+
Catalase test	+

ที่มา : Pengnoo *et al*., 2000

จากคุณสมบัติของ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 ที่กล่าวมาข้างต้น จึงนำแบคทีเรียดังกล่าวมาใช้ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราในดิน

2.7 การควบคุมโรคพืชโดยเชื้อ *B. megaterium*

B. megaterium มีกลไกในการต่อสู้กับเชื้อโรคพืชได้หลายวิธี ได้แก่ ความสามารถในการแข่งขัน (competition) กับเชื้อราสาเหตุโรค โดยการผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายชีวิต (antibiosis) กับเชื้อราสาเหตุโรค จากการศึกษาของ Bertagnolli และ คณะ (1996) พบว่า *B. megaterium* B153-2-2 สามารถผลิตเอนไซม์ endoproteinase และ phospholipase ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรครากเน่าของถั่วเหลืองได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Zheng และ Sinclair (1996) พบว่า *B. megaterium* B153-2-2 สามารถแข่งขันโดยการเข้าครอบครองพื้นที่ก่อนการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรครากเน่าของถั่วเหลืองได้ อีกทั้งยังทดสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในดิน พบว่าในดินผสมเนื้อหยาบซึ่งมีส่วนผสมระหว่างดิน เพอร์ไลต์ และทราย อัตราส่วน 1:1:1 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่าในดินผสมเนื้อละเอียดที่มีส่วนผสมระหว่างดิน เพอร์ไลต์ และทราย อัตราส่วน 3:1:1 นอกจากนี้ *B. megaterium* ยังมีคุณสมบัติ

ในการเป็นปรสิต (parasite) คือ การเข้าไปเจริญ และอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่น โดย Padgham และ Sikora (2006) รายงานว่า *B. megaterium* Ni5SO11 เข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne graminicola* ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรครากปมในข้าว นอกจากนี้ยังมี *B. megaterium* อีกหนึ่งสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี คือ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ที่ก่อให้เกิดโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ดี และพบว่าสารปฏิปักษ์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อของแบคทีเรียดังกล่าว สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้ถึง 88 และ 84 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 3 และ 5 วัน ตามลำดับ (Kanjanamaneesathian *et al*., 1998; Pengnoo *et al*., 2000) นอกจากนี้มีการศึกษา *B. megaterium* ในการควบคุมเชื้อราในดินที่เป็นสาเหตุโรคพืชหลายชนิดดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การใช้เชื้อ *B. megaterium* ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่เกิดจากเชื้อราในดิน

พืช	เชื้อรา	อ้างอิง
บานไม่รู้โรย	*Alternaria tagetica*	Wu และคณะ (2001)
พริก	*P. capsici*	Jung และ Kim (2003)
มะเขือเทศ	*F. oxysporum*	Omar และคณะ (2006)
มะเขือเทศ	*S. rolfsii*	อรอุษา และคณะ (2549)
ถั่วลิสง	*Aspergillus flavus*	Kong และคณะ (2010)

จากคุณสมบัติและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชของ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 ที่กล่าวมาข้างต้น จึงนำแบคทีเรียดังกล่าวมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลบีด เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.8 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *B. megaterium* ในการควบคุมโรคพืช

B. megaterium มีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อราก่อโรคในดินหลายชนิด แต่การศึกษาส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปของเซลล์สดซึ่งมีปัญหาในการควบคุมเชื้อก่อโรคในดินทั้งทางด้านกายภาพและชีวภาพ ด้านกายภาพ ได้แก่ มีความคงตัวต่ำ ไม่สะดวกในการนำไปใช้ เก็บรักษาได้ยาก และระยะเวลาในการเก็บรักษาสั้น ด้านชีวภาพ ได้แก่ เกิดการแก่งแย่งอาหารกับจุลินทรีย์อื่น วิธีการหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาการอยู่รอดของเชื้อปฏิปักษ์ได้ คือ

การผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ เช่น การผลิตในรูปแบบแกรนูล เม็ด ผง และเจลบีด เพื่อให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช มีความสะดวกในการนำไปใช้ เก็บรักษาได้ง่าย และปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม ซึ่งจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆดังนี้ (นิพนธ์, 2539)

2.8.1 มีมาตรฐานที่เชื่อถือได้ คือต้องมีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้มาตรฐานทุกครั้งที่ผลิต ไม่มีเชื้ออื่นปะปน และคุณภาพการควบคุมโรคคงที่ สม่ำเสมอ

2.8.2 มีอายุเก็บรักษาได้นาน ผลิตภัณฑ์ที่ดีจะต้องสามารถเก็บรักษาได้นาน ไม่ว่าจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.8.3 มีความปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม ผลิตภัณฑ์จะต้องไม่มีโทษต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ และสิ่งแวดล้อม คือ ไม่ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับสิ่งแวดล้อมต่างๆ

2.8.4 สามารถนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ร่วมกับวิธีการอื่นได้

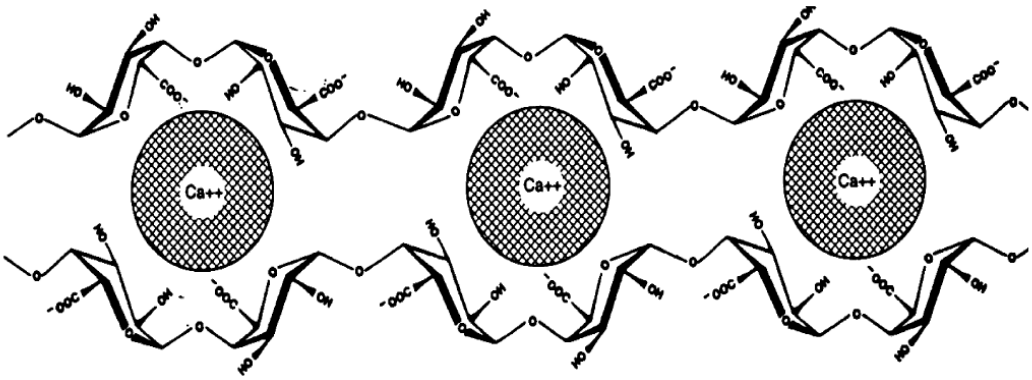
Wiwattanapatapee และคณะ (2004) ได้พัฒนา *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 เป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบเพลเลตลอยน้ำ เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ที่ทำให้เกิดโรคกาบใบแห้งของข้าว พบว่าสามารถควบคุมการเกิดโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ดีเทียบเท่ากับสารฆ่าเชื้อรา (iprodione) โดยเพลเลตค่อยๆ ปลดปล่อย *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 ออกมายับยั้งเชื้อราโรคพืช ต่อมา Kanjanamaneesathian และคณะ (2007) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 ในรูปแบบแกรนูลละลายน้ำ และเพลเลทลอยน้ำ พบว่าสามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 6 เดือน และนอกจากนี้ อัจฉรา และคณะ (2550) ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 ในรูปแบบเม็ดชนิดหว่านและชนิดพ่น ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ที่เป็นเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว โดยทำการทดสอบในสภาพเรือนทดลอง พบว่าการใช้สูตรสำเร็จชนิดหว่านร่วมกับสูตรสำเร็จชนิดพ่นมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวได้เกือบเทียบเท่ากับการใช้สารฆ่าเชื้อรา (iprodione) เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศเซลเซียส) เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 มีชีวิตรอดปริมาณสูงถึง 10^8 cfu ต่อกรัม และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้สูงเช่นกัน

2.9 **อัลจิเนตเจลบีด**

เจลบีดเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมใช้ห่อหุ้มตัวยา เซลล์หรือจุลินทรีย์โดยสามารถป้องกันสารสำคัญหรือเซลล์จุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง รังสีอัลตราไวโอเลต มลพิษ และปลดปล่อยสารสำคัญหรือจุลินทรีย์อย่างช้าๆ ผลิตภัณฑ์เจลบีดส่วนใหญ่เตรียมได้จากสารก่อเจล (gelling agent) ที่มีคุณสมบัติพองตัวได้ดี ซึ่งเป็นสารกลุ่มพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติหรือการสังเคราะห์ ได้แก่ อัลจิเนต คาราจีแนน ไคโตซาน และเจลาติน แต่พอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ คือ โซเดียมอัลจิเนต (Peniche *et al.,* 2004 อ้างโดย ประวิทย์, 2550)

โซเดียมอัลจิเนตเป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyceae) สาหร่ายทะเลที่ใช้ในการผลิตโซเดียมอัลจิเนตเป็นอุตสาหกรรม ได้แก่ Macrocystis pyrifera มีอัลจินประมาณ 14-19 เปอร์เซ็นต์ Laminaria cloustoni และ Laminaria digitata มีอัลจินประมาณ 15-40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณที่พบจะขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย ฤดูกาล และแหล่งที่สาหร่ายเจริญเติบโต สาหร่ายเหล่านี้พบได้ทั่วไปในโลก โซเดียมอัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์สายตรงไม่มีสาขา (unbranched binary) copolymer ของ 1,4-b-D-manuronic acid (M) และ L-guluronic acid (G) ในโมเลกุลประกอบด้วย homopolymeric regions ของ G และ M ที่เรียกว่า G- และ M-blocks ตามลำดับ และยังมีบางส่วนของโมเลกุลเป็น MG-blocks ซึ่งโซเดียมอัลจิเนตมีประจุลบ (จักรพันธ์, 2538)

สมบัติหลักของการเกิดเจลได้จากการกระจายตัวของโครงสร้างที่เป็น block คือความสามารถของอัลจิเนตสำหรับการเกิดเจล โดยเจลที่เกิดขึ้นเป็น heat stable gels ซึ่งเซตตัว ณ อุณหภูมิห้อง ในการเกิดเจลกับแคลเซียมไอออน โมเลกุลของอัลจิเนตจำเป็นต้องมีสัดส่วนของguluronic acid ที่ต่อกันเป็นอนุกรม ความสามารถในการเกิดเจลและความแข็งแรงของเจลขึ้นกับปริมาณ G และความยาวของ G โดยพบว่า high C content และ long G block ให้ calcium reactivity สูงสุด รวมทั้งการเกิดเจลที่แข็งแรงที่สุด ซึ่งให้เจลในลักษณะคล้ายกล่องไข่ หรือที่เรียกว่า egg box (ภาพที่ 3) เจลของอัลจิเนตเป็นสารที่มีส่วนที่เป็นของแข็งที่เรียกว่า junction zone และสารละลายหลังการเกิดเจลแล้วโมเลกุลของน้ำจะถูกจับไว้ในโครงสร้างตาข่ายทางกายภาพ แต่ยังอิสระต่อการเคลื่อนย้าย กระบวนการเกิดเจลแคลเซียมอัลจิเนตจึงเป็นการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างโซเดียมและแคลเซียม (มาริสา, 2548)



ภาพที่ 3 โครงสร้างการเกิดเจลลักษณะ egg box
ที่มา : Rousseau และคณะ (2004)

Al-Zahrani (1999) ได้ทำการเตรียมเจลบีดของ sulphamethoxazole ซึ่งส่วนผสมที่ใช้ คือ โซเดียมอัลจิเนต และแคลเซียมคลอไรด์ โดยกำหนดความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตเป็น 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถบรรจุยาได้สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ของยาที่เติมลงไป ในขณะที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สามารถบรรจุยาได้ 72 และ 68 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ตามลำดับ ส่วนแคลเซียมคลอไรด์ใช้ในความเข้มข้น 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สูงขึ้นทำให้การปลดปล่อยยาช้าลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wang และคณะ (2005) ซึ่งได้ทำการทดลองเตรียมยาในรูปแบบไมโครแคปซูล โดยการใช้แคลเซียมคลอไรด์ที่เข้มข้น 0.5-3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นส่วนประกอบ พบว่าที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์น้อยลงทำให้บรรจุยาได้มากขึ้น และทำให้ยาถูกปลดปล่อยออกมาได้ดี

Elcin (1995) ทำการทดลองโดยการนำสารโซเดียมอัลจิเนต ที่ความเข้มข้น 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดลูกน้ำยุงในรูปแบบไมโครแคปซูล ซึ่งภายในบรรจุเชื้อ *B. sphaericus* 2362 โดยทดสอบการอยู่รอดของสปอร์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวต่อแสงอัลตราไวโอเลต ค่าความเป็นกรด-ด่าง และสารเคมีต่างๆ ได้แก่ สารที่มีทองแดง ปรอท และเหล็กเป็นองค์ประกอบ พบว่าสปอร์ของแบคทีเรียทนต่อแสงอัลตราไวโอเลตที่มีความเข้มแสงถึง 12 วัตต์ และห่างจากหลอดอัลตราไวโอเลต 20 เซนติเมตร นานถึง 24 ชั่วโมง และทนความเป็นกรด-ด่างที่ 3-5 ได้ และยังทนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์สด

Dey และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ต่อผลิตภัณฑ์เจลบีด ได้ผลิตเจลบีดโดยการใช้สารโซเดียมอัลจิเนต มาผสมกับเอนไซม์ที่เตรียมได้จากเชื้อ *B. circulans* ซึ่งมีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารรองรับ พบว่าที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.9 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ยังปรากฏกิจกรรมของเอนไซม์ถึง 25.6 ยูนิต ต่อกรัม

จากรายงานของ Lee และ Heo (2000) ได้มีการผลิตเชื้อ *Bifidobacterium longum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ช่วยย่อยอาหาร โดยผลิตในรูปแบบอัลจิเนตเจลบีด เพื่อทดสอบการอยู่รอดของเชื้อดังกล่าวในกระเพาะอาหาร ซึ่งมีความเป็นกรด-ด่างต่ำ พบว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสามารถลดอัตราการตายของ *B. longum* ได้ นอกจากนี้ Otsu และคณะ (2003) ได้นำเชื้อ *Alcaligenes paradoxus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้ควบคุมด้วงเต่าทองซึ่งเป็นแมลงศัตรูพืช โดยผลิตในรูปแบบผลิตภัณฑ์อัลจิเนตเจลบีด พบว่า *A. paradoxus* สามารถอยู่ได้นานถึง 1 สัปดาห์ และเพียงพอต่อการย่อยสลายเยื่อบุผนังลำไส้ของด้วงเต่าทอง ทำให้ประชากรของด้วงเต่าทองลดลงได้ และนอกจากนี้ได้มีการนำผลิตภัณฑ์อัลจิเนตเจลบีดมาเพื่อใช้ในการดูดซับไอออนที่เป็นประจุบวกพวกโลหะหนักจากแหล่งน้ำ ได้แก่ เลด (II) ไอออน (Pb^{2+}) เมอร์คิวรี (II) ไอออน (Hg^{2+}) แคดเมียมไอออน (Cd^{2+}) คอปเปอร์ (II) ไอออน (Cu^{2+}) นิกเกิลไอออน (Ni^{2+}) โคบอลต์ (II) ไอออน (Co^{2+}) แมงกานีส(II)ไอออน (Mn^{2+}) และ โครเมียม(III) ไอออน (Cr^{3+}) (Lagoa and Rodrigues, 2007) จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเจลบีดส่วนใหญ่ผลิตขึ้นมาเพื่อใช้ในทางยาหรือผลิตเป็นชีวภัณฑ์ที่ใช้ในน้ำ สำหรับการทดลองครั้งนี้ได้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เจลบีดที่นำมาใช้ในดิน โดยการคลุกเมล็ด คลุกดิน หรือรองก้นหลุมก่อนทำการปลูกพืช จากรายงานของ Liu และคณะ (2008) ได้นำผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเจลบีดมาใช้ในดิน โดยได้นำเชื้อ *Cellulosimicrobium cellulans* GS6 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายหินฟอสเฟต มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เจลบีดที่มีแคลเซียมอัลจิเนตเป็นส่วนผสม เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบดังกล่าวค่อยๆ ปลดปล่อยเชื้อออกมา และย่อยสลายหินฟอสเฟตเพื่อปลดปล่อยฟอสฟอรัสในรูปที่เป็นประโยชน์แก่พืช ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้มีรายงานการนำจุลินทรีย์มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อัลจิเนตเจลบีดได้หลายตัวอย่าง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลิตภัณฑ์อัลจิเนตเจลบีดของจุลินทรีย์ในรูปแบบต่างๆ

เชื้อแบคทีเรีย	หน้าที่	อ้างอิง
Bifidobacterium bifidum	ชีวภัณฑ์	Kebary (1996)
Lactobacillus	ยา	Chandramouli และคณะ (2004)
L. delbrueckii	ชีวภัณฑ์	Sheu และคณะ (1993)
Bifidobacterium longum	ยา	Lee และคณะ (2004)
Pseudomonas fluorescens	ชีวภัณฑ์	Russo และคณะ (1996)
Pantoae agglomerans	ชีวภัณฑ์	Zohar และคณะ (2004)
Paecilomyces lilacinus และ *Pochonia chlamydosporia*	ชีวภัณฑ์	Duan และคณะ (2008)

ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปแบบอื่น เช่น แบบแกรนูล หรือแบบเม็ดฟู่ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชก็ตาม แต่ไม่เหมาะสำหรับการนำมาใช้ในดิน เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้แบบหว่านในน้ำ ซึ่งเหมาะกับการใช้ในนาข้าว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องผลิตผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเจลบีดที่ปลดปล่อยเชื้อออกมาในปริมาณที่พอเหมาะในระยะเวลาที่ต้องการ ซึ่งสามารถลดการถูกทำลายจากสภาพแวดล้อมหรือจุลินทรีย์อื่นในธรรมชาติ จึงสามารถเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ทันเมื่อโรคเริ่มเข้าทำลายพืช นอกจากนี้ยังสามารถลดความถี่และแรงงานในการใส่เชื้อ และเนื่องจากผลิตภัณฑ์มีลักษณะคล้ายเมล็ดพันธุ์พืชซึ่งเกษตรกรมีความคุ้นเคย สามารถนำมาหว่านแปลง โรยรอบโคนต้น หยอดก้นหลุม หรือใส่ลงดินในถุงเพาะกล้าได้อีกด้วย

3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

3.1 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 ในการควบคุมเชื้อราในดินที่ก่อให้เกิดโรคพืช

3.2 เพื่อพัฒนาเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 ในรูปแบบผลิตภัณฑ์เจลบีดที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์นานและสลายตัวทางชีวภาพ

3.3 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางด้านกายภาพ ชีวภาพ และความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีด

3.4 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เจลบีดในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของพริกในสภาพห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ 16

1.2 เมล็ดพริกชี้ฟ้า

1.3 potato dextrose agar (PDA)

1.4 potato dextrose broth (PDB)

1.5 โซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate) food grade

1.6 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride : NaCl)

1.7 แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride : $CaCl_2$)

1.8 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate : KH_2PO_4)

1.9 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid : HCl)

1.10 สารฆ่าเชื้อราเบนโนมิล (เบนเลท 25 เปอร์เซ็นต์ WP)

2. อุปกรณ์

2.1 จานเพาะเชื้อ (petri 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 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

2.9 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)

2.10 เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)

2.11 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

2.12 เครื่องเขย่าสำหรับเลี้ยงเชื้อ (Table rotary shaker)

2.13 กล้องจุลทรรศน์แบบ compound

2.14 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอแบบ Motic image

2.15 เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง

2.16 เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและคัดแยกเชื้อราในดินจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคต่างๆ จากแปลงผักเกษตรกร ได้แก่ โรคเหี่ยวของมะเขือ พริก กวางตุ้ง และถั่วฝักยาว โรคโคนเน่าของบล็อกโคลี โรครากเน่าของคะน้า แตงกวา และผักชี เป็นต้น ซึ่งได้เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคในพื้นที่ จังหวัดสงขลา ดังนี้

แหล่งที่ 1 บ้านแพรก อ.หาดใหญ่

แหล่งที่ 2 บ้านบางเหรียง อ.หาดใหญ่

แหล่งที่ 3 บ้านท่าข้าม อ.หาดใหญ่

แหล่งที่ 4 บ้านนาหว้า อ.จะนะ

นำตัวอย่างพืชมาแยกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี tissue transplanting method โดยใช้ใบมีดตัดตรงรอยต่อระหว่างแผลกับเนื้อเยื่อพืชที่ปกติให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ ขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร นำชิ้นส่วนดังกล่าวไปแช่ในคลอร็อก (Clorox) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10-15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปวางบนจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Streptomycin โดยวางชิ้นส่วนพืชให้ห่างกันจำนวน 4 ชิ้น ต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) เชื้อราจะสร้างโคโลนีและเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 2-7 วัน จากนั้นทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ โดยตัดปลายเส้นใยของเชื้อราไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เก็บเชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้บนอาหาร PDA slant เพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน

นำ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในนาข้าว จังหวัดสตูล (Kanjanamaneesathian *et al*., 1998) มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.1 ด้วยวิธี dual culture โดยตัดชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์อายุประมาณ 2-7 วัน เจริญอยู่ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปวางตรงกลางของจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร PDA และปลูก *B. megaterium* จำนวน 3 จุด เป็นรูปสามเหลี่ยมให้มีระยะห่างเท่าๆ กัน ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-7 วัน บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดความกว้างของรัศมีวงใสที่เกิดขึ้น (clear zone) แล้วคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่มีรัศมีวงใสที่เกิดขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 3.3 มิลลิเมตร ไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ในการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน

