สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* สำหรับการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา

Formulation of *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* Biocontrol Agent for the Suppression of Rubber White Root Rot Disease

ปวีณา สังข์แก้ว

Paweena Sungkaew

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University
2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* สำหรับการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา

ผู้เขียน นางสาวปวีณา สังข์แก้ว

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..... (รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ (ดร.ชนินันท์ พรสุริยา)

.....กรรมการ (ดร.ภวิกา บุณยพิพัฒน์)

.....กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

……..

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอแสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวปวีณา สังข์แก้ว)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* สำหรับการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา

ผู้เขียน นางสาวปวีณา สังข์แก้ว

สาขา โรคพืชวิทยา

ปีการศึกษา 2555

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและเตรียมสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล และชนิดผงของเชื้อ *Streptomyces* sp. สำหรับใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem สาเหตุโรครากขาวของยางพารา โดยแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 258 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินในสวนยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย นำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture plate พบว่า *Streptomyces* sp. S106 และ S110 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 83.57 และ 74.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำเชื้อ *Streptomyces* sp. S106 และ S110 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ในดินในหลอดทดลอง พบว่า *Streptomyces* sp. S106 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ S110 และชุดควบคุม และเมื่อนำเชื้อ*Streptomyces* sp. S106 มาจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี และการเทียบเคียงโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis ได้เป็น *S. griseus* supsp. *formicus* (Harris and Woodruff) จากนั้นทดสอบผลของเชื้อ *S. griseus* supsp. *formicus* ต่อการเปลี่ยนแปลงของเชื้อรา *R. microporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่าเส้นใยของเชื้อราเหี่ยวย่นและผิดรูปร่าง เตรียมสารสกัดหยาบของเชื้อ *S. griseus* supsp. *formicus* เพื่อนำมาทดสอบสารออกฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อรา *R. microporus* โดยการหาค่า MIC และ MFC พร้อมทั้งทดสอบ bioautography assay บนแผ่น TLC พบว่าสารสกัดให้ค่า MIC และ MFC เท่ากับ 62.5 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรามีค่า Rf เท่ากับ 0.06

การพัฒนาสูตรสำเร็จของแบคทีเรียปฏิปักษ์ สามารถผลิตสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลได้ 4 สูตร ด้วยวิธี wet granulation และสูตรสำเร็จชนิดผง 4 สูตร เมื่อนำมาประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ พบว่าสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย lactose monohy drate, sodium alginate, PVP (k-30) ข้าวโพดบด เซลล์แขวนลอย และน้ำกลั่น อัตราส่วน 63 : 8 : 4 : 10 : 5 : 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชนิดผงสูตรที่ 4 ซึ่งประกอบด้วย lactose monohy drate, sodium alginate, PVP (k-30) ข้าวโพดบด เซลล์แขวนลอย และน้ำกลั่น อัตราส่วน 57 : 8 : 10 : 5 :20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีคุณสมบัติที่ดีและเหมาะสมต่อการนำไปใช้ เนื่องจากมีการกระจายตัวของเชื้อ *S. griseus* supsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จอย่างสม่ำเสมอ ให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เป็นกลาง และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสูง และเมื่อนำสูตรสำเร็จทั้งหมดมาทดสอบความมีชีวิตรอดของเชื้อ *S. griseus* supsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จ โดยการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อที่มีชีวิตรอดในสูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่อนข้างคงที่ในช่วงเดือนที่ 1-3 และลดลงทุกๆเดือนหลังจากเดือนที่ 3 ส่วนสูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส)นั้น พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อในสูตรสำเร็จเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนแรกของการเก็บรักษา ซึ่งเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ พบว่าสูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีจำนวนประชากรของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ที่มีชีวิตรอดและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* สูงกว่าสูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) คัดเลือกสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 3 และชนิดผงสูตรที่ 4 เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรครากขาวของยางพาราในเรือนกระจก ผลการทดลองพบว่าสูตรสำเร็จของเชื้อ *S. griseus* supsp. *formicus* ทั้งสองรูปแบบสามารถควบคุมโรครากขาวได้ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี

Thesis Title Formulation of *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* Biocontrol Agent for the Suppression of Rubber White Root Rot Disease

Author Miss Paweena Sungkaew

Major Program Plant Pathology

Academic Year 2012

ABSTRACT

The objectives of the present study were to select and prepare *Streptomyces* sp. into granule and powder formulations to control *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem causal agent of rubber white root rot. A total of 258 *Streptomyces* spp. were isolated from soils collected from rubber growing areas in the south of Thailand, and were characterized for their antagonistic potential against *R. microporus*. Two *Streptomyces* isolates (S106 and S110) showed the most antagonistic activities in dual culture assay, with an inhibition of 83.57 and 74.29%, respectively. The interaction of S106 and S110 against *R. microporus* were investigated in soil contained in test tubes. The results showed that S106 significantly inhibited mycelium growth of *R. microporus* as compared to the S110 and control. *Streptomyces* sp. S106 was identified using morphological biochemical and physiological tests combined with 16S rRNA-based molecular analysis. Isolate S106 was identified as *S. griseus* subsp. *formicus* (Harris and Woodruff). Effects of *S. griseus* subsp. *formicus* on the *R. microporus* mycelia were observed by scanning electron microscopy. The results demonstrated that hypha of *R. microporus* had obvious corrugated and abnormal shapes. The crude extract of *S. griseus* subsp. *formicus* was shown to have anti-*R. microporus* activity with minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) values of 62.5 and 125 mg/ml, respectively. And bioautography assay on TLC plates with *R. microporus* displayed high antifungal activity with an Rf value of 0.06.