นำ *B. megaterium* มาทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์ วางแผนการทดลองแฟกทอเรียลแบบ 5x3x5 ประกอบด้วย 3 ปัจจัย คือ สายพันธุ์เชื้อรา ความเข้มข้นของสารปฏิปักษ์ และอุณหภูมิ โดยเลี้ยง *B. megaterium* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อจำนวน 2 ลูป ลงเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อที่มีรูกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แบ่งส่วนใสดังกล่าวเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 80 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วนที่ 2 ไม่ผ่านความร้อน (ชุดควบคุม) จากนั้นนำส่วนใสแต่ละส่วนไปผสมกับอาหาร PDA double strength ในอัตราส่วน 1:1 1:5 และ 1:10 ผสมให้เข้ากันแล้วเทใส่จานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่ออาหารแข็งตัวจึงนำเชื้อราสาเหตุโรค สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA อายุประมาณ 2-7 วัน โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยเชื้อราที่เจริญอยู่มาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อดังกล่าว ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-7 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาด

เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราจากสูตร (Gamliel *et al*., 1989) ดังนี้

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

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดควบคุม

r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบ

จากนั้นคัดเลือกเชื้อราสาเหตุที่ *B. megaterium* สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด จำนวน 2 สายพันธุ์ไปทำการพิสูจน์โรคและจำแนกชนิดของเชื้อราที่ก่อโรคเหี่ยวในพริกรุนแรงที่สุด

3.4 การพิสูจน์การเกิดโรคของเชื้อราในดินที่เชื้อ *B. megaterium* สามารถยับยั้งได้ดี

3.4.1 การเตรียมเชื้อรา

นำเชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.3 จำนวน 2 สายพันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และเตรียมเป็นสปอร์แขวนลอย (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อ และใช้แท่งแก้วฆ่าเชื้อขูดสปอร์บนผิววุ้นให้หลุดออก นับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และปรับสปอร์แขวนลอยให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.4.2 การเตรียมพืชทดสอบ

พืชที่ใช้ทดสอบ คือ พริก เตรียมโดยนำเมล็ดพันธุ์พริกมาแช่น้ำ 24 ชั่วโมง นำไปเพาะในกระบะเพาะ เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 30 วัน จึงนำมาทดสอบพิสูจน์โรค

3.4.3 การปลูกเชื้อ

นำต้นกล้าพริกอายุ 30 วัน จุ่มรากลงในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา แต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 แล้วนำไปปลูกในถุงพลาสติกที่บรรจุดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำการทดสอบจำนวน 4 ซ้ำ หลังจากนั้นสังเกตและบันทึกการเกิดโรคทุกวันเป็นเวลา 60 วัน หลังจากย้ายปลูกประเมินผลโดยการนับจำนวนต้นที่ตาย จากนั้นนำพืชที่แสดงอาการเหี่ยวไปแยกเชื้อราบริสุทธิ์อีกครั้ง และคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวรุนแรงที่สุด จำนวน 1

สายพันธุ์ และนำเชื้อราดังกล่าวมาจำแนกชนิด โดยอาศัยคู่มือของ Booth (1971) จากนั้นนำไปทดสอบกับผลิตภัณฑ์เจลบีดที่คัดเลือกได้ต่อไป

3.5 การเตรียมผลิตภัณฑ์เจลบีดของเชื้อ *B. megaterium*

3.5.1 การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์ *B. megaterium*

นำ *B. megaterium* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ อายุ 18-24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อลงในน้ำเกลือฆ่าเชื้อ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากันดูดสารละลายเชื้อที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหาร PDA ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นทำการเก็บสปอร์ของเชื้อโดยนำไปปั่นล้าง 2-3 ครั้งด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำลาย vegetative cell หลังจากนั้นนำไปตรวจนับปริมาณสปอร์ของ *B. megaterium* ด้วยวิธีการ drop plate บนอาหาร potato count agar (PCA) และเก็บสปอร์ของ *B. megaterium* ในตู้เย็นเพื่อใช้สำหรับเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

3.5.2 การเตรียมผลิตภัณฑ์เจลบีด

เตรียมผลิตภัณฑ์เจลบีดจากพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ (Biopolymer) คือ โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) โดยนำสารดังกล่าวมาละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้น 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แล้วนำแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *B. megaterium* ผสมให้เข้ากันได้ดี จากนั้นหยดส่วนผสมแต่ละส่วนที่ได้ผ่านกระบอกเข็มฉีดยา (syringe) ซึ่งรองรับด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) ความเข้มข้น 0.03 0.05 และ 0.07 โมล (ที่หมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที) วางไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นกรองเจลบีดด้วยกรวยกรองที่มีตะแกรงลวดกั้นอยู่ แล้วล้างด้วยน้ำเกลือนึ่งฆ่าเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ และนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ในแต่ละสูตรเพื่อเปรียบเทียบกัน จากนั้นบรรจุใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.6 การประเมินคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เจลบีด

3.6.1 การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เจลบีด

นำผลิตภัณฑ์เจลบีดที่เตรียมได้แต่ละสูตรไปศึกษาลักษณะทางกายภาพ คือการวัดขนาดการพองตัวของเจลบีด โดยการสุ่มเจลบีดสูตรละ 50 เม็ด มากระจายตัวในน้ำกลั่น วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 30 นาที และ 1 6 12 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงทำการวัดขนาดเส้นรอบวงของเจลบีด โดยใช้กล้องถ่ายรูปจุลทรรศน์สเตอริโอแบบ motic image แล้วคำนวณเป็นรัศมี เพื่อดูลักษณะการพองตัวของเจลบีด และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างรัศมีการพองตัวของเม็ดบีดที่เวลาต่างๆ

3.6.2 การประเมินคุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์เจลบีด

3.6.2.1 การปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ของผลิตภัณฑ์เจลบีดในน้ำ

นำผลิตภัณฑ์เจลบีดจากข้อ 3.6.1ปริมาณสูตรละ 0.05 กรัม มากระจายตัวในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 12 ชั่วโมง และ 1 2 4 และ 7 วัน ทำการสุ่มตัวอย่างสารละลายมาตรวจนับปริมาณเชื้อที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเจลบีดที่เวลาต่างๆ ด้วยวิธี dilution drop plate บนอาหาร PCA และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อที่ถูกปลดปล่อยออกมาที่ เวลาต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบกับการปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดแต่ละสูตรจากนั้นคัดเลือกผลิตภัณฑ์เจลบีดที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดจำนวน 3 สูตร เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.6.2.2 การสลายตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดในน้ำ

นำผลิตภัณฑ์เจลบีดที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.2.1 จำนวน 3 สูตร ปริมาณสูตรละ 0.05 กรัม มากระจายตัวในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 12 ชั่วโมง และ 1 2 4 และ 7 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงกรอง เจลบีด และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลบีดไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักของเจลบีดที่เหลืออยู่ สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ เจลบีดที่หายไปที่เวลาต่างๆ

3.6.2.3 การสลายตัวและการปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดในดิน

นำดินจากแปลงปลูกพริก (แปลงภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงลานครินทร์) นำมาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บด และร่อนผ่านตะแกรงที่มีช่องผ่านขนาด 2 มิลลิเมตร แบ่งดินเป็นสองส่วน โดยส่วนที่หนึ่งนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของดิน สำหรับดินส่วนที่สองนำดินที่ได้ใส่ในขวดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร สูง 8 เซนติเมตร ปริมาณขวดละ 100 กรัม ปิดปากขวดแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นใส่น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ดินมีความจุความชื้นภาคสนาม (field capacity) โดยการปรับความชื้นของดินเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ แล้วใส่ผลิตภัณฑ์เจลบีดจำนวน 3 สูตร จากข้อ 3.6.2.2 ปริมาณสูตรละ 0.05 กรัม โดยใส่ให้ลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 12 ชั่วโมง และ 1 2 4 7 14 และ 28 วัน และสุ่มตัวอย่างดินหลังจากบ่มปริมาณ 1 กรัม เพื่อนำไปนับปริมาณเชื้อที่ถูกปลดปล่อยออกมาที่เวลาต่างๆ ด้วยวิธี dilution drop plate บนอาหาร PCA แล้วสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อที่ถูกปลดปล่อยออกมาที่เวลาต่างๆ ส่วนดินที่เหลือนำมาใส่ตะแกรงแล้วนำไปร่อนในน้ำเพื่อแยกเจลบีดออกมา จากนั้นนำเจลบีดที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักเจลบีดและคำนวณการสลายตัวของเจลบีดในดิน แล้วคัดเลือกผลิตภัณฑ์เจลบีดที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดจำนวน 2 สูตร เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.6.2.4 ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีด

นำเจลบีดที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.2.3 จำนวน 2 สูตร มาชั่งปริมาณสูตรละ 0.05 กรัม นำไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ เท่ากับ 4 - 8 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อที่อยู่รอดด้วยวิธี dilution drop plate บนอาหาร PCA และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นเพื่อคำนวณหาค่าเฉลี่ยของปริมาณ *B. megaterium* ที่มีชีวิตรอดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์แต่ละสูตร เปรียบเทียบกับเซลล์สด

3.6.2.5 ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีด

นำเจลบีดที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.2.4 จำนวน 2 สูตร แบ่งเจลบีดเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งบรรจุในถุงพลาสติกใสและส่วนที่สองใส่ในขวดแก้วที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแต่ละส่วนใส่เจลบีดที่เตรียมได้ปริมาณสูตรละ 0.05 กรัม นำไปเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25 37 และ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นสุ่มตัวอย่างเจลบีดที่เวลา 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง และทำการตรวจนับจำนวนเชื้อที่อยู่รอดในเจลบีดด้วยวิธี dilution drop plate บนอาหาร PCA ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น เพื่อคำนวณหาค่าเฉลี่ยของปริมาณ *B. megaterium* ที่มีชีวิตรอดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์แต่ละสูตรเปรียบเทียบกับเซลล์สด

3.6.2.6 ผลของรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ต่อการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีด

นำเจลบีดที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.2.5 จำนวน 2 สูตร แบ่งเจลบีดเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งบรรจุในถุงพลาสติกใสและส่วนที่สองใส่ในขวดแก้วที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแต่ละส่วนใส่เจลบีดที่เตรียมได้ปริมาณสูตรละ 0.05 กรัม และนำไปวางภายใต้หลอดอัลตราไวโอเลตที่มีความเข้มแสง 20 วัตต์ (โดยกำหนดระยะห่างระหว่างหลอดและสารตัวอย่างเท่ากับ 30 เซนติเมตร) เป็นเวลา 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง และตรวจนับปริมาณเชื้อที่อยู่รอดด้วยวิธี dilution drop plate บนอาหาร PCA ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *B. megaterium* ที่มีชีวิตรอดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์แต่ละสูตร เปรียบเทียบกับเซลล์สด

3.7 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดในห้องปฏิบัติการ

สุ่มตัวอย่างดินจากข้อ 3.6.2.3 (ในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการคัดเลือก จำนวน 2 สูตร) ปริมาณ 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุที่ผ่านการพิสูจน์การเกิดโรคจากข้อ 3.4 จำนวน 2 สายพันธุ์ โดยวิธีการ pour plate ด้วยอาหาร PDA เมื่ออาหารแข็งดีจึงตัดชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อราสาเหตุเจริญอยู่ มาวางบนจานเพาะเชื้อที่ทำการ pour plate ไว้แล้ว ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 36 ชั่วโมง สังเกตการเกิด clear zone บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราสาเหตุของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนสารละลายดิน จากนั้นหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุ โดยใช้สูตรเช่นเดียวกับข้อที่ 3.3 และคัดเลือกเชื้อรา

สาเหตุที่ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดสามารถยับยั้งได้ดีมาจำนวน 1 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.8 การตรวจนับปริมาณเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

นำผลิตภัณฑ์เจลบีดจากข้อ 3.7 จำนวน 2 สูตร ปริมาณสูตรละ 0.05 กรัม มาละลายในโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 1.64 M จากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยวิธีการ dilution drop plate บนอาหาร PCA ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อ *B. megaterium* ที่มีชีวิตรอดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ที่คัดเลือกได้ โดยตรวจนับทุกเดือนเป็นระยะเวลา 7 เดือน หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะปิดสนิท

นำผลิตภัณฑ์เจลบีดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคจำนวน 1 สูตรมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลิตภัณฑ์เจลบีดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

3.9 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพเรือนทดลอง

3.9.1 แผนการทดลอง

ทดสอบประสิทธิภาพของ *B. megaterium* ของผลิตภัณฑ์เจลบีดในการควบคุมเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.7 ซึ่งก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของพริกชี้ฟ้า โดยทำการปลูกพริกชี้ฟ้าในสภาพเรือนทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 6 ซ้ำ มี 7 ตำรับการทดลอง ดังนี้

1. ปลูกพริกในดินปกติ
2. ปลูกพริกในดินที่ใส่เชื้อรา *Fusarium* spp. ในรูปเส้นใย
3. ปลูกพริกในดินที่ใส่เชื้อรา *Fusarium* spp. ในรูปสปอร์
4. ปลูกพริกในดินที่ใส่ผลิตภัณฑ์เจลบีด และเชื้อรา *Fusarium* spp. ในรูปเส้นใย
5. ปลูกพริกในดินที่ใส่ผลิตภัณฑ์เจลบีด และเชื้อรา *Fusarium* spp. ในรูปสปอร์
6. ปลูกพริกในดินที่ใส่เชื้อรา *Fusarium* spp. ในรูปเส้นใย และสารฆ่าราเบนโนมิล
7. ปลูกพริกในดินที่ใส่เชื้อรา *Fusarium* spp. ในรูปสปอร์ และสารฆ่าราเบนโนมิล

3.9.2 วิธีการทดลอง

3.9.2.1 การเตรียมต้นกล้าพริก โดยนำเมล็ดพันธุ์พริกมาแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน นำไปเพาะในกระบะเพาะ โดยโรยเป็นแถวห่างกันประมาณ 3 นิ้ว และกลบด้วยดินหนาประมาณ 1 เซนติเมตร รดน้ำให้ชุ่ม เมื่อต้นกล้าอายุ 30 วัน จึงทำการย้ายปลูก

3.9.2.2 การเตรียมสปอร์และเส้นใยของเชื้อรา *Fusarium* spp.

3.9.2.2.1 การเตรียมสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium* spp. โดยนำเชื้อรา *Fusarium* spp. มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน และเตรียมเป็นสปอร์แขวนลอย (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อ และใช้แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขูดสปอร์บนผิววุ้นให้หลุดออก จากนั้นนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และปรับสปอร์แขวนลอยให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.9.2.2.2 การเตรียมเส้นใยของเชื้อรา *Fusarium* spp. นำเชื้อรา *Fusarium* spp. มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดปลายเส้นใยเชื้อราไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวนขวดละ 2 ชิ้น และนำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองเพื่อแยกสปอร์และเส้นใยออกจากกัน นำเส้นใยไปชั่งให้ได้ปริมาณ 36 กรัม และผสมกับน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เส้นใยมีการกระจาย และแตกตัวเป็นชิ้นเล็กๆเพื่อนำไปใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.9.2.3 การเตรียมดินปลูกพริก นำดิน 2 ส่วนมาผสมให้เข้ากันในอัตราส่วน 1:1 โดยดินส่วนที่ 1 นำดินเหนียวปนทรายจากแปลงปลูกพริก (ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) ที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตรจากผิวดิน ตากให้แห้งในที่ร่ม บด และร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่องตา 5 มิลลิเมตร สำหรับดินส่วนที่ 2 เป็นดินผสมตราลำดวน นำดินที่ผสมเข้ากันดีแล้วแบ่งเป็น 2 ส่วน ดินผสมส่วนที่ 1 นำไปร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่องตา 2 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมี และกายภาพของดิน สำหรับดินผสมส่วนที่ 2 นำไปร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่องตา 5 มิลลิเมตร แล้วนำมาปลูกพริก โดยการชั่งดินหนัก 5 กิโลกรัม ใส่กระถางที่มีขนาด 12 นิ้ว

3.9.2.4 ปลูกเชื้อรา *Fusarium* spp. (ทั้งในส่วนของเส้นใยและในส่วนของสปอร์แขวนลอย โดยใช้ปริมาณส่วนละ 150 มิลลิลิตร ต่อกระถาง) โดยนำมาคลุกลงไปในดิน

สำหรับผลิตภัณฑ์เจลบีดใช้ปริมาณ 2.5 กรัมต่อกระถาง โดยใส่ให้ลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร ส่วนสาร เคมีเบนโนมิล (เบนเลท 25 เปอร์เซ็นต์ WP) ใช้ในอัตรา 25 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร จากนั้นนำต้นกล้าพริกอายุครบ 30 วัน มาปลูกลงไปในดินของทุกตำรับการทดลอง ดูแลรดน้ำทุกวัน เมื่อพริกอายุครบ 3 เดือน สังเกตอาการของโรคบันทึกผลจำนวนต้นที่แสดงอาการของโรค ชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของพริก และประเมินการเกิดโรคของพริก โดยใช้เกณฑ์วัดระดับความรุนแรงของโรค ดังนี้

ระดับที่ 0 = ไม่แสดงอาการของโรค
ระดับที่ 1 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 1 ใบ
ระดับที่ 2 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 2-3 ใบ
ระดับที่ 3 = ทุกใบแสดงอาการเหี่ยว ยกเว้นใบที่ส่วนยอด
ระดับที่ 4 = ทุกใบแสดงอาการเหี่ยว
ระดับที่ 5 = พืชเหี่ยวแห้งตายทั้งต้น

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค ดังนี้ (Song *et al*., 2004 อ้างโดย อภิญญา, 2551)

$$\% \text{ Disease severity} = \frac{\Sigma \text{ (Disease scale x Number of plants infected)}}{\text{Highest scale x Total number of plants}} \times$$

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และสรุปผลการทดลอง

นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ไปทดสอบความแปรปรวน (ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละตำรับทดลองตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) แล้วนำค่าที่ได้มาสรุปผลการทดลอง

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและแยกเชื้อราในดินจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค

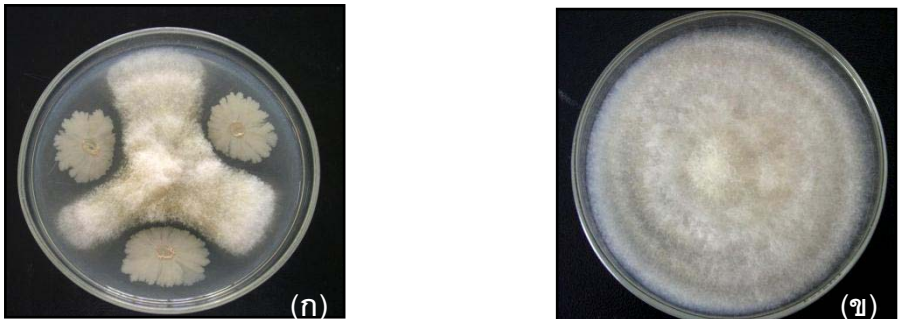
จากการเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อราในดินในแปลงผักของเกษตรกร ของพื้นที่จังหวัดสงขลา มาแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยวิธี tissue transplanting สามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้ทั้งหมด 40 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เชื้อราในดินที่แยกได้จากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคในแปลงเกษตรกร

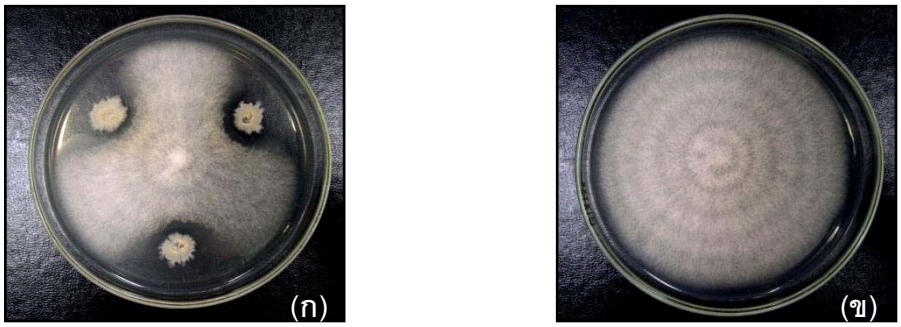
แหล่งพื้นที่แปลงเกษตรกร	ชนิดพืชปลูก	จำนวนสายพันธุ์	รหัสแปลง
บ้านแพรก อ. หาดใหญ่	คะน้า	3	PKT
จ. สงขลา	พริก	8	PPT
	ผักกาดขาว	2	PGT
	มะเขือ	6	PMT
	ผักชี	2	PCT
	กวางตุ้ง	4	PTT
	บร็อคโคลี	2	PBT
บ้านบางเหรียง อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	ต้นหอม	2	BHT
	ถั่วฝักยาว	2	BFT
	พริก	2	BKT
	แตงกวา	2	BLT
ต. ท่าข้าม อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา	คะน้า	2	SKT
ต. นาหว้า อ.จะนะ จ. สงขลา	คะน้า	2	CKT
	ผักกาดขาว	1	CGT
รวม		40	

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ในการควบคุมเชื้อราในดิน

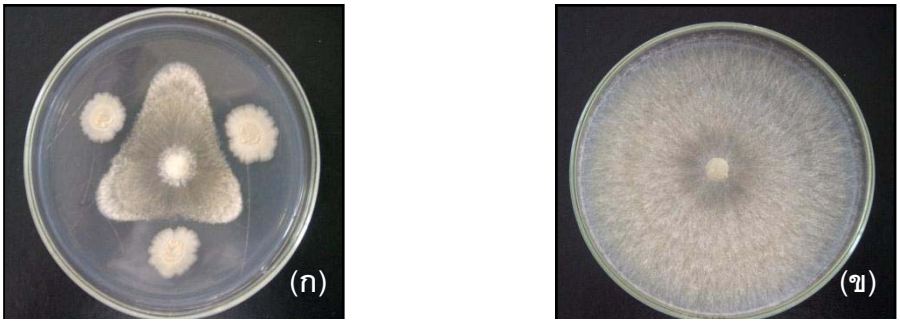
เมื่อนำ *B. megaterium* มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในดินพืชที่แยกได้จากข้อ 1 จำนวน 40 สายพันธุ์ ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA พบว่า *B. megaterium* สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 21 สายพันธุ์ (ตารางที่ 5) ซึ่งสามารถยับยั้งได้ดีโดยมีรัศมีวงใสมากกว่าหรือเท่ากับ 3.3 จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ เชื้อราสายพันธุ์ PPT1(3) (ภาพที่ 4) ที่แยกได้จากพริก (รัศมีวงใส 4.7 มม.) SKT1(1) (ภาพที่ 5) แยกได้จากคะน้า (รัศมีวงใส 4.3 มม.) PPT2(3) (ภาพที่ 6) แยกได้จากพริก (รัศมีวงใส 3.7 มม.) BFT1(2) (ภาพที่ 7) แยกได้จากถั่วฝักยาว และ PPT2(2) (ภาพที่ 8) แยกได้จากพริก (รัศมีวงใส 3.3 มม.) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อนำบริเวณที่ถูกยับยั้งของเส้นใยเชื้อรา PPT1 (3) ซึ่ง *B. megaterium* สามารถยับยั้งได้ดี ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา พบการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อราอย่างชัดเจน คือ มีลักษณะโป่งพองผนังสายราหนาขึ้น บริเวณส่วนปลายของสายราเป็นปุ่มปม (ภาพที่ 9)



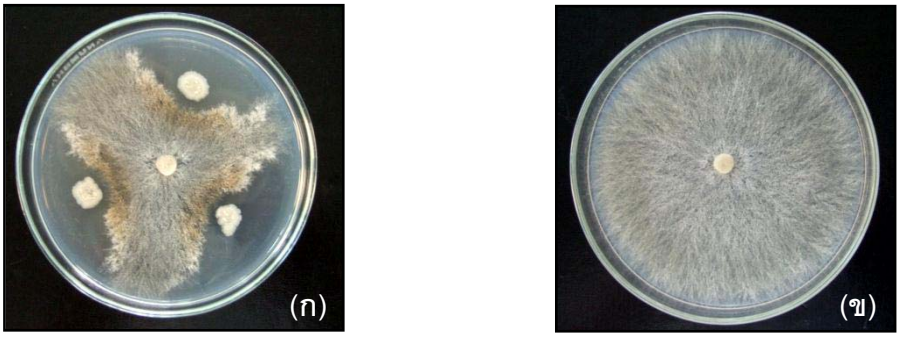
ภาพที่ 4 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT1(3) โดยเชื้อ *B. megaterium* (ก) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ข)



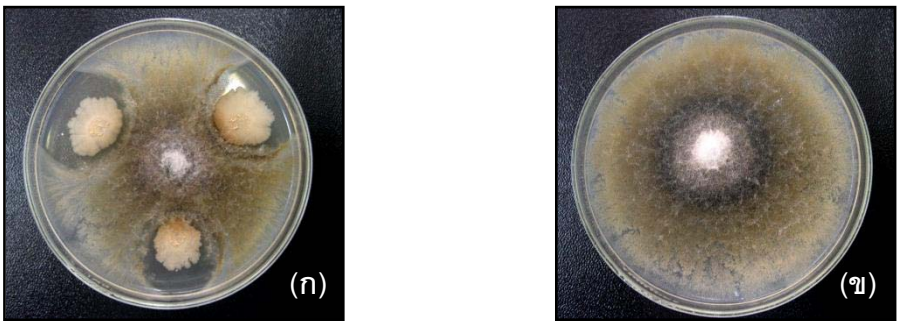
ภาพที่ 5 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ SKT1 (1) โดยเชื้อ *B. megaterium* (ก) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ข)



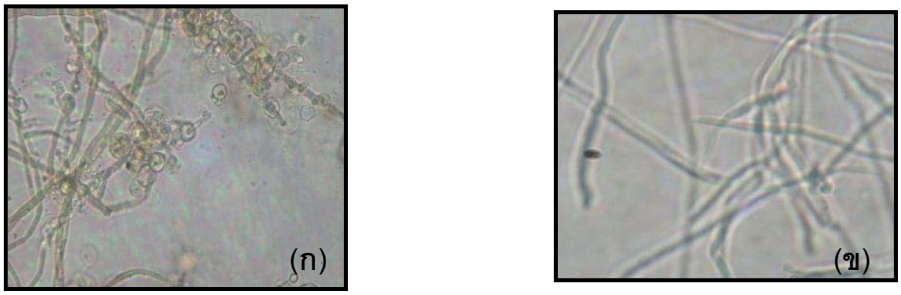
ภาพที่ 6 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT2 (3) โดยเชื้อ *B. megaterium* (ก) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ข)



ภาพที่ 7 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ BFT1 (2) โดยเชื้อ *B. megaterium* (ก) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ข)



ภาพที่ 8 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT2 (2) โดยเชื้อ *B. megaterium* (ก) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ข)



ภาพที่ 9 ลักษณะทางจุลสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT1 (3) ชุดทดสอบ (ก) และเส้นใยเชื้อราชุดควบคุม (ข) เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในดิน

สายพันธุ์เชื้อรา	รัศมีวงใส (มม.)
BKT1 (3)	2.7 cde
BFT1 (2)	3.3 bc
PPT1 (4)	1.3 fg
PMT2 (1)	1.2 gh
PTT3 (1)	1.2 gh
BKT1 (2)	1.3 fg
PTT3 (2)	3.2 bcd
PTT1 (2)	2.5 de
SKT1 (1)	4.3 a
PPT2 (2)	3.3 bc
RDT1 (1)	1.0 gh
PPT2 (3)	3.7 b
PPT2 (4)	2.8 cd
PPT1 (3)	4.7 a
CGT1 (1)	2.0 ef
PCT1 (1)	2.8 cd
PPT2 (1)	0.5 hi
PCT1 (2)	0.5 hi
CKT1 (1)	2.0 ef
PTT2 (1)	1.2 gh
PCT1 (2)	1.7 fg
Control	0.0 i
F- test	*
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	25.74

* แตกต่างทางสถิติที่ $p<0.05$

อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ในการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราในดิน

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จาก *B. megaterium* ต่อการยับยั้งเชื้อราในดินที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่าสารปฏิปักษ์ของ *B. megaterium* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT 2(3) PPT 1(3) BFT1 (2) PPT 2(3) PPT2(2) และ SKT1(1) ได้ดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 91.44 70.24 64.25 40.48 และ 35.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

อัตราส่วนระหว่างสารปฏิปักษ์ของ *B. megaterium* และอาหาร PDA double strength ที่ความเข้มข้น 1:1 1:5 และ 1:10 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคทุกสายพันธุ์ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 94.96 54.71 และ 31.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม (ตารางที่ 6) (ภาพที่ 10)

สารปฏิปักษ์ของ *B. megaterium* ที่ไม่ผ่านความร้อน (ชุดควบคุม) และผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 80 100 และ 121 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคทุกสายพันธุ์ได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 73.29 70.52 59.20 51.77 และ 47.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

จากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่าสารปฏิปักษ์ของ *B. megaterium* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคสายพันธุ์ PPT 2(3) ได้ดีที่สุด และความเข้มข้นของสารปฏิปักษ์ที่อัตราส่วน 1:1 สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด ส่วนสารปฏิปักษ์ที่ไม่ผ่านความร้อนสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีกว่าสารปฏิปักษ์ที่ผ่านความร้อน อย่างไรก็ตามสารปฏิปักษ์ที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสก็สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT 2(3) ได้ถึง 77.13 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของสารปฏิปักษ์อัตราส่วน 1:10 (ตารางที่ 6)

ชุดควบคุม (1:1) (1:5) (1:10)

ภาพที่ 10 ประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์ *B. megaterium* ที่ความเข้มข้นต่างๆ (สารปฏิปักษ์: PDA double strength) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT2 (3)

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพสารปฏิปักษ์ของเชื้อ *B. megaterium* ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในดิน

สายพันธุ์เชื้อรา (A)	การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา (เปอร์เซ็นต์)															Means (A)
	(B) 1:1					1:5					1:10					
	ชุดควบคุม	60	80	100	121	ชุดควบคุม	60	80	100	121	ชุดควบคุม	60	80	100	121	
BFT1(2)	99.73	99.46	95.27	93.8	94.58	92.37	91.56	61.00	43.16	43.04	75.68	71.20	2.84	0.00	0.00	64.25 c
PPT2(2)	97.86	96.41	89.79	88.8	84.69	53.56	51.61	38.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	40.48 d
SKT1(1)	95.84	95.84	89.79	87.9	87.90	43.16	36.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	35.77 e
PPT2(3)	99.81	99.62	99.24	99.2	99.24	95.27	94.58	93.19	90.74	88.85	87.90	84.69	82.300	79.78	77.13	91.44 a
PPT1(3)	97.42	96.98	96.98	95.2	92.37	82.30	78.45	78.45	62.57	43.16	78.78	61.00	61.00	29.18	0.00	70.24 b
Means (B)			94.96 a					54.71 b					31.63 c			
Means(C)	ชุดควบคุม	73.29 a														
	60	70.52 b														
	80	59.20 c														
	100	51.77 d														
	121	47.40 e														
F-test	**															
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	1.89															

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

อักษรเหมือนกันในแถวและคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

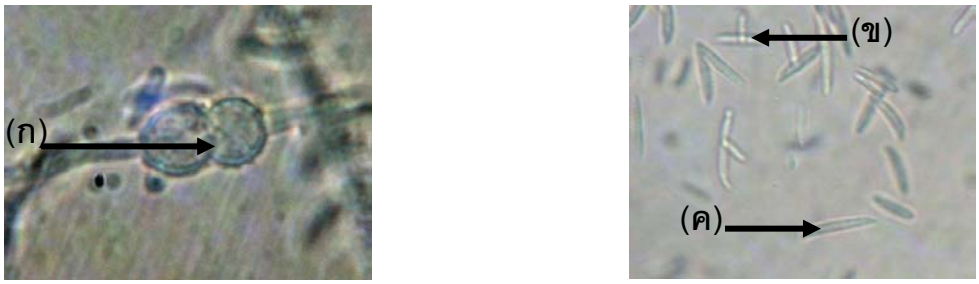
หมายเหตุ: (A) = สายพันธุ์เชื้อรา (เชื้อราในดิน)

(B) = อัตราส่วนของสารปฏิปักษ์ต่ออาหาร PDA (1:1, 1:5, 1:10)

(C) = สารปฏิปักษ์ที่เป็นชุดควบคุม (ไม่ผ่านความร้อน) และผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 80 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4. การพิสูจน์การเกิดโรคของเชื้อราในดินที่เชื้อ *B. megaterium* สามารถยับยั้งได้ดี

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากผลการทดลองที่ 3 จำนวน 2 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากพริก ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ PPT1 (3) และ PPT2 (3) มาจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยดูลักษณะของโคนิเดีย (conidia) โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) และลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนี เปรียบเทียบกับหนังสืออ้างอิงของ Booth (1971) จากนั้นนำมาทดสอบกับพริกเป็นเวลา 3 เดือน สังเกตลักษณะอาการของโรคที่เกิดกับต้นพริก จากการทดลองพบว่าเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่ทำให้พริกมีลักษณะอาการของลำต้นแคระแกรน ใบเหี่ยวจากใบล่างก่อน และมีอาการใบเหลือง อาการเหี่ยวจะเป็นไปอย่างช้าๆ ในช่วงแรกๆ เมื่ออาการรุนแรงมากขึ้นพืชจะตาย และพบว่าเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงแก่พืชมากที่สุด คือเชื้อรา *Fusarium* sp. สายพันธุ์ PPT2 (3) เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นเชื้อรา *F. oxysporum* (Booth, 1971) โดยมีการสร้างเส้นใยสีขาว ด้านหลังโคโลนีมีสีขาวอมชมพู โคโลนีจะสร้าง phialides ซึ่งเจริญจากด้านข้างของเส้นใย macroconidia มีรูปร่างเหมือนพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว microconidia มีรูปร่างเป็นวงรี มีการสร้าง chlamydospore จากส่วนปลายสุดหรือระหว่างกลางของเส้นใย ซึ่งลักษณะดังกล่าวเหมือนกับที่แยกได้ก่อนการพิสูจน์โรค (ภาพที่ 11, 12)



ภาพที่ 11 ลักษณะ chlamydospore (ก) microconidia (ข) และ macroconidia (ค) ของเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) (ก่อนการพิสูจน์โรค) เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 400 เท่า

ภาพที่ 12 ลักษณะ chlamydospore (ก) microconidia (ข) และ macroconidia (ค) ของเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) (หลังการพิสูจน์โรค) เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 400 เท่า

5. การเตรียมและการพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลบีดของเชื้อ *B. megaterium*

5.1 การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์ของเชื้อ *B. megaterium*

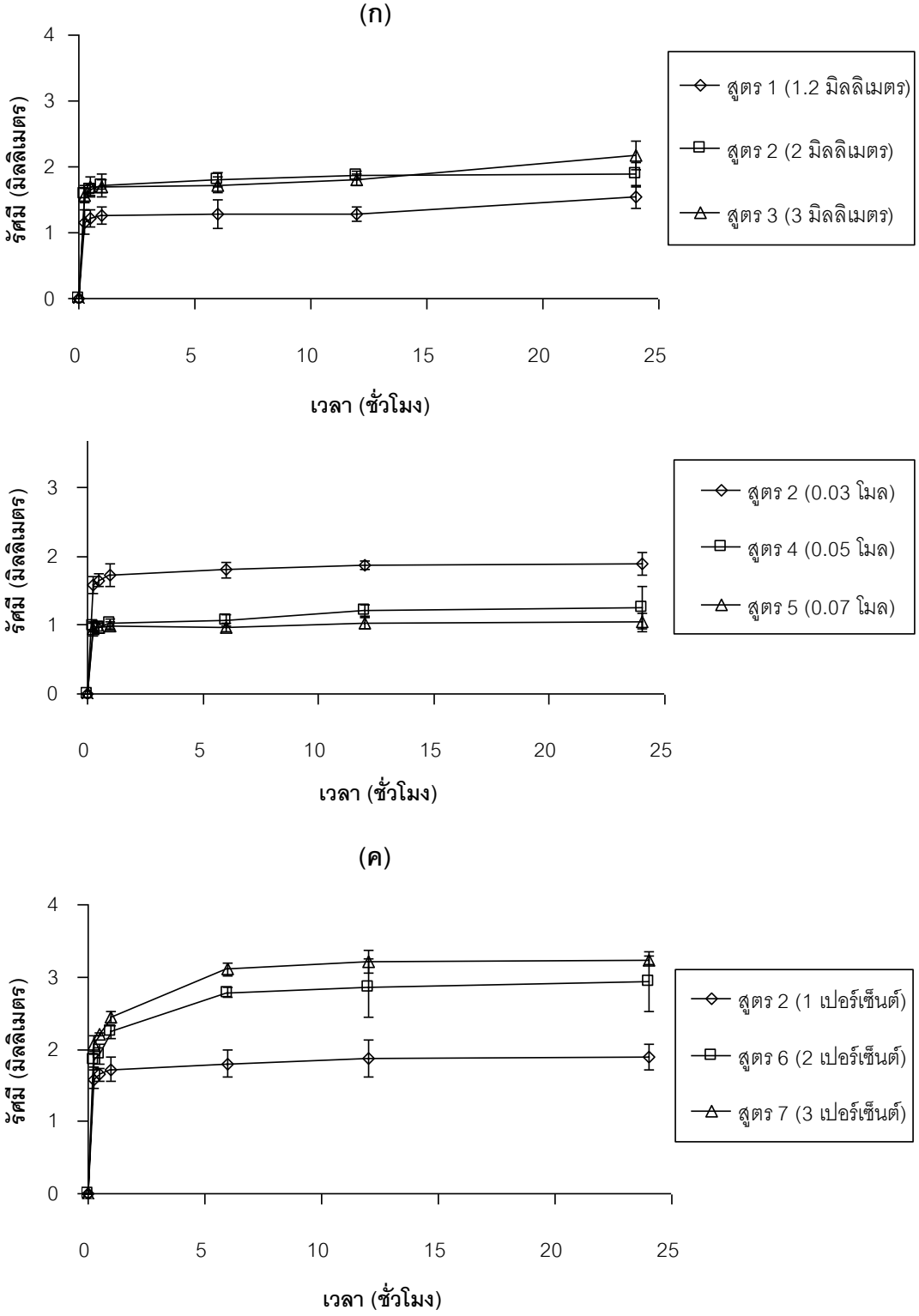
จากการเพาะเลี้ยงสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อเพิ่มจำนวนสปอร์ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA เพื่อให้ได้สปอร์เดี่ยวๆ แล้วทำการนับจำนวนสปอร์ด้วยวิธีการ drop plate บนอาหาร PCA พบว่าปริมาณเชื้อที่นับได้เท่ากับ 1.07×10^{13} cfu ต่อมิลลิลิตร

5.2 การเตรียมผลิตภัณฑ์เจลบีดของเชื้อ *B. megaterium*

การเตรียมผลิตภัณฑ์เจลบีดโดยกำหนดความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต แคลเซียมคลอไรด์ และขนาดเส้นผ่านศูนย์ปลายเข็ม พบว่าสามารถเตรียมผลิตภัณฑ์เจลบีดได้ทั้งหมด 7 สูตร (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของสารและขนาดเข็มที่ใช้เตรียมเจลบีด

สูตรที่	ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต (เปอร์เซ็นต์)	ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (โมล)	เส้นผ่านศูนย์กลางปลายเข็ม (มิลลิเมตร)
1	1	0.03	1.2
2	1	0.03	2
3	1	0.03	3
4	1	0.05	2
5	1	0.07	2
6	2	0.03	2
7	3	0.03	2



ภาพที่ 13 การพองตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดที่เวลาต่างๆ จากการกำหนดขนาดเข็ม (ก) ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (ข) และความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนต (ค)

6. ประเมินคุณสมบัติผลิตภัณฑ์เจลบีดของเชื้อ *B. megaterium*

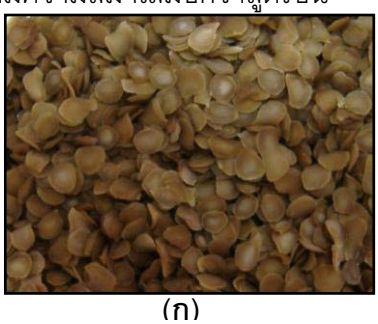
6.1 การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เจลบีด

จากการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เจลบีด โดยวัดการพองตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางของปลายเข็มขนาดต่างๆ คือ ขนาดเล็ก 1.2 มิลลิเมตร (สูตรที่ 1) ขนาดกลาง 2 มิลลิเมตร (สูตรที่ 2) และขนาดใหญ่ 3 มิลลิเมตร (สูตรที่ 3) พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไปผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 และ 3 มีการพองตัวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และพองตัวดีกว่าสูตรที่ 1 และที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสูตรที่ 3 มีการพองตัวดีกว่าสูตรที่ 2 และสูตรที่ 1 อย่างไรก็ตามการพองตัวเกิดขึ้นในระยะแรก หลังจากนั้นการพองตัวเริ่มคงที่ (ภาพที่ 13(ก))

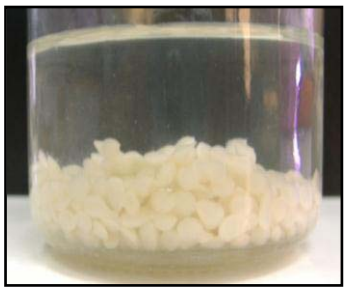
เมื่อเปรียบเทียบการใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน คือ ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.03 โมล (สูตรที่ 2) 0.05 โมล (สูตรที่ 4) และ 0.07 โมล (สูตรที่ 5) พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 มีการพองตัวดีกว่าสูตรที่ 4 และ 5 และการพองตัวเกิดขึ้นในระยะแรก หลังจากนั้นการพองตัวเริ่มคงที่ (ภาพที่ 13(ข))