Subsequently, four granule and four powder formulations were successfully prepared. Granule formula 3 and powder formula 4 exhibited good formulations with high invariability, neutral pH and high inhibitory effects. After formulations, the products were kept at 4°C and room temperature (28-32°C). The viability of the *Streptomyces* in products was checked every month for 6 months. At 4°C, the viable propagules of all products were relatively constant for 1-3 months, but it gradually declined after 3 months of storage. At room temperature (28-32°C), the viable propagules of all products gradually declined after the first month. After 6 months, efficacy and the number of viable propagules in all products kept at 4°C were higher than those kept at room temperature (28-32°C).Granule formula 3 and powder formula 4 were selected for further study to control rubber white root rot in greenhouses. The results showed that both Streptomyces formulations were effective in controlling white root rot and not significantly different from chemical treatment.

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการตารางภาคผนวก	(13)
รายการภาพ	(15)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	20
2. วิธีการวิจัย	21
วัสดุและอุปกรณ์	21
วิธีการดำเนินการ	24
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	36
4. สรุปผลการทดลอง	70
เอกสารอ้างอิง	72
ภาคผนวก	81
ประวัติผู้เขียน	99

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. สารปฏิชีวนะบางชนิดที่ผลิตจากเชื้อในสกุล *Streptomyces* และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์	9
2. ตัวอย่างเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช	12
3. สารประกอบของสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล	32
4. สารประกอบของสูตรสำเร็จชนิดผง	32
5. สถานที่เก็บตัวอย่างดินจากสวนยางพารา จำนวนตัวอย่างดินและจำนวนไอโซเลทของเชื้อ *Streptomycete* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน	36
6. ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp.ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ในดินในหลอดทดลอง	42
7. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus*	46
8. ความสามารถของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยประเมินจากวงใสที่เกิดจากการย่อย substrate เฉพาะ หลังการทดสอบ 5 วัน	48
9. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญ(MFC)ของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ของสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* หลังการทดสอบ 72 ชั่วโมง	52
10. ปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จ หลังการผลิต 24 ชั่วโมง	58
11. ความเป็นกรด-ด่างและการละลายน้ำของสูตรสำเร็จที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	59
12. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จ หลังการผลิต 24 ชั่วโมง	61
13. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* โดยเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลจากการทดสอบ 6 เดือน	65
14. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* โดยเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดผงจากการทดสอบ 6 เดือน	66

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

15. ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการควบคุมโรครากขาวของกล้ายางพาราในเรือนกระจก และคุณสมบัติของดินก่อนและหลังการทดสอบ 3 เดือน 69

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
1. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp.	86
2. การเจริญของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* และ *Rigidoporus microporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารประกอบในการทำสูตรสำเร็จแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	88
3. วิเคราะห์ความแปรปรวนการเจริญของเชื้อ *Rigidoporus microporus* ในดินที่ผสมเชื้อ *Streptomyces* spp. ในหลอดทดลอง หลังการทดสอบ 5 วัน	89
4. วิเคราะห์ความแปรปรวนการเจริญของเชื้อ *Rigidoporus microporus* ในดินที่ผสมเชื้อ *Streptomyces* spp. ในหลอดทดลอง หลังการทดสอบ 10 วัน	89
5. วิเคราะห์ความแปรปรวนการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rigidoporus microporus* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ในดินในหลอดทดลอง หลังการ ทดสอบ 10 วัน	90
6. วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 1	90
7. วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 2	90
8. วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 3	91
9. วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 4	91
10. วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 1	91
11. วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 2	92
12. วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 3	92

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
13. วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 4	92
14. วิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถในการละลายน้ำของสูตรสำเร็จทั้งชนิดแกรนูลและชนิดผง (8 สูตร)	93
15. วิเคราะห์ความแปรปรวนการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rigidoporus microporus* โดยสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล	93
16. วิเคราะห์ความแปรปรวนการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rigidoporus microporus* โดยสูตรสำเร็จชนิดผง	93
17. จำนวนประชากรของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล ในการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้องจากการทดสอบ 6 เดือน	94
18. จำนวนประชากรของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดผงในการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้องจากการทดสอบ 6 เดือน	95