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตมีผลต่อการพองตัวเป็นอย่างมาก โดยผลิตภัณฑ์เจลบีดที่เตรียมโดยใช้โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นสูง คือ 3 เปอร์เซ็นต์ (สูตรที่ 7) สามารถพองตัวได้เร็วและปริมาณการพองตัวมากกว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดที่เตรียมจากโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (สูตรที่ 6) และ 1 เปอร์เซ็นต์ (สูตรที่ 2) ตามลำดับ ซึ่งการพองตัวเกิดขึ้นในระยะแรก หลังจากนั้นการพองตัวเริ่มคงที่ (ภาพที่ 13(ค))

จากการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้ง 7 สูตร พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 ซึ่งใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.03 โมล และขนาดเข็ม 2 มิลลิเมตร มีการพองตัวดีที่สุด (ภาพที่ 14) และลักษณะของเม็ดบีดมีความสม่ำเสมอกว่าสูตรอื่น



(ก)



(ข)

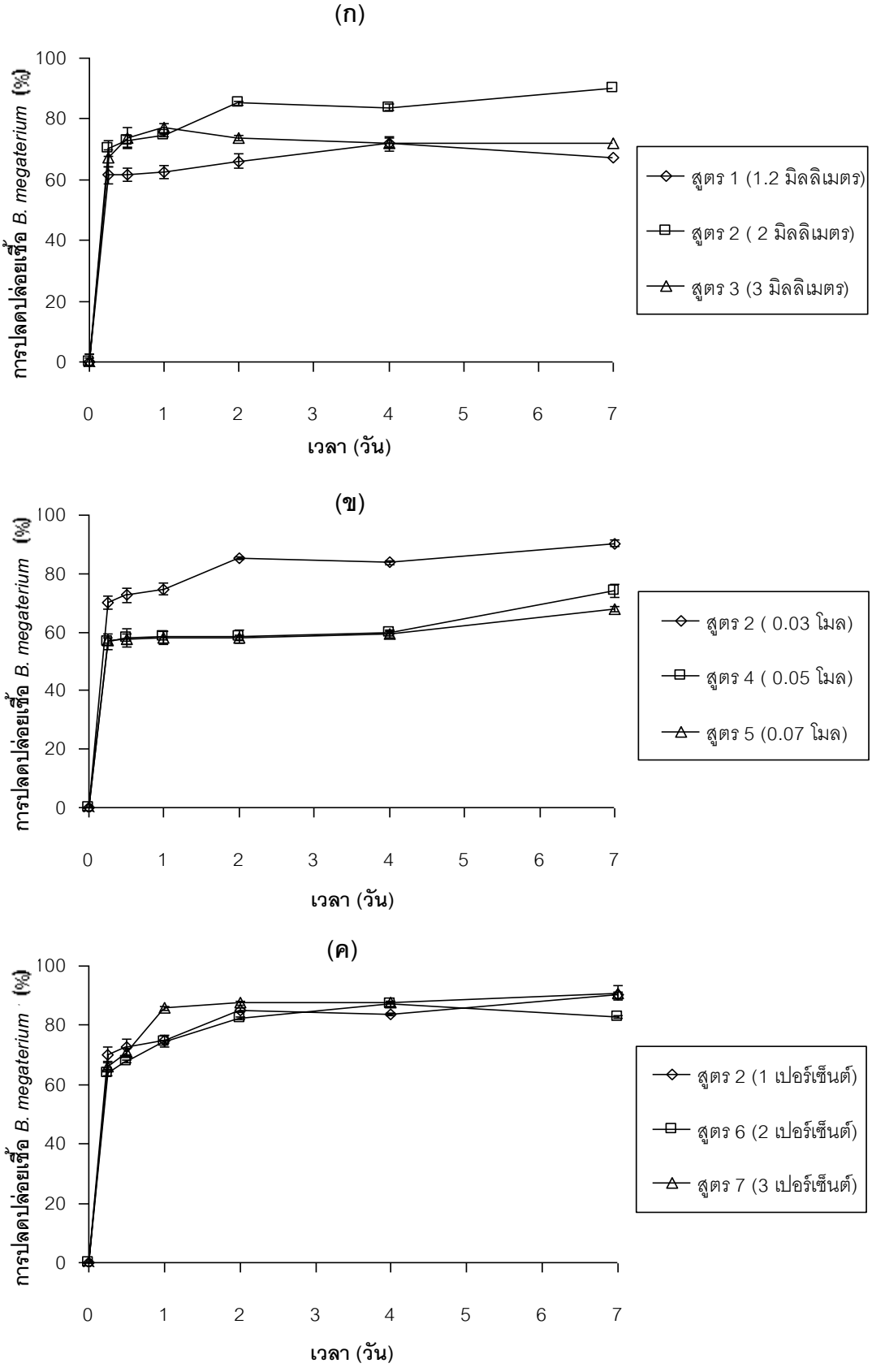
ภาพที่ 14 ลักษณะของผลิตภัณฑ์เจลบีดก่อน (ก) และหลัง (ข)พองตัวในน้ำ

6.2 การประเมินคุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์เจลบีด

6.2.1 การปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ของผลิตภัณฑ์เจลบีดในน้ำ

จากการศึกษาการปลดปล่อย *B. megaterium* ในน้ำ โดยการกำหนดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูเข็ม พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดทุกสูตรมีการปลดปล่อยเชื้อออกมา โดยสูตรที่ 2 มีปริมาณเชื้อที่ปลดปล่อยออกมาสูงสุดอย่างเห็นได้ชัด (>80 เปอร์เซ็นต์)ในช่วงวันที่ 2-7 ซึ่งสูงกว่าสูตรที่ 3 และ สูตรที่ 1 ตามลำดับ และสูตรที่ 1 พบว่ามีปริมาณเชื้อที่ปลดปล่อยออกมาในทุกช่วงเวลาต่ำกว่าสูตรที่ 2 และ สูตรที่ 3 (ภาพที่ 15 (ก)) และจากการกำหนดความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดทุกสูตรมีการปลดปล่อยเชื้อเกิดขึ้น โดยสูตรที่ 2 มีการปลดปล่อยเชื้อออกมาในทุกช่วงเวลามากกว่าสูตรที่ 4 และสูตรที่ 5 ตามลำดับ (ภาพที่ 15 (ข)) และเมื่อกำหนดความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดทุกสูตรมีการปลดปล่อยเชื้อเกิดขึ้น ปริมาณการปลดปล่อยเชื้อออกมาจากผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้ง 3 สูตร คือ สูตรที่ 2 6 และ 7 มีค่าใกล้เคียงกันและค่อนข้างคงที่ที่เวลา 2-7 วัน โดยมีปริมาณการปลดปล่อยเชื้อสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15 (ค))

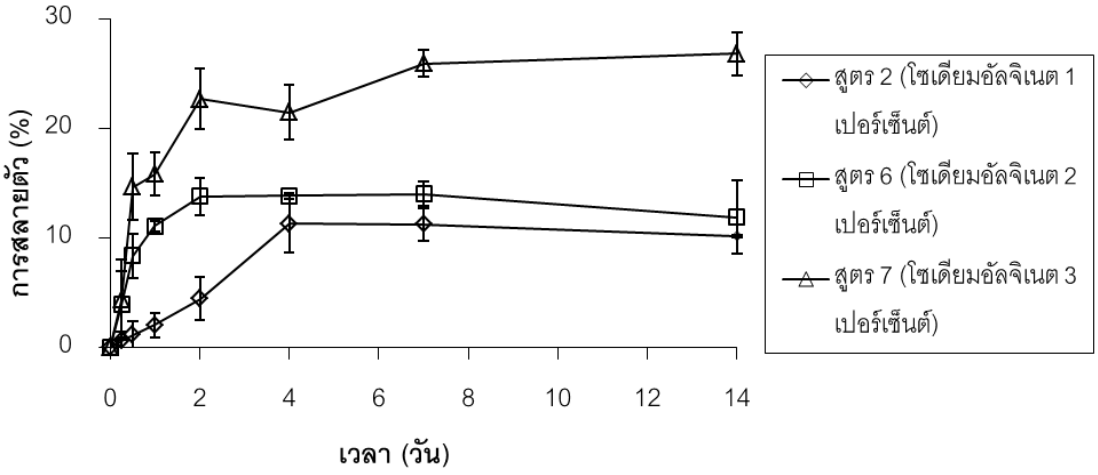
จากการศึกษาข้างต้น พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 6 และ 7 มีการปลดปล่อยเชื้อออกมาที่เวลาต่างๆได้ดีกว่าสูตรอื่นๆ โดยหลังจาก 1 วันแล้วยังมีการปลดปล่อยเชื้อเพิ่มเติมและปริมาณเชื้อที่ปลดปล่อยสูงสุดปริมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สูตรอื่นมีปริมาณเชื้อที่ปลดปล่อยออกมาเพียง 60-65 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น จึงทำการคัดเลือกผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 6 และ 7 มาทดสอบในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 15 การปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำทีเวลาต่างๆ จากการกำหนดขนาดเข็ม (ก) ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (ข) และความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนต (ค)

6.2.2 การสลายตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดในน้ำ

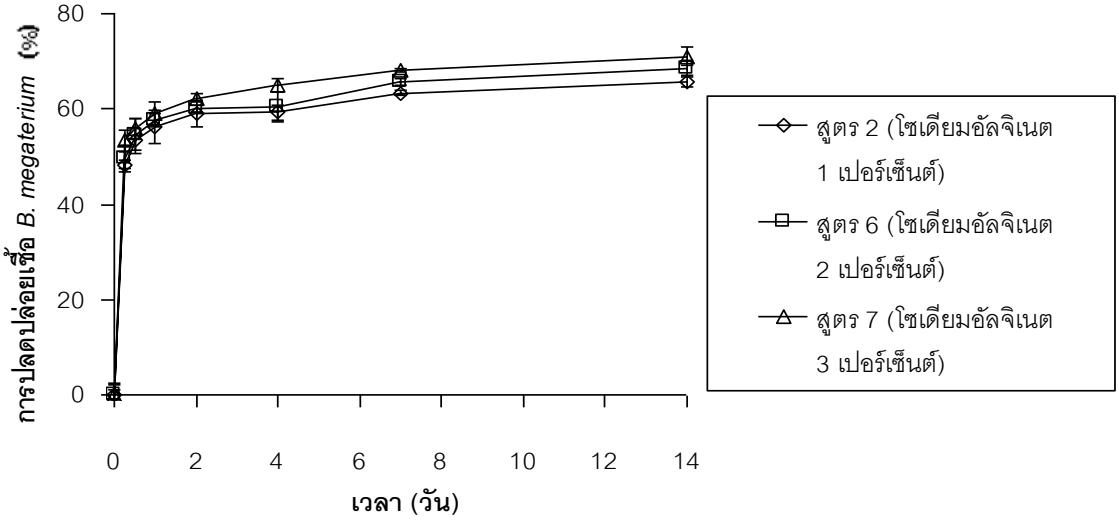
จากการศึกษาการสลายตัวในน้ำของผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้งสูตรที่ 2, 6 และ 7 พบว่า ผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้ง 3 สูตรสามารถสลายตัวในน้ำได้ โดยสูตรที่ 7 มีการสลายตัวดีกว่าสูตรที่ 6 และ 2 ตามลำดับ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การสลายตัวสูงถึง 26.83 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 14 วัน (ภาพที่ 16)



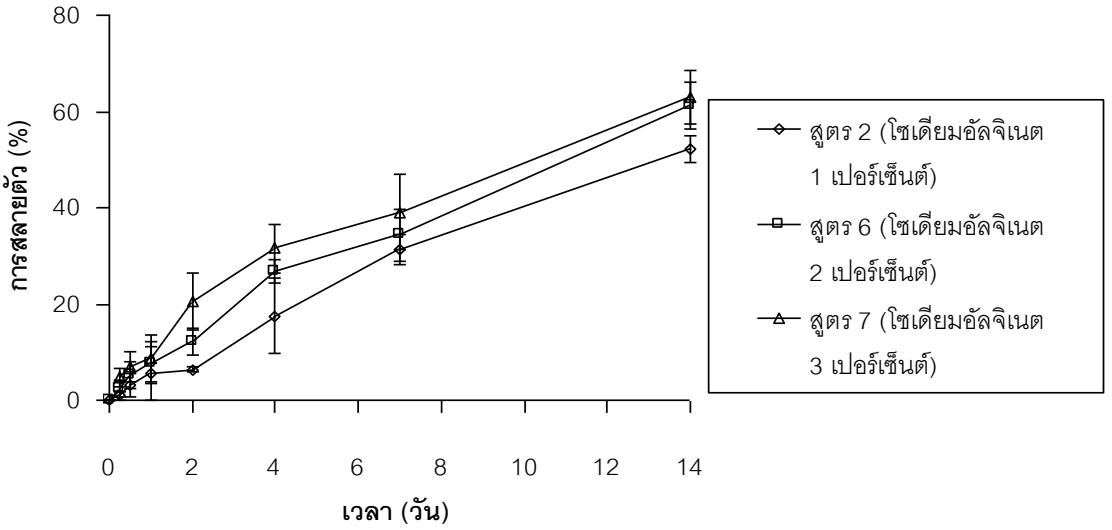
ภาพที่ 16 การสลายตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดในน้ำที่เวลาต่างๆ

6.2.3 การสลายตัวและการปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดในดิน

เมื่อศึกษาการปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ในดินที่ความจุความชื้นภาคสนามของผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 6 และ 7 พบว่า ผลิตภัณฑ์เจลบีดทุกสูตรมีการปลดปล่อยเชื้อในดินเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยสูตรที่ 7 มีปริมาณเชื้อปลดปล่อยออกมาที่เวลา 14 วันมากที่สุด คือ 71.04 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ สูตรที่ 6 และ 2 โดยมีปริมาณเชื้อปลดปล่อยอออกมาเท่ากับ 68.56 และ 65.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 17) สำหรับการศึกษาการสลายตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีด พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้ง 3 สูตรมีการสลายตัวเกิดขึ้นในช่วงแรก และเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน โดยสูตรที่ 7 มีการสลายตัวดีกว่าสูตรที่ 6 และ 2 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การสลายตัวเท่ากับ 62.93 61.02 และ 52.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 18) ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 6 และ 7 มีคุณสมบัติที่เหมาะสมใกล้เคียงกัน จากนั้นทำการคัดเลือกผลิตภัณฑ์เจลบีดที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดมาจำนวน 2 สูตร เพื่อนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป



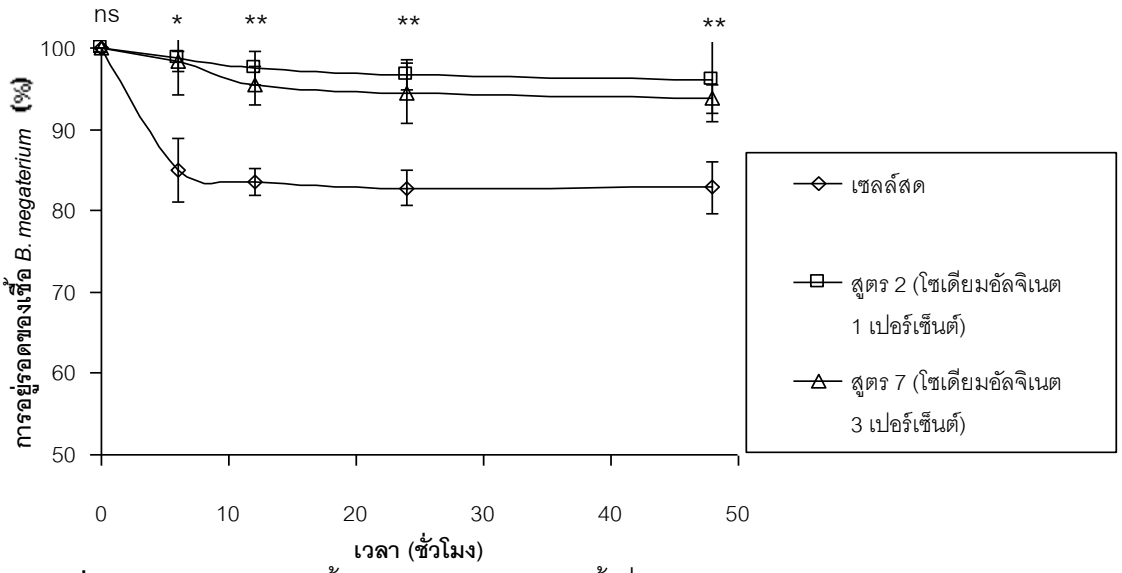
ภาพที่ 17 การปลดปล่อยเชื้อ B. megaterium ในดินที่เวลาต่างๆ



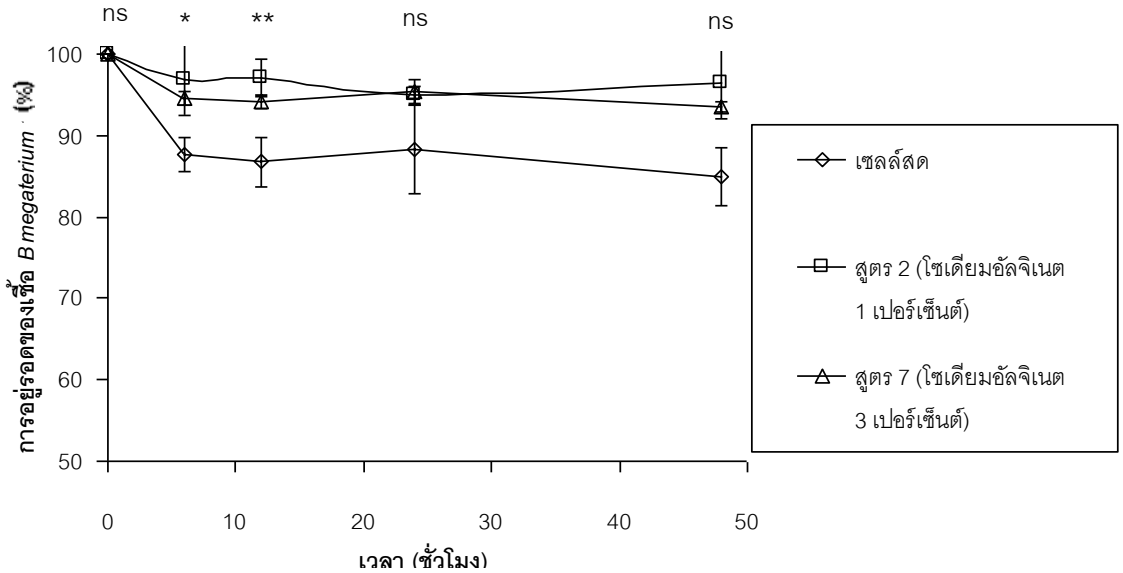
ภาพที่ 18 การสลายตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดในดินที่เวลาต่างๆ

6.2.4 ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีด

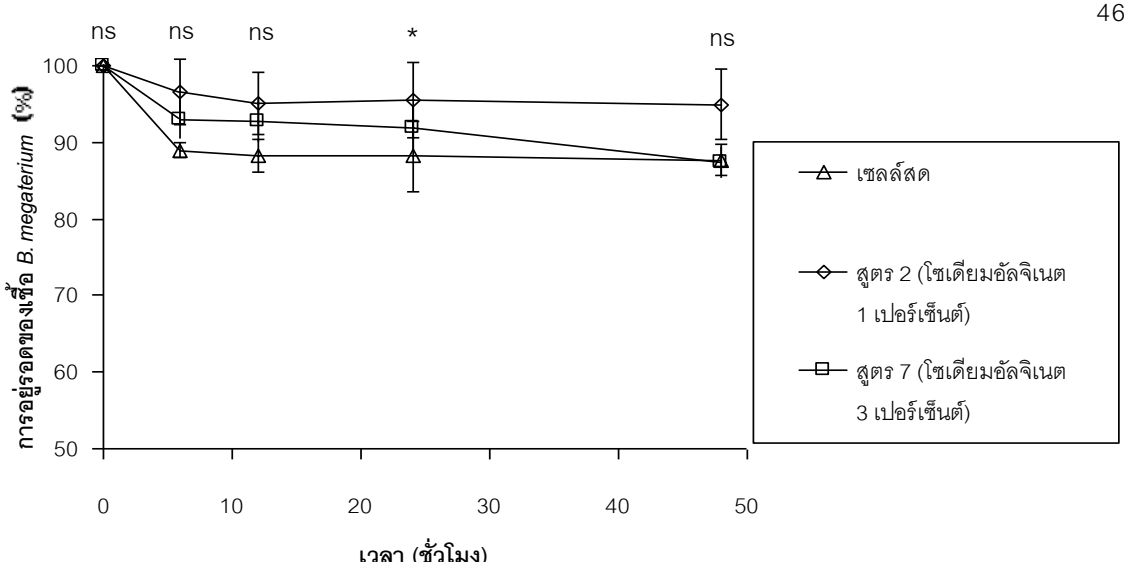
จากการศึกษาปริมาณการอยู่รอดของ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้งสูตรที่ 2 และ 7 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4-7 มีปริมาณการอยู่รอดของเชื้อสูงใกล้เคียงกัน (>90 เปอร์เซ็นต์) และสูงกว่าเซลล์สด (ภาพที่ 19-22) ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 มีปริมาณการอยู่รอดของเชื้อลดลงเล็กน้อยแต่ยังคงมีเชื้ออยู่รอดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเซลล์สด พบว่าปริมาณการอยู่รอดของเชื้อต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมง จากการทดลองจึงนำผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้ง 2 สูตร ไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 23)



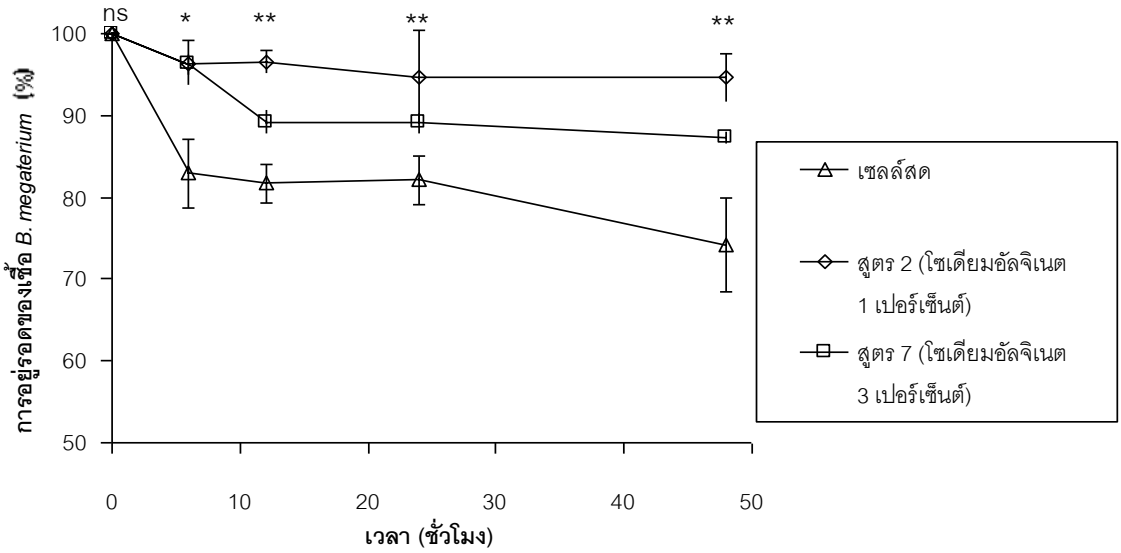
ภาพที่ 19 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4



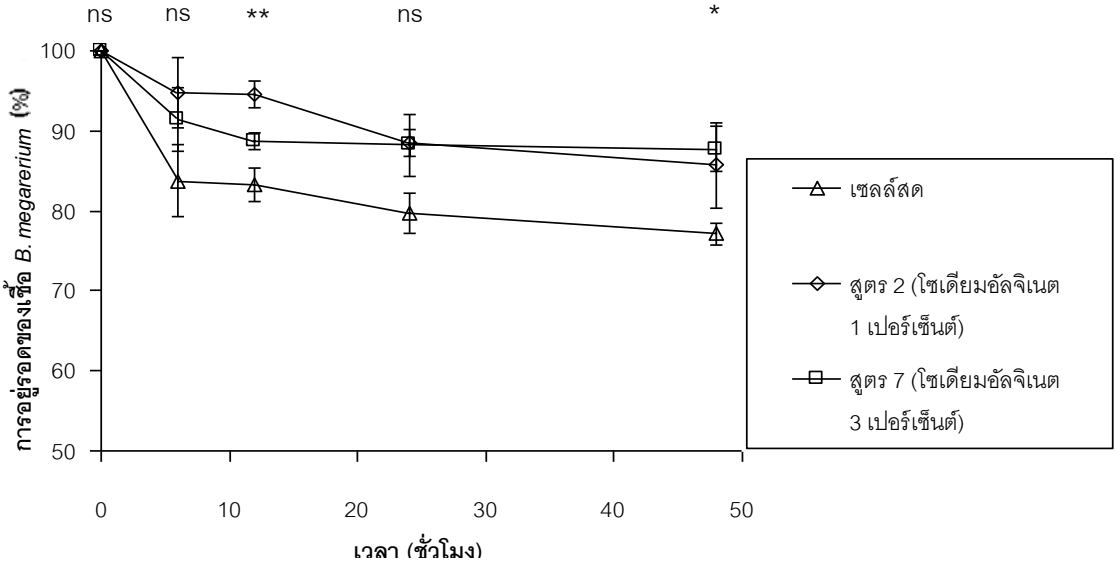
ภาพที่ 20 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5



ภาพที่ 21 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6



ภาพที่ 22 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7



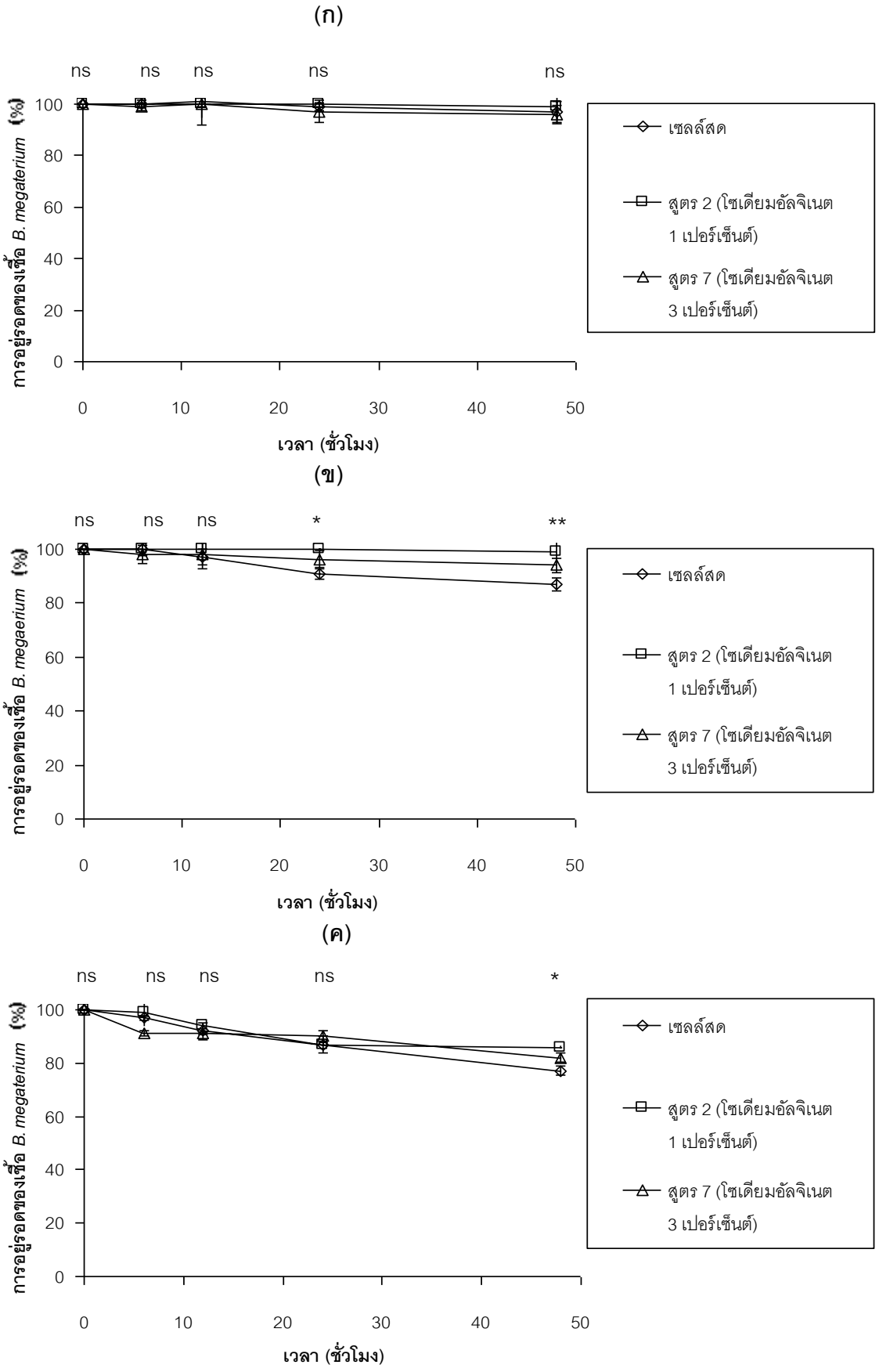
ภาพที่ 23 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8

6.2.5 ผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีด

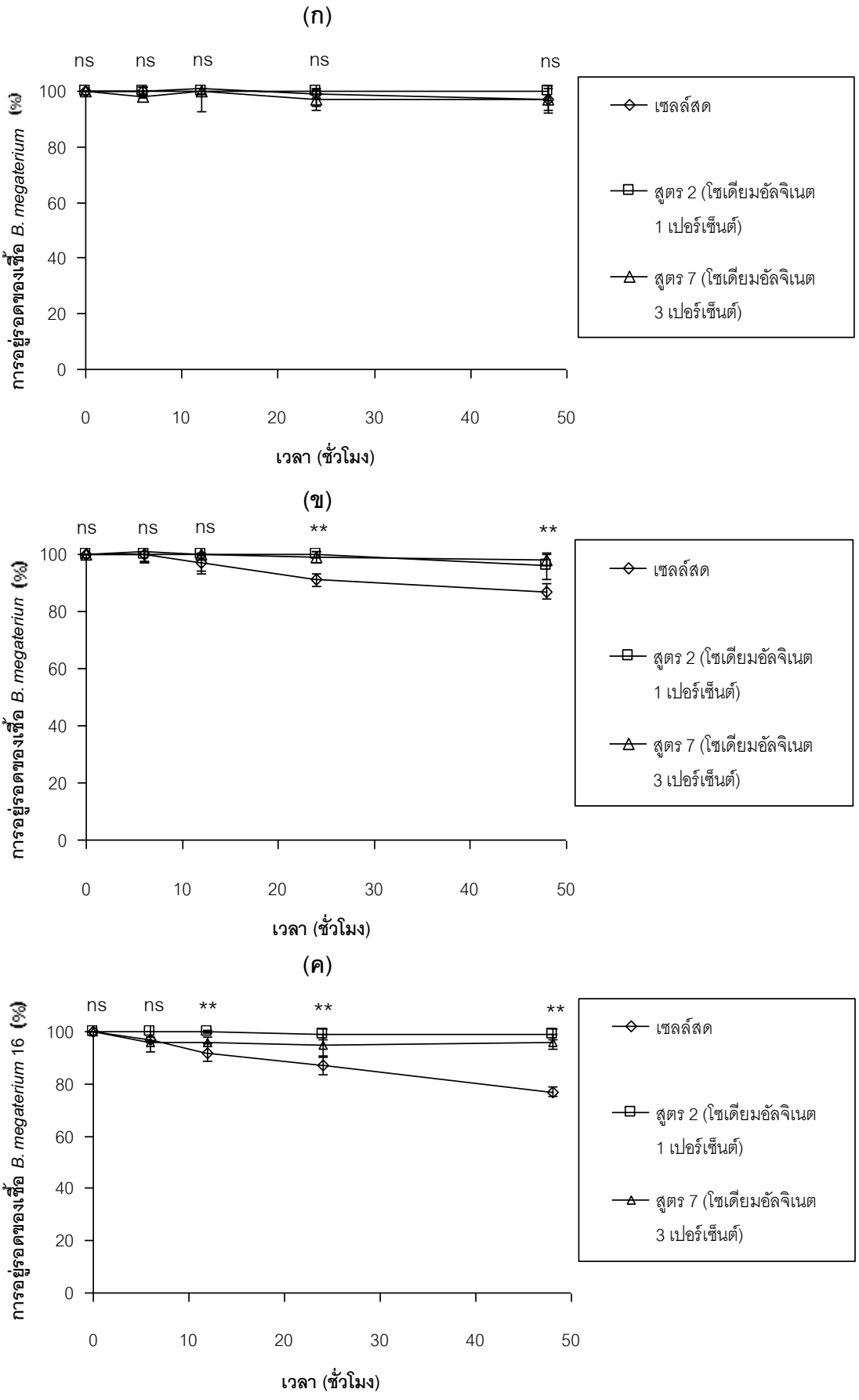
จากการศึกษาการอยู่รอดของ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดเมื่อกระจายตัวในน้ำที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณการอยู่รอดของเชื้อในสูตรที่ 2 และ 7 ไม่แตกต่างจากเซลล์สด โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 24 (ก)) ส่วนที่อุณหภูมิ 37 (ภาพที่ 24 (ข)) และ 50 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 24 (ค)) พบว่าปริมาณการอยู่รอดของเชื้อในสูตรที่ 2 และสูตรที่ 7 สูงกว่าเซลล์สด โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

เมื่อศึกษาการอยู่รอดของ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดในรูปบีดแห้งที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณการอยู่รอดของเชื้อในสูตรที่ 2 และ 7 ไม่แตกต่างจากเซลล์สด (ภาพที่ 25 (ก)) ส่วนอุณหภูมิ 37 (ภาพที่ 25 (ข)) และ 50 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 25 (ค)) มีปริมาณการอยู่รอดของเชื้อในสูตรที่ 2 และ 7 สูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าเซลล์สด

ปริมาณการอยู่รอดของ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้งสองสูตรมีค่าใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณการอยู่รอดของ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดที่อยู่ในรูปบีดแห้งสูงกว่าที่กระจายตัวในน้ำ โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 24 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิต่างๆ (25 องศาเซลเซียส (ก) 37 องศาเซลเซียส (ข) 50 องศาเซลเซียส (ค)) เมื่อกระจายตัวในน้ำ



ภาพที่ 25 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิต่างๆ (25 องศาเซลเซียส (ก) 37 องศาเซลเซียส (ข) 50 องศาเซลเซียส (ค)) ที่อยู่ในรูปบีดแห้ง

6.2.6 ผลของรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ต่อการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีด

เมื่อนำผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 และ 7 ในรูปบีดแห้งและรูปที่นำมากระจายตัวในน้ำ มาวางไว้ภายใต้หลอดอัลตราไวโอเลตที่ความเข้มแสง 20 วัตต์ พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 และ 7 ในรูปที่นำมากระจายตัวในน้ำมีปริมาณเชื้อ *B. megaterium* ลดลง โดยที่เวลา 6 ชั่วโมงปริมาณเชื้อในสูตรที่ 2 และ 7 ลดลงเหลือ $1.8\pm4.6\times10^{9}$ และ $6.3\pm2.5\times10^{8}$ cfu ต่อกรัม ตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อในสูตรที่ 2 และ 7 ลดลงเหลือ $4.0\pm2.3\times10^{8}$ และ $8.6\pm2.0\times10^{6}$ cfu ต่อกรัม ตามลำดับ สำหรับผลิตภัณฑ์เจลบีดในรูปบีดแห้ง พบว่ามีปริมาณ *B. megaterium* ลดลงเล็กน้อย โดยเวลา 6 ชั่วโมงปริมาณเชื้อในสูตรที่ 2 และ 7 ลดลงเหลือ $8.4\pm2.8\times10^{15}$ และ $6.2\pm4.5\times10^{15}$ cfu ต่อกรัม ตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมง ยังคงมีปริมาณเชื้ออยู่รอดสูงถึง $2.0\pm4.8\times10^{15}$ และ $1.4\pm5.1\times10^{15}$cfu ต่อกรัม ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์สดเมื่อวางไว้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพียง 6 ชั่วโมง ไม่พบเชื้อเหลือรอดอยู่เลย นอกจากนี้พบว่าปริมาณ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้งสูตรที่ 2 และ 7 มีค่าใกล้เคียงกัน โดยที่ปริมาณการอยู่รอดของเชื้อในผลิตภัณฑ์เจลบีดรูปบีดแห้งสูงกว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดที่กระจายตัวในน้ำ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลของแสงอัลตราไวโอเลตต่อการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่เวลาต่างๆ

เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ *B. megaterium* (cfu ต่อกรัม)				
	กระจายตัวในน้ำ		รูปบีดแห้ง		เซลล์สด
	สูตรที่ 2	สูตรที่ 7	สูตรที่ 2	สูตรที่ 7	
เริ่มต้น	$1.1\pm2.3\times10^{16}$	$2.2\pm4.4\times10^{15}$	$1.1\pm2.3\times10^{16}$	$2.2\pm4.4\times10^{15}$	$1.2\pm1.7\times10^{13}$
6	$1.8\pm4.6\times10^{9}$	$6.3\pm2.5\times10^{8}$	$8.4\pm2.8\times10^{15}$	$6.2\pm4.5\times10^{15}$	0
12	$9.5\pm4.3\times10^{8}$	$3.7\pm1.7\times10^{8}$	$1.0\pm2.3\times10^{16}$	$3.5\pm5.0\times10^{15}$	0
24	$6.1\pm3.5\times10^{8}$	$1.0\pm2.9\times10^{8}$	$3.8\pm4.2\times10^{15}$	$2.9\pm4.6\times10^{15}$	0
48	$4.0\pm2.3\times10^{8}$	$8.6\pm2.0\times10^{6}$	$2.0\pm4.8\times10^{15}$	$1.4\pm5.1\times10^{15}$	0

7. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. megaterium* ที่ปลดปล่อยออกมาจากผลิตภัณฑ์เจลบีด เพื่อยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยนำสารละลายดินมาทำการ pour plate ด้วยอาหาร PDA พบว่า *B. megaterium* ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 และ 7 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* PPT 2(3) และ *Fusarium* sp. PPT 1(3) ได้ดี และที่เวลา 28 วัน พบว่า *B. megaterium* ที่ปลดปล่อยออกมาจากผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้งสูตรที่ 2 และ 7 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* PPT 2(3) (85.63 และ 88.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) สูงกว่าเชื้อรา *Fusarium* sp. PPT1 (3) (72.30 และ 69.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) นอกจากนี้พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* PPT 2(3) ได้ดีกว่าผลิตภัณฑ์ เจลบีดสูตรที่ 2 ในทุกช่วงเวลา (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* PPT 1(3) และ *F. oxysporum* PPT 2(3) บน PDA ที่ผสมสารละลายดินที่ได้จากการปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ของผลิตภัณฑ์เจลบีด

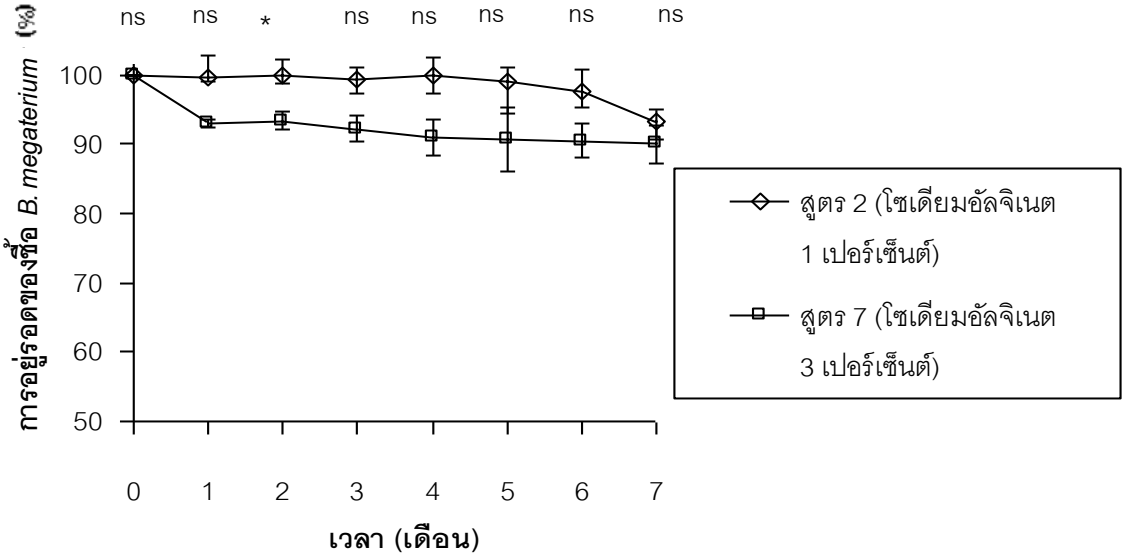
เวลา (วัน)	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (เปอร์เซ็นต์)			
	Fusarium sp. PPT 1(3)		*F. oxysporum* PPT 2(3)	
	สูตรที่ 2	สูตรที่ 7	สูตรที่ 2	สูตรที่ 7
0.25	83.90 c	86.82 e	88.76 b	89.33 de
0.5	86.21 c	88.66 de	89.81 b	91.18 cd
1	90.32 b	89.81 cd	90.76 b	92.41 c
2	91.21 b	91.65 bc	94.65 a	95.30 b
4	95.37 a	93.64 ab	95.62 a	95.65 ab
7	95.97 a	94.65 a	96.49 a	97.65 a
14	96.21 a	95.06 a	95.58 a	97.27 ab
28	72.30 d	69.95 f	85.63 c	88.21 e
control	0.00 e	0.00 g	0.00 d	0.00 f
F-test	*	*	*	*
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	2.15	2.00	1.20	1.35

* แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

อักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

8. การตรวจนับปริมาณเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

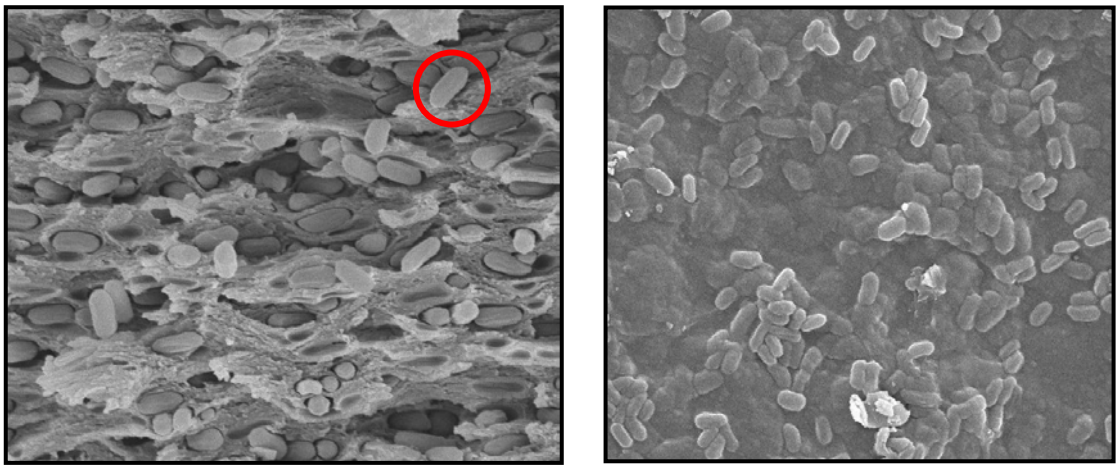
เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 และ 7 ไว้ในถุงพลาสติกใสและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 เดือน และทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ *B. megaterium* ทุกเดือน พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้ง 2 สูตร มีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่าสูตรที่ 7 มีปริมาณการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นปริมาณเชื้อเริ่มคงที่ ในขณะที่ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 มีปริมาณการอยู่รอดของเชื้อคงที่ในช่วงแรก หลังจากนั้นปริมาณเชื้อมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

หลังจากประเมินคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เจลบีดและทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 มีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่สุด โดยมีลักษณะเม็ดบีดที่สม่ำเสมอ มีการพองตัวและสลายตัวที่เหมาะสม ทนสภาพความเป็นกรด-ด่างได้ดี มีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดในผลิตภัณฑ์เจลบีดสูงเมื่อวางไว้ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* PPT 2(3) ได้ดี นอกจากนี้เมื่อนำเม็ดเจลบีดมาตัดตามขวางไปส่องด้วยกล้องอิเล็คตรอนแบบส่องกราด พบว่ามีสปอร์ของเชื้อ

B. megaterium จำนวนมากอยู่ภายในเม็ดเจลบีด (ภาพที่ 27) ดังนั้นจึงคัดเลือกผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในสภาพเรือนทดลองต่อไป



(ก) **(ข)**

ภาพที่ 27 ลักษณะภาพตัดขวางของผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 จากกล้องจุลทรรศน์แบบ SEM (5 µm) กำลังขยาย 5,000 เท่า (ก) และ ลักษณะพื้นผิวของผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 จากกล้องจุลทรรศน์ แบบ SEM (10 µm) กำลังขยาย 2,500 เท่า(ข)

9. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพเรือนทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 เปรียบเทียบกับการใช้สารฆ่าเชื้อราเบนโนมิล ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* PPT 2(3) (ภาพที่ 28) ทั้งในรูปสปอร์และเส้นใย โดยทดสอบกับพริกชี้ฟ้าที่ปลูกในสภาพเรือนทดลอง และบันทึกผลโดยการชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของแต่ละกรรมวิธีการทดลองให้ผลแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรรมวิธีที่มีการใช้สารฆ่าเชื้อราเบนโนมิลและใส่เชื้อราทั้งที่อยู่ในรูปสปอร์และเส้นใยให้ผลในการควบคุมโรคดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำสุด (20.0 และ 15.0 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 และใส่เชื้อราทั้งที่อยู่ในรูปสปอร์

และเส้นใย (30.3 และ 23.3 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญสำหรับกรรมวิธีที่ใส่เชื้อราในรูปสปอร์เพียงอย่างเดียว พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงสุด (63.3 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น รองลงมา คือกรรมวิธีที่ใส่เชื้อราในรูปเส้นใยเพียงอย่างเดียว (46.7 เปอร์เซ็นต์)

ผลของปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต่อต้น เมื่อเปรียบเทียบกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อด้วยเส้นใย พบว่าปริมาณของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของผลผลิตในแต่ละกรรมวิธีมีค่าแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรรมวิธีที่ใส่สารฆ่าเชื้อราเบนโนมิลและใส่เส้นใยเชื้อราให้ปริมาณผลผลิตของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากที่สุด คือ 51.9 และ 9.2 กรัมต่อต้น ตามลำดับ รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์เจลบีดและใส่เส้นใยเชื้อรา (38.8 และ 5.3 กรัมต่อต้น) ส่วนกรรมวิธีที่ใส่เส้นใยเชื้อราเพียงอย่างเดียวมีปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด (20.1 และ 2.2 กรัมต่อต้น)

ผลของปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต่อต้น เมื่อเปรียบเทียบกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์ พบว่าปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของผลผลิตในแต่ละกรรมวิธีมีค่าแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรรมวิธีที่ใส่สารฆ่าเชื้อราเบนโนมิลและใส่สปอร์เชื้อรา ให้ปริมาณผลผลิตของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากที่สุด คือ 45.9 กรัมต่อต้น และ 7.1 กรัมต่อต้น รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์เจลบีดและใส่สปอร์เชื้อรา (33.0 และ 3.9 กรัมต่อต้น) ส่วนกรรมวิธีที่ใส่สปอร์เชื้อราเพียงอย่างเดียวมีปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด (13.8 และ 1.9 กรัมต่อต้น) (ตารางที่ 10)

(ก) **(ข)** **(ค)**

ภาพที่ 28 ลักษณะอาการโรคเหี่ยวตายทั้งต้น (ก) และ เหี่ยวเหลือง (ข) ของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) ต้นปกติของพริก (ค)

ตารางที่ 10 ผลของผลิตภัณฑ์เจลบีดต่อน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเหี่ยวของพริกในสภาพเรือนทดลอง

วิธีการทดลอง	เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค	น้ำหนักสดของต้นและใบ (กรัม/ต้น)	น้ำหนักแห้งของต้นและใบ (กรัม/ต้น)
1. ปลูกพริกในดินปกติ	0.0 d	23.7 bc	2.6 c
2. ปลูกพริกในดินที่ใส่เชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) ในรูปเส้นใย	46.7 ab	20.1 bc	2.2 c
3. ปลูกพริกในดินที่ใส่เชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) ในรูปสปอร์	63.3 a	13.8 c	1.9 c
4. ปลูกพริกในดินที่ใส่ผลิตภัณฑ์เจลบีด และเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) ในรูปเส้นใย	23.3 c	38.8 ab	5.3 bc
5. ปลูกพริกในดินที่ใส่ผลิตภัณฑ์เจลบีด และเชื้อรา *F. oxysporum* PPT 2(3) ในรูปสปอร์	30.0 cb	33.0 abc	3.9 bc
6. ปลูกพริกในดินที่ใส่สารฆ่าราเบนโนมิล และเชื้อรา *F. oxysporum* PPT 2(3) ในรูปเส้นใย	15.0 cd	51.9 a	9.2 a
7. ปลูกพริกในดินที่ใส่สารฆ่าราเบนโนมิล และเชื้อรา *F. oxysporum* PPT 2(3) ในรูปสปอร์	20.0 cd	45.9 a	7.1 ab
F-test	*	*	*
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	36.2	32.9	38.8

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

งานทดลองนี้เป็นการนำเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ 16 ที่แยกได้จากดินในนาข้าว จังหวัดสตูล (Kanjanamaneesathian *et al*., 1998) ซึ่งก่อนหน้านี้มีการทดลองว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ดี จึงได้นำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในดินที่สำคัญชนิดอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดความรุนแรงกับพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจและเพื่อให้การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น จึงมีการพัฒนาเชื้อ *B. megaterium* เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเจลบีด เพื่อนำส่งเชื้อ *B. megaterium* ไปสู่การยับยั้งเชื้อราในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และไม่เป็นโทษกับเกษตรกรผู้ใช้ ผู้บริโภค และไม่เป็นพิษต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังสามารถนำไปใช้ได้ง่าย ไม่เกิดการฟุ้งกระจาย โดยมีขั้นตอนการศึกษาเริ่มจากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคในดิน และทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคที่คัดแยกได้ จากนั้นนำเชื้อราสาเหตุโรคที่เชื้อ *B. megaterium* สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดไปพิสูจน์การเกิดโรค เพื่อหาสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด และนำไปจำแนกชนิดของเชื้อรา จากนั้นทำการพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลบีดของเชื้อ *B. megaterium* โดยศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เจลบีด ได้แก่ การพองตัว ความยากง่ายในการเตรียมผลิตภัณฑ์ ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพ ได้แก่ การปลดปล่อยเชื้อ การสลายตัว ศึกษาผลของอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ รังสีอัลตราไวโอเลตต่อการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีด เพื่อคัดเลือกผลิตภัณฑ์เจลบีดที่ดีที่สุด สำหรับนำไปทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เจลบีดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ และในเรือนทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและคัดแยกเชื้อราเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งของเชื้อ *B. megaterium*

จากการเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อราในดิน ในแปลงปลูกผักของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดสงขลา พบอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อราในดิน ได้แก่ โรคเน่าคอดิน (damping-off) โรครากเน่า (root rot) โรคเหี่ยว (wilt) โรคโคนเน่า (collar rot,crown rot) โรคกล้าไหม้ (seedling blight) ซึ่งโรคพืชเหล่านี้มักเกิดจากเชื้อราก่อโรคในดินที่สำคัญในประเทศไทย คือ เชื้อรา *Fusarium* spp. *Pythium* spp. *Sclerotium* spp. *Phytopthora* spp. และ *Rhizoctonia* spp. (สืบศักดิ์, 2540; บัญญัติ, 2534) จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาแยกเชื้อ พบว่าสามารถแยกเชื้อราในดินได้ทั้งหมด 40 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4) และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งโดยเชื้อ *B. megaterium* พบว่า *B. megaterium* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ทั้งหมด 21 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่า *B. megaterium* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในดินได้หลายสายพันธุ์ (ตารางที่ 5) มีรายงานการนำเชื้อ *B. megaterium* มายับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในพืชได้อีกหลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา *R. solani* ในข้าว (Pengnoo *et al*., 2000; Chumthong *et al*., 2008) เชื้อรา *R. solani* ในถั่วเหลือง (Zheng and Sinclair 2000) เชื้อรา *Alternaria tagetica* ในบานไม่รู้โรย (Wu *et al*., 2001) เชื้อรา *P. capsici* ในพริก (Jung and Kim 2003) เชื้อรา *F. oxysporum* ในมะเขือเทศ (Omar *et al*., 2006) และเชื้อรา *S. rolfsii* ในมะเขือเทศ (อรอุษา และคณะ, 2549) และพบว่าเชื้อ *B. megaterium* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีโดยมีรัศมีวงใสมากกว่าหรือเท่ากับ 3.3 จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ PPT1(3) ที่แยกได้จากพริก สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เชื้อราสายพันธุ์ SKT1(1) ที่แยกได้จากคะน้า สายพันธุ์ PPT2(3) ที่แยกได้จากพริก สายพันธุ์ BFT1(2) ที่แยกได้จากถั่วฝักยาว และสายพันธุ์ PPT2(2) ที่แยกได้จากพริก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. megaterium* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในดินที่ก่อให้เกิดโรคในพริกได้ดีที่สุด และสามารถยับยั้งได้หลายสายพันธุ์ นอกจากนี้พบว่ามีเชื้อราในดินหลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในพริก ได้แก่ เชื้อรา *F. moniliforme* ที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าและโรคเน่าคอดิน (Abo-Elnaga and Ahmed, 2007) เชื้อรา *F. oxysporum* เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคเหี่ยว (Sahi and Khalid, 2007) *P. ultimum* เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคเน่าคอดิน (Koike *et al.,* 2007)

เมื่อนำเชื้อราที่ *B. megaterium* ยับยั้งได้ดีที่สุด คือ เชื้อราสายพันธุ์ PPT 1(3) มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา พบการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อราอย่างชัดเจน

คือ มีลักษณะโป่งพอง ผนังสายราหนาขึ้น บริเวณส่วนปลายของสายราเป็นปุ่มปม (ภาพที่ 9) เช่นเดียวกับการทดลองของอมรรัตน์ (2547) โดยได้นำเชื้อ *B. firmus* มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* พบว่าบริเวณส่วนปลายของสายรามีลักษณะสั้น งอ โป่งพอง ผนังสายราหนาขึ้น บางเซลล์มีลักษณะคล้ายถุง อาจเนื่องจากสารปฏิชีวนะที่แบคทีเรียสร้างขึ้น มีผลต่อผนังเซลล์ของเชื้อรา ทำให้การนำสารเข้าสู่เซลล์และออกจากเซลล์ผิดปกติ ส่งผลให้เซลล์ตายได้ (สมใจ, 2531) นอกจากนี้เชื้อ *B. megaterium* สามารถสร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งในข้าวได้ดีอีกด้วย (Kanjanamaneesathian *et al*., 1998; Pengnoo *et al*., 2000)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากเชื้อ *B. megaterium* ต่อเชื้อราสาเหตุโรคที่คัดเลือกจากการทดลองข้างต้นจำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่าสารปฏิปักษ์ของเชื้อ *B. megaterium* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT2 (3) ได้ดีคือ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารปฏิปักษ์ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ และอัตราส่วนความเข้มข้นที่ต่างกันเท่ากับ 91.44 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) (ภาพที่ 10) แสดงว่าสารปฏิปักษ์ของเชื้อ *B. megaterium* สามารถผลิตสารที่ทนความร้อนสูงได้ และสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคบางชนิดได้ดี จากการทดลองของ Pengnoo และคณะ (2000) พบว่าสารปฏิปักษ์ของเชื้อ *B. megaterium* ที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นระหว่างสารปฏิปักษ์ และอาหาร PDA เท่ากับ 1:1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งในข้าวได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 84 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้พบว่าสารปฏิปักษ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ดีตามอัตราส่วนความเข้มข้นของสารปฏิปักษ์ที่เพิ่มขึ้น และอุณหภูมิที่ลดต่ำลง กล่าวคือการใช้อัตราส่วนความเข้มข้นระหว่างสารปฏิปักษ์ และอาหาร PDA เท่ากับ 1: 5 และ 1:10 ทำให้สารปฏิปักษ์ถูกเจือจางลงตามลำดับ ส่งผลให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคลดลงด้วย ซึ่งต่างจากอัตราส่วนความเข้มข้น 1:1 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคสูงกว่าซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง สอดคล้องกับการศึกษาของอมรรัตน์ (2547) ที่นำสารปฏิปักษ์ที่ผลิตจาก *B. firmus* มานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส โดยกำหนดอัตราส่วนระหว่างสารปฏิปักษ์ และอาหาร PDA double strength ในอัตราส่วน 1:1 พบว่าสารปฏิปักษ์ดังกล่าวยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ได้ดี

2. การพิสูจน์การเกิดโรคของเชื้อราในดินที่เชื้อ *B. megaterium* สามารถยับยั้งได้ดี

เมื่อนำเชื้อราที่เชื้อ *B. megaterium* ยับยั้งได้ดี จำนวน 2 สายพันธุ์ คือเชื้อราสายพันธุ์ PPT1 (3) และ PPT2 (3) มาจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยวัดขนาดของโคนิเดีย (conidia) โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) และลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนี เปรียบเทียบกับหนังสืออ้างอิงของ Booth (1971) จากนั้นนำเชื้อราดังกล่าวมาปลูกกับพริกเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ เป็นเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่ทำให้พริกมีลักษณะอาการของลำต้นแคระแกรน และใบเหี่ยวจากใบล่างก่อน และมีอาการใบเหลือง อาการเหี่ยวจะเป็นไปอย่างช้าๆ ในช่วงแรกๆ โดยจะพบอาการเหี่ยวเฉพาะช่วงกลางวัน เมื่ออาการรุนแรงมากขึ้นพืชจะตาย และพบว่าเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงแก่พืชมากที่สุด คือเชื้อรา *Fusarium* sp.สายพันธุ์ PPT2 (3) เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นเชื้อรา *F. oxysporum* (Booth, 1971) โดยมีการสร้างเส้นใยสีขาว ด้านหลังโคโลนีมีสีขาวอมชมพู โคโลนีสร้าง phialides ซึ่งเจริญจากด้านข้างของเส้นใย macroconidia มีรูปร่างเหมือนพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว microconidia มีรูปร่างเป็นวงรี มีการสร้าง chlamydospore จากส่วนปลายสุดหรือระหว่างกลางของเส้นใย ซึ่งลักษณะดังกล่าวเหมือนกับที่แยกได้ก่อนการพิสูจน์โรค (ภาพที่ 12) สอดคล้องกับรายงานของ Sahi และ Khalid (2007) พบว่าเชื้อรา *F. oxysporum* เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพริก

3. การประเมินคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เจลบีด

3.1 การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เจลบีด

จากการศึกษาการพองตัวของเจลบีด พบว่าเจลบีดที่ใช้รูเข็มขนาดเล็กมีการพองตัวค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเจลบีดที่ใช้รูเข็มขนาดกลาง และขนาดใหญ่ (ภาพที่ 13 (ก)) นอกจากนี้ในการผลิตเจลบีด พบว่าการผลิตเจลบีดที่ใช้รูเข็มขนาดเล็กทำให้สารผสมที่ไหลผ่านรูเข็มเกิดการอุดตันได้ง่ายและไหลผ่านช้าลง ทำให้ใช้เวลาในการผลิตนานขึ้นกว่ารูเข็มขนาดกลางและขนาดใหญ่ (สูตรที่ 2 และ 3) ส่วนการผลิตเจลบีดที่ใช้รูเข็มขนาดใหญ่สามารถผลิตได้เร็วขึ้น เนื่องจากสารผสมไหลผ่านได้เร็วขึ้น แต่การไหลผ่านที่เร็วขึ้นนั้น บางครั้งทำให้เกิดเป็นสายยาวแทนที่จะเป็นเม็ดกลม สำหรับการผลิตเจลบีดสูตรที่ 2 โดยใช้เข็มขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร) ทำให้ได้เม็ดบีดที่มีลักษณะกลมมีความสม่ำเสมอ และใช้เวลาไม่นานในการผลิต ส่วนการไหลผ่านรูเข็มไม่ช้าหรือเร็วจนเกินไป

การศึกษาการพองตัวของเจลบีด โดยการกำหนดความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน พบว่าเจลบีดที่ใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์น้อยกว่า เกิดการพองตัวมากกว่าเจลบีดที่ใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สูง (ภาพที่ 13 (ข)) เนื่องจากแคลเซียมคลอไรด์กับโซเดียมอัลจิเนตมีการเชื่อมโยงระหว่างสายโซ่โมเลกุลมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของประมวล (2539) พบว่า เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น ทำให้การพองตัวของเม็ดเจลบีดลดน้อยลง อาจจะเนื่องมาจากแคลเซียมอัลจิเนตบีดมีปริมาณการเชื่อมต่อระหว่างสายโมเลกุลเพิ่มมากขึ้น ทำให้เชื่อมต่อกันแน่น น้ำซึมผ่านได้น้อย จึงพองตัวได้น้อยลง และนอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Liu และคณะ (2008) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ทำให้การพองตัวของเจลบีดลดลง

การศึกษาการพองตัวของเจลบีด โดยการกำหนดความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตมีผลต่อการพองตัวเป็นอย่างมาก โดยเจลบีดที่เตรียมจากโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นสูง คือ 3 เปอร์เซ็นต์ (สูตรที่7) มีอัตราเร็วและปริมาณการพองตัวมากกว่าเจลบีดที่เตรียมจากโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 และ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 13 (ค)) ตามลำดับ อาจเนื่องจากที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์มีความพรุนสูงทำให้น้ำและออกซิเจนผ่านเข้าออกได้ดี จึงมีการพองตัวดีกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Liu (2003) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตเพิ่มสูงขึ้นทำให้การพองตัวของเม็ดบีดเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน และนอกจากนี้ Adinarayana และคณะ (2004) พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์มีความเสถียรมากกว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เม็ดเจลบีดมีผิวเรียบ และเป็นทรงกลมมากยิ่งขึ้นด้วย

3.2 การประเมินคุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์เจลบีด

จากการศึกษาการปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำ ซึ่งได้กำหนดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูเข็ม พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 ซึ่งใช้รูเข็มขนาดกลางมีปริมาณเชื้อปลดปล่อยออกมาสูงสุด แตกต่างจากสูตรที่ 3 และ 1 ที่ใช้รูเข็มขนาดใหญ่และขนาดเล็กตามลำดับ (ภาพที่ 15 (ก)) อาจจะเนื่องจากการใช้รูเข็มขนาดกลางที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร เป็นขนาดที่เหมาะสมกับความเข้มข้นของสารผสม จึงทำให้ปลดปล่อยเชื้อได้ดีกว่าเข็มขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ และจากการกำหนดความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 ที่ใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.03 โมล มีการปลดปล่อยเชื้อออกมาในทุกช่วงเวลาดีกว่าสูตรที่ 4 และสูตรที่ 5 ที่มีการใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์

0.05 และ 0.07 โมล ตามลำดับ (ภาพที่ 15 (ข)) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น ทำให้ปริมาณเชื้อที่ปลดปล่อยออกมาน้อยลง เนื่องจากที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สูง ทำให้เม็ดเจลบีดมีผนังหนาขึ้น เชื้อจึงออกมาจากเม็ดเจลบีดน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Zahrani (1999) พบว่าการใช้แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงทำให้ยา Sulphamethoxazole ที่ปลดปล่อยออกมาจากเจลบีดมีปริมาณน้อย ส่วนการทดลองของ Wang และคณะ (2005) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ทำให้ยาที่ปลดปล่อยออกมาจากเจลบีดมีปริมาณน้อยลงเช่นเดียวกัน สำหรับกำหนดความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปริมาณเชื้อที่ปลดปล่อยออกมาจากเจลบีดมีค่าใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตสูงขึ้น (3 เปอร์เซ็นต์) ทำให้เชื้อปลดปล่อยออกมามากในช่วง 24 ชั่วโมงแรก อาจเกิดจากการพองตัวได้เร็วของเม็ดเจลบีดทำให้เชื้อที่บริเวณผิวปลดปล่อยได้ดี (ภาพที่ 15 (ค))

จากปริมาณการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง 4-8 มีปริมาณการอยู่รอดของเชื้อในสูตรที่ 2 และ 7 สูงใกล้เคียงกัน (> 90 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสูงกว่าเซลล์สด เนื่องจากเชื้อที่ถูกห่อหุ้มด้วยเจลบีดเอาไว้สามารถปกป้องเชื้อดังกล่าวให้อยู่รอดได้ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างไม่เหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ ดังนั้นทำให้ปริมาณเชื้อที่เหลือรอดสูงกว่าเซลล์สด จากการศึกษาของ Elcin (1995) พบว่าเชื้อ *B. sphaericus* 2362 เป็นแบคทีเรียที่ใช้กำจัดลูกน้ำยุงลาย ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนตไมโครแคปซูล สามารถอยู่รอดในสารละลายที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3-5 ได้ดีกว่าแบคทีเรียที่อยู่ในรูปเซลล์สด

จากการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดในรูปบีดแห้งและที่กระจายตัวในน้ำ พบว่าเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดค่อยๆลดลงเรื่อยๆเมื่อเวลาผ่านไป แต่สำหรับเซลล์สด พบว่าไม่มีเชื้อ *B. megaterium* เหลือรอดอยู่เลย เนื่องจากเม็ดเจลบีดที่ห่อหุ้มเชื้อเอาไว้สามารถป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลตได้ จึงทำให้ปริมาณเชื้อที่เหลือรอดอยู่สูงกว่าเซลล์สด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Elcin (1995) พบว่าเมื่อนำไมโครแคปซูลไปวางภายใต้หลอดรังสีอัลตราไวโอเลต ที่มีความเข้มแสง 20 วัตต์ ทำให้เชื้อ *B. sphaericus* 2362 เหลือรอดอยู่ในผลิตภัณฑ์เจลบีดมากกว่าที่อยู่ในรูปเซลล์สด สำหรับปริมาณการอยู่รอดของเชื้อในผลิตภัณฑ์เจลบีดที่อยู่ในรูปเจลบีดแห้ง พบว่ามีปริมาณการอยู่รอดของเชื้อลดลงน้อยกว่าที่กระจายตัวในน้ำ อาจเนื่องจากผลิตภัณฑ์เจลบีดที่อยู่ในน้ำ เมื่อเชื้อถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ภายนอกเม็ดบีดแล้วสัมผัสรังสีอัลตราไวโอเลต จึงทำให้เชื้อตาย (ตารางที่ 8) ส่วนเชื้อในผลิตภัณฑ์

เจลบีดที่อยู่ในรูปบีดแห้งนั้นไม่มีการปลดปล่อยเชื้อออกสู่ภายนอก เชื้อถูกหุ้มอยู่ภายในเจลบีด ทำให้ไม่ถูกทำลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

สำหรับการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดที่อุณหภูมิสูงก็เช่นกัน พบว่าเม็ดบีดที่กระจายตัวในน้ำมีปริมาณการอยู่รอดของเชื้อน้อยกว่าเม็ดเจลบีดแห้งที่เก็บไว้ในถุงพลาสติก

4. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *B. megaterium* ของผลิตภัณฑ์เจลบีดในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ที่ปลดปล่อยออกจากผลิตภัณฑ์เจลบีดในดิน พบว่าเชื้อที่ปลดปล่อยออกมาจากสูตรที่ 2 และ 7 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) และ *Fusarium* sp. PPT1 (3) ได้ดีที่เวลา 0.25-2 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่าที่เวลา 4 7 และ 14 วัน และเมื่อเวลาผ่านไป 28 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้ง 2 สูตร สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้น้อยกว่าทุกเวลา อาจเนื่องจากเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นทำให้เชื้อที่ปลดปล่อยออกมาก่อนได้ตายลงไปบ้าง ดังตารางที่ 9 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเชื้อที่ปลดปล่อยออกมาจากเจลบีดในดินปริมาณน้อยลง จึงส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ลดน้อยลงไปด้วย อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะน้อยลงเมื่อเวลาผ่านไป แต่ก็ลดลงอย่างช้าๆ และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ นอกจากนี้มีรายงานของ Russo และคณะ (1996) โดยได้นำเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* F113LacZY ที่อยู่ในรูปเม็ดเจลบีด มาใช้ทดสอบในการยับยั้งเชื้อรา *Pythium* spp. ที่ก่อให้เกิดโรคเน่าคอดินในอ้อย โดยวางเม็ดเจลบีดรอบๆจานเลี้ยงเชื้อและวางเชื้อราไว้ตรงกลาง พบว่าแบคทีเรียที่ห่อหุ้มด้วยเม็ดเจลบีด สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่มีการใส่เม็ดเจลบีด

5. การตรวจนับปริมาณเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เจลบีดในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 เดือน พบว่าผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้ง 2 สูตร มีปริมาณเชื้ออยู่รอดได้นานถึง 7 เดือน โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่

รอดของเชื้อสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากอัลจิเนตมีประจุเป็นลบ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ทำให้อัลจิเนตแข็งตัวมีประจุเป็นบวก จึงเกิดโครงร่างตาข่ายที่แข็งแรง ทำให้สามารถปกป้องเชื้อจากอุณหภูมิ รังสีอัลตราไวโอเลต และมลพิษต่างๆได้ดี จากการทดลองของเกษม (2536) โดยใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Chaetomium cupreum* ผสมกับสารโซเดียมอัลจิเนต แล้วหยดลงในสารละลายที่ต่างกัน ได้แก่แคลเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมกลูโคเนต พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ดีเมื่อหยดสารผสมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และนอกจากนี้ จินันทนา (2542) ได้ทำการทดลองผลิตผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเจลบีด พบว่าผลิตภัณฑ์ในรูปแบบดังกล่าวที่เก็บรักษาไว้ในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิห้องจะช่วยให้เชื้อราปฏิปักษ์ *Gliocladium virens* อยู่รอดได้นานถึง 7 เดือน อย่างไรก็ตามหลังจากเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เจลบีดไว้ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าปริมาณการอยู่รอดของเชื้อในผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 ลดลงเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 1 เดือน อาจเนื่องจากสูตรที่ 7 มีพื้นที่ผิวมากกว่าสูตรอื่น (ตารางภาคผนวกที่ 3) จึงทำให้ปริมาณ *B. megaterium* ที่อยู่รอบเม็ดบีดซึ่งไม่ได้รับการปกป้องจากสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ตายไป จึงส่งผลให้ปริมาณเชื้อลดลงได้ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณการอยู่รอดของเชื้อในผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 2 ลดลงกว่าสูตรที่ 7 อาจเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 มีขนาดใหญ่กว่าและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงกว่าสูตรที่ 2 จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียมีปริมาณการอยู่รอดสูงกว่า (ภาพที่ 26) สอดคล้องกับการทดลองของ Chandramouli และคณะ (2004) พบว่าเม็ดเจลบีดขนาดใหญ่ขึ้นทำให้การ อยู่รอดของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เจลบีดเพิ่มมากขึ้นด้วย เนื่องจากขนาดเม็ดเจลบีดใหญ่เพราะโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้การเชื่อมต่อระหว่างประจุของแคลเซียมคลอไรด์เกิดขึ้นได้ดี เป็นผลให้ความหนาแน่นของโครงสร้างมากขึ้น และแข็งแรงขึ้น จึงสามารถปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ดี

6. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพเรือนทดลอง

เมื่อนำผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เจลบีดกับสารฆ่าเชื้อราเบโนมิล ในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) ทั้งที่อยู่ในรูปเส้นใยและสปอร์ และเปรียบเทียบกับการปลูกพริกในดินปกติ ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์เจลบีดของเชื้อ *B. megaterium* และสารฆ่าเชื้อราเบโนมิล ให้ผลในการควบคุมโรค

เหี่ยวในพริกได้ดีแตกต่างทางสถิติกับการปลูกเชื้อราในรูปเส้นใย หรือสปอร์อย่างเดียว สำหรับกรรมวิธีการปลูกพริกในดินปกติไม่มีการเกิดโรค (ตารางที่ 10) ส่วนกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อราทั้งในรูปเส้นใยและสปอร์ก่อให้เกิดโรคกับพืชได้ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเชื้อที่ใส่ลงไปอาจจะเพียงพอต่อการเกิดโรค

สำหรับน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นพริกในแต่ละกรรมวิธีมีความแตกต่างทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ใส่เชื้อราสาเหตุโรคทั้งในรูปเส้นใยและสปอร์บวกกับการใช้สารฆ่าเชื้อราเบโนมิลมีปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นพริกมากที่สุด รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ใส่เชื้อราสาเหตุโรคทั้งในรูปเส้นใยและสปอร์บวกกับการใส่ผลิตภัณฑ์เจลบีดของเชื้อ *B. megaterium* สำหรับกรรมวิธีที่มีปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด คือ กรรมวิธีที่ใส่เชื้อราทั้งในรูปเส้นใยและสปอร์เพียงอย่างเดียว เนื่องจากเชื้อราเข้าทำลายพืชทำให้ใบ ดอกเหี่ยว และหลุดร่วง (ภาพที่ 28) จะทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโตได้ จึงส่งผลให้ปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งน้อยกว่ากรรมวิธีอื่นๆ (ศศิธร, 2549) รองลงมา คือ การปลูกพืชในดินปกติ (ตารางที่ 10) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ผลิตภัณฑ์เจลบีดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคในดินได้ดี และมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นพริกใกล้เคียงกับการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช อย่างไรก็ตามพบว่าการปลูกพืชในดินปกติมีปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งน้อยกว่ากรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อราสาเหตุโรค ทั้งในรูปเส้นใยและสปอร์บวกกับการใส่ผลิตภัณฑ์เจลบีด อาจเนื่องจากเชื้อ *B. megaterium* สามารถลดการเกิดโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพริกได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Han และ Lee (2005) โดยได้นำเชื้อ *B. megaterium* และ *B. mucilaginosus* มาละลายหินฟอสเฟตและโพแทสเซียม ตามลำดับ เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือยาว พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถละลายหินฟอสเฟตและโพแทสเซียมให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ และยังส่งผลให้น้ำหนักแห้งทั้งต้นและรากของมะเขือยาวเพิ่มขึ้นด้วย และนอกจากนี้ El-Hassan และ Gowen (2006) ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ของ *B. subtilis* มาใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวของถั่วแขกที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. Lentis พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพิ่มน้ำหนักแห้งของเมล็ดถั่วแขก และลดการเกิดโรคเหี่ยวได้ และจากรายงานของ Bashan *et al*., (2002) ที่นำเชื้อ *Azospirillum brasilense* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ช่วยตรึงไนโตรเจนในดินมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อัลจิเนตไมโครบีด พบว่าการใช้ผลิตภัณฑ์อัลจิเนตไมโครบีดของเชื้อ *A. brasilense* สามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของทั้งรากและลำต้นมะเขือเทศ และข้าวสาลีได้ดี

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. สรุป

1.1 การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและคัดแยกเชื้อรามาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งของเชื้อ *B. megaterium*

จากการเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อราในดิน ในแปลงผักของเกษตรกร จังหวัดสงขลา มาแยกเชื้อราในดินโดยวิธี tissue transplanting สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมดจำนวน 40 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4) และเมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อ *B. megaterium* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 21 สายพันธุ์ และสามารถยับยั้งได้ดีโดยให้รัศมีวงใสมากกว่าหรือเท่ากับ 3.3 จำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที 5) จากนั้นนำเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์มาทดสอบกับสารปฏิปักษ์ *B. megaterium* พบว่าสารปฏิปักษ์ทุกอัตราส่วนความเข้มข้นทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อนสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ PPT1 (3) และ PPT2 (3) ได้ดี (ตารางที่ 6) จึงคัดเลือกเชื้อราสาเหตุทั้ง 2 สายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการเกิดโรคในพริกต่อไป เมื่อนำเชื้อราสาเหตุที่คัดเลือกได้จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ PPT1(3) และ PPT 2(3) ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากพริก มาทำการพิสูจน์โรคในพริก พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ PPT2 (3) สามารถก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพริกรุนแรงที่สุด และสามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *F. oxysporum* (Booth, 1971)

1.2 การเตรียมและการพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลบีดของเชื้อ *B. megaterium*

เมื่อนำเชื้อ *B. megaterium* มาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเจลบีด จำนวน 7 สูตร โดยเจลบีดสูตรที่ 7 ซึ่งใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.03 โมล และขนาดรูเข็ม 2 มิลลิเมตร มีคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพเหมาะสมกว่าผลิตภัณฑ์สูตรอื่นๆ กล่าวคือ ลักษณะเม็ดบีดที่ได้มีความสม่ำเสมอ มีการพองตัวดี สามารถ

ปลดปล่อยเชื้อและสลายตัวได้เหมาะสมทั้งใน ดินและในน้ำ เมื่อนำมาทดสอบในสภาพที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4-7 พบว่าเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดสามารถอยู่รอดได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาปริมาณการอยู่รอดของ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดในรูปบีดแห้งเมื่อวางไว้ที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณ *B. megaterium* อยู่รอดสูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 เดือน พบว่ามีปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดสูงและค่อนข้างคงที่ ($9.07\pm3.6\times10^{12}$cfu ต่อกรัม) อัตราการลดลงของเชื้อน้อยมากถึงแม้เก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดทั้งที่กระจายตัวในน้ำและในรูปบีดแห้งที่วางไว้ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตความเข้มแสง 20 วัตต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณการอยู่รอดของเชื้อสูงถึง $8.6\pm2.0\times10^{6}$ cfu ต่อกรัม และ $1.4\pm5.1\text{x}10^{15}$cfu ต่อกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ที่เวลา 28 วัน เชื้อ *B. megaterium* ที่ปลดปล่อยออกมาจากผลิตภัณฑ์เจลบีดที่อยู่ในดิน โดยนำสารละลายดินมาทำการ pour plate ด้วยอาหาร PDA พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) ได้สูงถึง 88.21 เปอร์เซ็นต์

1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพเรือนทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีดสูตรที่ 7 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) พบว่ากรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์เจลบีดและเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) ทั้งในรูปเส้นใยและสปอร์สามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ดีใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่ใช้สารฆ่าเชื้อราเบโนมิล โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเพียง 23.3 และ 30.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) ทั้งในรูปเส้นใยและสปอร์เพียงอย่างเดียว (46.7 และ 63.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และนอกจากนี้ยังส่งผลให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต่อต้นของพริกเพิ่มสูงขึ้นใกล้เคียงกับการใช้สารฆ่าเชื้อราอีกด้วย

2. ข้อเสนอแนะ

การนำผลิตภัณฑ์เจลบีดของเชื้อ *B. megaterium* มาใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* PPT2 (3) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการลดหรือทดแทนการใช้สาร เคมีกำจัดศัตรูพืชได้ อีกทั้งยังสะดวกในการนำไปใช้ อย่างไรก็ตาม เพื่อการศึกษาและพัฒนาเชื้อ *B. megaterium* ในการควบคุมโรคพืชได้ดียิ่งขึ้น จึงควรมีการศึกษาสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ และควรเก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียในดินของพื้นที่จังหวัดอื่นๆ เพื่อที่จะสามารถนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปควบคุมโรคพืชได้หลายชนิดและหลายพื้นที่ นอกจากนี้อาจจะนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมาใช้ในการควบคุมโรคพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์ได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2536. การพัฒนา *Chaetomium cupreum* เป็นยาเชื้อป้องกันกำจัดเชื้อราในดินเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศโดยชีววิธี. หน้า 375-387. ใน การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 1. ณ. โรงแรมรามาการ์เด้น กรุงเทพมหานคร. วันที่ 20-22 ตุลาคม 2536.

กองบรรณาธิการฐานเกษตรกรรม. 2541. รวมเรื่องผัก. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม.

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

จินันทนา จอมดวง. 2542. การผลิต อายุการเก็บรักษา และประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดโรคของสูตรสำเร็จเชื้อรา *Gliocladium virens*. หน้า 89-92. ใน การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 4. ณ. โรงแรมแอมบาสเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน พัทยา ชลบุรี. วันที่ 27-29 ตุลาคม 2542.

จำนอง โสมกุล. 2553. การปลูกพริก. [Online]. Available : http://www.rdi.kps.ku.ac.th/tvrc/public/public1_pepper.pdf. [2010 October 15].

ธนวัฒน์. 2553. ศาสตร์แห่งพริก. [Online]. Available : http://www.stb-agency.com/ChiliBook/ chilli1_1_31 [1].pdf. [2010 October 17].

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

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

ประมวล ตั้งบริบูรณ์รัตน์. 2539. รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการการพัฒนา controlled release fertilizers เตรียมโดย encapsulation ของสารใน natural rubber latex. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ประวิทย์ เจียมจวนขาว. 2550. การผลิตโมโนเอซิลกรีเซอรอลจากน้ำมันปาล์มโอลีอีนโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประเสริฐ จริยะเลอพงษ์. 2542. การเตรียมสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปัญญา ยวงเกตุ. 2553. โรคเหี่ยวเหลือง. [Online]. Available : http://pmc06.doae.go.th/ chilly.htm. [2010 July 29].

พิทักษ์ เทพสมบูรณ์. 2540. การปลูกพริก. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์อักษรสยามการพิมพ์.

มโนวิช เรืองดิษฐ์ และ จันทรัตน์ จินดารัศมี. 2547. พริกใครว่าดีแต่เผ็ด. ว. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 52 : 1-3.

มาริสา จาตุพรพิพัฒน์. 2548. การผลิตหูฉลามเทียมจากเจลาตินและโซเดียมอัลจิเนต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2549. โรคของผักและการควบคุมโรค. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. 2547. การพิสูจน์แบคทีเรียกรัมบวกและกรัมลบ. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมใจ เอี่ยมพรรัตน์. 2531. ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ที่แยกได้และผลของสารปฏิชีวนะต่อการยับยั้งการเจริญของบักเตรีที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. ปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืช. [Online]. Available : http://www.oae.go.th/ewtadmin/ewt/oae_web/ewt_news.php? nid= 146&filename =index. [2010 April 10].

สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์. 2551. มูลค่าการส่งออกพริกของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2546-2550. [Online]. Available : www2.ops2.moc.go.th/ export/ recode_ export/# (2008 May 24).

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2540. การจัดการโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อร่าม คุ้มทรัพย์. 2543. เกษตรธรรมชาติแบบไทยไทย พืชผัก. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์กิจศึกษาเทรดดิ้ง.

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

อรอุษา ลาวินิจ วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และพิศาล ศิริธร. 2549. ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ในการควบคุมเชื้อ *Sclerotium rolfsii* โดยชีววิธี. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 37 : 1029-1033.

อัจฉรา เพ็งหนู ฤดีกร วิวัฒนปฐพี มานะ กาญจนมณีเสถียร วิภาพร โรจนรัตน์ และวานิด รอดเนียม. 2550. การพัฒนาผลิตภัณฑ์สูตรสำเร็จ *B. megaterium* แบบเม็ดเพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. การประชุมวิชาการประจำปี 2550 ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ 2-4 ตุลาคม 2550 ณ. กระบี่รีสอร์ท อ่าวนาง จ. กระบี่.

อานัฐ ตันโช. 2550. ระบบเกษตรในประเทศไทย : การเกษตรแผนปัจจุบันหรือเกษตรเคมี. [Online]. Available : http://www.oknation.net/blog/kontan/2007/08/29/entry-1. [2007 August 29].

Abo-Elnaga, H.I.G. and Ahmed, N.G. 2007. Pathogenicity, toxicity and gibberellic acid content of *Fusarium moniliforme* causing root rot and damping off of pepper. J. Plant Pathol. 6 : 318-323.

Adinarayana, K., Bapi Raju, K.V.V.S.N. and Ellaiah, P. 2004. Investigations on alkaline protease production with *B. subtilis* PE-11 immobilized in calcium alginate gel beads. Process Biochemistry 39 : 1331–1339.

Agrios, G.N. 1988. Plant Pathology. 3th ed. London : Acdemic Press.

Al-Zahrani, S.M. 1999. Investigation of factors influencing drug release using calcium alginate polymer. Bioproc. Eng. 21 : 57-60.

Bashan, Y., Hernandez, J.P., Leyva, L.A. and Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. Biol. Fertil. Soils 35 : 359-368.

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.

Booth. C. 1971. The genus *Fusarium.* Common Wealth Mycological Institute, Kew. 58 p.

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P. and Jones, M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. J. Microbiol. Methods 56 : 27–35.

Chumthong, A., Kanjanamaneesathian, M., Pengnoo, A. and Wiwattanapatapee, R. 2008. Water-soluble granules containing *Bacillus megaterium* for biological control of rice sheath: formulation, bacterial viability and efficacy testing. World J. Microbiol. Biotechnol. 24 : 2499-2507.

Dey, G., Singh, B. and Banerjee, R. 2003. Immobilization of a-amylase produced by *Bacillus circulans* GRS 313. Brazil Arch. Biol. Technol. 46 : 167–176.

Duan, W., Yang, E., Xiang, M. and Liu, X. 2008. Effect of storage conditions on the survival of two potential biocontrol agents of nematodes, the fungi *Paecilomyces lilacinus* and *Pochonia chlamydosporia*. Biocontrol Sci. Technol. 18 : 613-620.

Elcin, Y.M. 1995. *Bacillus sphaericus* 2362-calcium alginate microcapsules for mosquito control. J. Enzyme Microb. Technol. 17 : 587-591.

El-Hassan, S.A. and Gowen, S.R. 2006. Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. Lentis. J. Phytopathol. 154 : 148–155.

Engelhard, A. W., 1993. Soilborne Plant Pathogens : management of diseases with macro- and microelements. 3rd ed. St. Paul, Minn : APS Press.

Fravel, D., Olivain, C. and Alabouvette, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytol. 157: 493-502.

Freese, E.B., Cooney, P. and Freese, E. 1975. Conditions controlling commitment of differentiation in *Bacillus megaterium*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72 : 4037-4041.

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.

Han, H.S. and Lee, K.D. 2005. Phosphate and potassium solubilizing bacteria effect on uptake, soil availability and growth of eggplant. Res. J. Agric. Biol. Sci. 1 : 176-180.

Jung, H.K. and Kim, S.D. 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-pepper phytopthora blight disease. J. Microbiol. Biotechnol. 31 : 235-241.

Kanjanamaneesathian, M., Kusonwiriyawong, C., Pengnoo, A. and Nilratana, L. 1998. Screening of potential baterial antagonists for control of sheath blight in rice and development of suitable bacterial formulations for effective application. Aust. Plant Pathol. 27 : 198-206.

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

Kebary, K.M.K. 1996. Viability of *Bifidobacterium bifidum* and its effect on quality of frozen zabady. Food Res. Int. 29 : 431-437.

Koike, S.T., Subbarao, K.V., Davis, R.M. and Turini, T.A. 2003. Vegetable disease caused by soil-borne pathogens. [Online]. Available: http://anrcatalog. ucdavis.edu/pdf/8099.pdf. [2008 May 2].

Koike, S.T., Gladders, P. and Paulus, A.O. 2007. Vegetable Diseases: a Color Handbook Plant Protection Handbook Series. Gulf Professional Publishing.

Kong, Q., Shan, S., Liu, Q., Wang, X. and Yu, F. 2010. Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. Int. J. Food Microbiol. 139 : 31-35.

Lagoa, R. and Rodrigues, J. R. 2007. Evaluation of dry protonated calcium alginate beads for biosorption applications and studies of lead uptake. Appl. Biochem. Biotechnol. 143 : 115–128.

Latiffah, Z., Mohd, Z.M. and Baharuddin, S. 2007. Diversity of *Fusarium* species in cultivated soils in Penang. Mal. J. Microbiol. 3 : 27-30.

Lee, J.S., Cha, D.S. and Park, H.J. 2004. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. J. Agric. Food Chem. 52 : 7300-7305.

Lee, K.Y. and Heo, T.R. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. J. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 869-873.

Liu, C.H., Wu, J.Y. and Chang, J.S. 2008. Diffusion characteristics and controlled release of bacterial fertilizers from modified calcium alginate capsules. Bioresour. Technol. 99 : 1904-1910.

Liu, J., Kim, J.H. and Jeon, Y. S. 2008. Preparation and properties of alginate/ polyaspartate composite hydrogels. Macromol. Res. 16 : 45-50.

Liu, X., Chen, D., Xie, L. and Zhang, R. 2003. Oral colon-specific drug delivery for bee venom peptide : development of a coated calcium alginate gel beads-entrapped liposome. J. Control Release. 93 : 293-300.

Omar, I., Oneill, T.M. and Rossall, S. 2006. Biological control of fusarium crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. J. Plant Pathol. 55 : 92-99.

Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., Dommes, J. and Thonart, P. 2004. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67 : 692-698.

Otsu, Y., Matsuda, Y., Shimizu, H., Ueki, H., Mori, H., Fujiwara, K., Nakajima, T., Miwa, A., Nonomura, T., Sakuratani, Y., Tosa, Y., Mayama, S. and Toyoda, H. 2003. Biological control of phytophagous ladybird beetles *Epilachna vigintioctopunctata* (Col., Coccinellidae) by chitinolytic phylloplane bacteria

Alcaligenes paradoxus entrapped in alginate beads. J. Appl. Ent. 127 : 441–446.

Padgham, J.L. and Sikora, R.A. 2006. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. Crop Protec. 26 : 971–977.

Parry, D., 1990. Plant Pathology in Agriculture. Cambridge University Press, 385 pp.

Pengnoo, A., Kunsongwiriyawong, C., Nilratana, L. and Kanjanamaneesathian, M. 2000. Greenhouse and field trials of the bacterial antagonist in pellet formulation to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. BioControl. 45 : 245-256.

Pengnoo, A., Wiwattanapatapee, R. and Chumthong, A. 2005. Preliminary study on the effect of culture medium on the number and size of endospore of *Bacillus megaterium*. J. Silpakon Univ. Int. 5 : 129-137.

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

Rousseau, I., Le Cerf, D., Picton, L., Argillier, J.F. and Muller, G. 2004. Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS) from calcium alginate gel beads. J. Eur. Polym. 40 : 2709-2715.

Russo, A., Moenne-Loccoz, Y., Fedi, S., Higgins, P., Fenton, A., Dowling, D.N., Oregan, M. and Ogara, F. 1996. Improved delivery of biocontrol Pseudomonas and their antifungal metabolites using alginate polymers. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44 : 740-745.

Sahi, I. Y. and Khalid, A. N. 2007. Invitro biological of *Fusarium oxysporum* causing wilt in *Capsicum annuum*. Mycopath. 5(2) : 85-88.

Sharma, O.P. 1989. Text Book of Fungi. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, New Delhi, 365 pp.

Sheu, T.-Y., Marshall, R.T. and Heymann, H. 1993. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. J. Dairy Sci. 76 : 1902-1907.

Ugoji, E.O. and Laing, M.D. 2008. Rhizotron studies on *Zea mays* L. to evaluate biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. J. Microbiol. Biotechnol. 24 : 269–274.

Wang, S.B., Xu, F.H., He, H.S. and Weng, L.J. 2005. Novel alginate-poly (l-histidine) microcapsules as drug carriers: *in vitro* protein release and short term stability. Macromol. Biosci. 5 : 408-414.

Wiwattanapatapee, R., Pengnoo, A., Kanjanamaneesathian, M., Matchavanich, W., 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 : 455–462.

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., Chou, H.H., Lin, S.M. and Wu, H.C. 2001. The effect of seed-borne pathogens on emergence of globe amaranth, calendula and tagetes and the methods of control. J. Phytopathol. 149 : 91-96.

Zahrani, S.M. 1999. Investigation of factors influencing drug release using calcium alginate polymer. Bioproc. Eng. 21 : 57-60.

Zheng, X.Y. and Sinclair, J.B. 1996. Chemotactic response of *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 to soybean root and seed exudates. J. Physiol. Mol. Plant Pathol. 48 : 21-35.

Zheng, X.Y. and Sinclair, J.B. 2000. The effects of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of Rhizoctonia root rot of soybean. J. BioControl. 45 : 223-243.

Zohar-Perez, C., Chet, I. and Nussinovitch, A. 2004. Irregular textural features of dried alginate–filler beads. Food Hydrocoll. 18 : 249–258.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 สมบัติทางเคมีและกายภาพของดินผสมที่ใช้ทดลองในสภาพเรือนทดลอง

สมบัติของดิน	ค่าที่วัดได้
pH (soil : water = 1 : 5)	5.18
Organic matter (g Kg^{-1})	5.62
C (%)	3.26
Total N (%)	0.28
Available P (mg Kg^{-1})	187.51
Available K (mg Kg^{-1})	769.80
Particle size	
% clay	25.20
% silt	27.28
% sand	47.52
Texture	ดินร่วนเหนียวปนทราย

ตารางที่ 2 สมบัติทางเคมีและกายภาพของดินที่เก็บจากแปลงภาควิชาการจัดการศัตรูพืช

สมบัติของดิน	ค่าที่วัดได้
pH (soil : water = 1 : 5)	6.50
Organic matter (g Kg^{-1})	12.04
Total N (g Kg^{-1})	0.06
Available P (mg Kg^{-1})	29.57
Exchangeable K ($cmol_C Kg^{-1}$)	0.027
Particle size	
% sand	19.00
% silt	18.01
% clay	62.99
Texture	ดินเหนียวปนทราย

ตารางที่ 3 การพองตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดที่เวลาต่างๆ จากการกำหนดสูตรดังนี้ กำหนดขนาดเข็ม (ก) กำหนดความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ (ข) และกำหนดความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนต (ค)

	รัศมี (มิลลิเมตร)										
	ขนาดเข็ม				ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์				ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนต		
ชั่วโมง	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	ชั่วโมง	สูตรที่ 2	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	ชั่วโมง	สูตรที่ 2	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	1.16	1.58	1.57	0.25	1.58	0.98	0.94	0.25	1.58	1.86	2.06
0.50	1.21	1.65	1.69	0.50	1.65	0.96	0.96	0.50	1.65	1.93	2.21
1.00	1.26	1.72	1.70	1.00	1.72	1.02	0.98	1.00	1.72	2.24	2.44
6.00	1.28	1.80	1.72	6.00	1.80	1.07	0.97	6.00	1.80	2.78	3.11
12.00	1.29	1.87	1.81	12.00	1.87	1.21	1.03	12.00	1.87	2.85	3.21
24.00	1.54	1.89	2.17	24.00	1.89	1.25	1.04	24.00	1.89	2.93	3.24

ตารางที่ 4 การปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่เวลาต่างๆ จากการกำหนดสูตรดังนี้ กำหนดขนาดเข็ม(ก) กำหนดแคลเซียมคลอไรด์ (ข) และกำหนดอัลจิเนต (ค)

	ปริมาณ *B. megaterium* (cfu ต่อกรัม)										
	ขนาดเข็ม				ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์				ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนต		
วัน	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	วัน	สูตรที่ 2	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	วัน	สูตรที่ 2	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	$1.29x10^{7}$	$8.86x\ 10^{7}$	$8.80x10^{7}$	0	$8.86x\ 10^{7}$	$3.03x10^{7}$	$8.50x10^{6}$	0	$8.86x\ 10^{7}$	$3.40x\ 10^{8}$	$9.67\ x\ 10^{8}$
0.25	$3.50x10^{8}$	$5.43x\ 10^{8}$	$2.08x10^{9}$	0.25	$5.43x\ 10^{8}$	$5.46x10^{7}$	$5.67x10^{7}$	0.25	$5.43x\ 10^{8}$	$8.50x\ 10^{8}$	$1.00\ x\ 10^{9}$
0.50	$3.66x10^{8}$	$1.15x\ 10^{9}$	$1.78x10^{10}$	0.50	$1.15x\ 10^{9}$	$8.30x10^{7}$	$6.67x10^{7}$	0.50	$1.15x\ 10^{9}$	$3.00x\ 10^{9}$	$4.33\ x\ 10^{9}$
1.00	$4.66x10^{8}$	$3.25x\ 10^{9}$	$5.00x10^{10}$	1.00	$3.25x\ 10^{9}$	$9.59x10^{7}$	$7.00x10^{7}$	1.00	$3.25x\ 10^{9}$	$2.67x\ 10^{10}$	$1.54\ x\ 10^{12}$
2.00	$1.53x10^{9}$	$2.67\ x\ 10^{10}$	$1.80x10^{10}$	2.00	$2.67\ x\ 10^{10}$	$7.60x10^{7}$	$7.20x10^{7}$	2.00	$2.67\ x\ 10^{10}$	$3.33x\ 10^{11}$	$3.00\ x\ 10^{11}$
4.00	$1.02x10^{10}$	$2.33\ x\ 10^{11}$	$1.00x10^{10}$	4.00	$2.33\ x\ 10^{11}$	$1.50x10^{8}$	$1.09x10^{8}$	4.00	$2.33\ x\ 10^{11}$	$1.55\ x\ 10^{12}$	$1.47\ x\ 10^{11}$
7.00	$2.20x10^{9}$	$3.95\ x\ 10^{11}$	$1.00x10^{10}$	7.00	$3.95\ x\ 10^{11}$	$1.35x10^{10}$	$1.51x10^{9}$	7.00	$3.95\ x\ 10^{11}$	$3.78\ x\ 10^{11}$	$6.25x\ 10^{11}$

ตารางที่ 5 การสลายตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดในน้ำที่เวลาต่างๆ

	เปอร์เซ็นต์การสลายตัว		
วัน	สูตรที่ 2	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	0.00	0.00	0.00
0.25	0.67	3.97	4.37
0.5	1.20	8.40	14.70
1	2.07	11.13	13.83
2	4.50	13.83	22.70
4	11.33	13.87	21.50
7	11.30	14.07	25.97
14	10.23	11.93	26.83

ตารางที่ 6 การปลดปล่อยเชื้อ *B. megaterium* ในดินที่เวลาต่างๆ

	ปริมาณ *B. megaterium* (cfu ต่อกรัม)		
วัน	สูตรที่ 2	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	6.29×10^{4}	8.86×10^{4}	2.48×10^{5}
0.25	1.50×10^{5}	5.50×10^{5}	4.73×10^{5}
0.5	1.02×10^{6}	1.30×10^{6}	1.31×10^{6}
1	3.51×10^{6}	4.33×10^{6}	4.43×10^{6}
2	1.15×10^{7}	1.17×10^{7}	1.50×10^{7}
4	1.23×10^{9}	1.36×10^{8}	4.29×10^{8}
7	6.67×10^{9}	1.40×10^{10}	$1.50.\times10^{10}$
14	4.00×10^{8}	3.33×10^{8}	4.67×10^{8}

ตารางที่ 7 การสลายตัวของผลิตภัณฑ์เจลบีดในดินที่เวลาต่างๆ

วัน	เปอร์เซ็นต์การสลายตัว		
	สูตรที่ 2	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7
0	0.00	0.00	0.00
0.25	0.87	2.47	4.80
0.5	3.13	5.27	6.87
1	5.67	7.73	8.73
2	6.33	12.13	20.60
4	17.53	26.87	31.53
7	31.40	34.27	39.13
14	52.20	61.07	62.93

ตารางที่ 8 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4

ชั่วโมง	ปริมาณ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์)				
	0	6	12	24	48
เซลล์สด	100	84.93	83.62	82.77	82.84
สูตร 2	100	98.70	97.52	96.71	96.09
สูตร 7	100	98.36	95.43	94.46	93.79
F-test	ns	*	**	**	**
C.V. (%)	0	5.0	2.6	3.2	3.9

ตารางที่ 9 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5

	ปริมาณ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์)				
ชั่วโมง	0	6	12	24	48
เซลล์สด	100	87.65	86.75	88.25	84.94
สูตร 2	100	96.89	97.08	94.88	96.41
สูตร 7	100	94.53	94.22	95.4	93.54
F-test	ns	*	**	ns	ns
C.V. (%)	0	4.0	2.0	4.0	7.5

ตารางที่ 10 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6

	ปริมาณ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์)				
ชั่วโมง	0	6	12	24	48
เซลล์สด	100	88.95	88.25	88.18	87.71
สูตร 2	100	96.58	95.03	95.59	94.91
สูตร 7	100	93	92.75	91.78	87.45
F-test	ns	ns	ns	*	ns
C.V. (%)	0	4.5	6.5	3.9	4.8

ตารางที่ 11 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7

	ปริมาณ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์)				
ชั่วโมง	0	6	12	24	48
เซลล์สด	100	82.91	81.7	82.08	74.17
สูตร 2	100	96.41	96.53	94.76	94.64
สูตร 7	100	96.21	89.19	89.07	87.27
F-test	ns	*	**	**	**
C.V. (%)	0	4.9	2.9	4.4	5.6

ตารางที่ 12 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ในน้ำที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8

	ปริมาณ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์)				
ชั่วโมง	0	6	12	24	48
เซลล์สด	100	83.77	83.23	79.68	77.13
สูตร 2	100	94.76	94.58	88.49	85.75
สูตร 7	100	91.43	88.7	88.19	87.76
F-test	ns	ns	**	ns	*
C.V. (%)	0	7.0	1.1	6.0	4.4

ตารางที่ 13 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเมื่อกระจายตัวในน้ำ

	ปริมาณ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์)				
ชั่วโมง	0	6	12	24	48
เซลล์สด	100	100	101	99	97
สูตร 2	100	100	100	100	99
สูตร 7	100	99	100	97	96
F-test	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	0	3.3	6.9	4.7	4.2

ตารางที่ 14 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเมื่อกระจายตัวในน้ำ

	ปริมาณ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์)				
ชั่วโมง	0	6	12	24	48
เซลล์สด	100	100	97	91	87
สูตร 2	100	100	100	100	99
สูตร 7	100	98	98	96	94
F-test	ns	ns	ns	*	**
C.V. (%)	0	3.6	8.4	1.8	3.8

ตารางที่ 15 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเมื่อกระจายตัวในน้ำ

	ปริมาณ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์)				
ชั่วโมง	0	6	12	24	48
เซลล์สด	100	97	92	87	77
สูตร 2	100	99	94	87	86
สูตร 7	100	91	91	90	82
F-test	ns	ns	ns	ns	*
C.V. (%)	0	6.2	3.4	4.0	3.8

ตารางที่ 16 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในรูปเจลบีดแห้ง

	ปริมาณ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์)				
ชั่วโมง	0	6	12	24	48
เซลล์สด	100	100	101	99	97
สูตร 2	100	100	100	100	100
สูตร 7	100	98	100	97	97
F-test	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	0	1.5	5.2	2.0	3.6

ตารางที่ 17 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในรูปเจลบีดแห้ง

	ปริมาณ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์)				
ชั่วโมง	0	6	12	24	48
เซลล์สด	100	100	97	91	87
สูตร 2	100	100	100	100	96
สูตร 7	100	101	100	99	98
F-test	ns	ns	ns	**	**
C.V. (%)	0	3.7	2.9	1.5	2.5

ตารางที่ 18 การอยู่รอดของเชื้อ *B. megaterium* ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในรูปเจลบีดแห้ง

	ปริมาณเชื้อ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์)				
ชั่วโมง	0	6	12	24	48
เซลล์สด	100	97	92	87	77
สูตร 2	100	100	100	99	99
สูตร 7	100	96	96	95	96
F-test	ns	ns	**	**	**
C.V. (%)	0	3.2	2.3	4.0	3.4

ตารางที่ 19 ปริมาณเชื้อ *B. megaterium* ในผลิตภัณฑ์เจลบีด หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 เดือน

	ปริมาณเชื้อ *B. megaterium* (เปอร์เซ็นต์)			
เดือน	สูตร 2	สูตร 7	F-test	C.V. (%)
1	99.7	92.9	ns	3.3
2	100.0	93.4	*	2.6
3	99.3	92.2	ns	3.4
4	99.8	91.0	ns	4.1
5	99.1	90.6	ns	5.0
6	97.7	90.5	ns	6.3
7	93.3	90.0	ns	2.5

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวจารุณี หนูมาก

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010620003

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จ
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547

ทุนการศึกษา

1. ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ
2. ทุนบัณฑิตศึกษาสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

1. จารุณี หนูมาก อัจฉรา เพ็งหนู ฤดีกร วิวัฒนปฐพี และมานะ กาญจนมณีเสถียร. 2551. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus megaterium* ในห้องปฏิบัติการเพื่อยับยั้งเชื้อราโรคพืชในดิน. วารสารเกษตรนเรศวร. 11 : 167-173.