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	ลักษณะอาการโรครากขาวของยางพารา	4
2.	ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ภายหลังการทดสอบ 7 วัน	40
3.	ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ในดิน ภายหลังการทดสอบ 10 วัน	43
4.	ลักษณะของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus*	45
5.	ลักษณะของวงใสที่เกิดจากการย่อย substrate โดยเอนไซม์ chitinase และ caeinase (proteinase)	48
6.	อาการผิดปกติของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ภายหลังการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ S*treptomyces griseus* subsp. *formicus* เป็นเวลา 5 วัน บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)	50
7.	สารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus*	51
8.	การทดสอบความสามารถของสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ด้วยวิธี Bioautography บนแผ่น TLC	53
9.	การเจริญของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* และ *Rigidoporus microporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารประกอบในการทำสูตรสำเร็จแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	54
10.	ลักษณะสูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ชนิดแกรนูล	55
11.	ลักษณะสูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ชนิดผง	56
12.	ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จต่อการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ภายหลังการผลิต 24 ชั่วโมง	60
13.	จำนวนประชากรของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จ จากการทดสอบ 6 เดือน	64

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

14. พุ่มใบและรากของกล้ายางพาราหลังการทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ต่อการยับยั้งโรครากขาวของยางพาราในเรือนกระจก เป็นเวลา 3 เดือน 68

บทที่ 1
บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของ ประเทศไทยและภูมิภาคอาเซียน ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลก ก่อให้ เกิดกิจกรรมต่อเนื่องทั้งภาคการผลิต อุตสาหกรรม และการตลาด เกี่ยวข้องกับทุกภาคส่วนกระจายอยู่ทั่วประเทศ ทั้งเกษตรกร ผู้ประกอบการ และภาครัฐ ในปี 2554 มูลค่าการส่งออกยางดิบ ผลิตภัณฑ์ยาง รวมทั้งอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ไม้ยางพารา ทำรายได้ให้ประเทศถึง 678,942 ล้านบาททำให้มีการขยายพื้นที่ปลูกยางพาราเพิ่มขึ้น โดยในปี 2551 มีพื้นที่ปลูกยางพารา 16.89 ล้านไร่ และเพิ่มเป็น 18.76 ล้านไร่ ในปี 2554 โดยภาคใต้มีพื้นที่มากที่สุด รองลงมาคือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตะวันออก กลาง และเหนือ ตามลำดับ ซึ่งจังหวัดที่ปลูกยางพารามากที่สุด คือ จังหวัดสุราษฎร์ธานี รองลงมาคือ สงขลา และนครศรีธรรมราช (สถาบันวิจัยยาง, 2555)

โรครากขาวเป็นโรคทางรากที่สำคัญที่สุดของยางพาราเกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem ระบาดและทำความเสียหายทางเศรษฐกิจในประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย ไทย อินเดีย ศรีลังกา และประเทศในแอฟริกาตะวันตกและแอฟริกากลาง (Guyot and Flori, 2002) เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายในแต่ละประเทศแตกต่างกันไป เช่น ในศรีลังกามีรายงานว่าต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (Litanage de, 1977 อ้างถึงใน Guyot and Flori, 2002) ในขณะที่ในไอวอรีโคสต์ มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเฉลี่ย 2 เปอร์เซ็นต์ แต่ในบางแปลงที่มีขนาดใหญ่มีพื้นที่จำนวน 25 เฮกแตร์ และมียางพาราอายุ 20-25 ปี พบการเข้าทำลายมากกว่า 1 เฮกแตร์ สำหรับในประเทศไทย พงษ์เทพ ขจรไชยกูล (2523) ได้สำรวจโรคในสวนปลูกยางสงเคราะห์ในจังหวัดปัตตานี ยะลา นราธิวาส และกระบี่ พบว่า ต้นยางใหม่เป็นโรครากขาว 12-17 เปอร์เซ็นต์ และจากการสำรวจพื้นที่เสียหายจากโรครากขาวในภาคใต้ตอนบน และภาคใต้ตอนล่าง ในปี 2551-2553 โดยในภาคใต้ตอนบนสำรวจสวนยางที่เป็นโรครากทั้งหมด 56,296 ไร่ พบพื้นที่เสียหายจากโรครากขาว 1,929 ไร่ คิดเป็นมูลค่าความสูญเสียไม่ต่ำกว่า 52 ล้านบาท สวนยางที่เป็นโรครากขาวมีอายุเฉลี่ย 13 ปี และในภาคใต้ตอนล่างสำรวจสวนยางที่เป็นโรครากทั้งหมด 4,475 ไร่ พบพื้นที่เสียหายจากโรครากขาว 152.6 ไร่ ซึ่งหากรวมความเสียหายจากโรครากขาวในพื้นที่ปลูกยาง

ภาคใต้ของประเทศไทยทั้งหมดในปี 2551-2553 คาดว่ามีความเสียหายเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 1,600 ล้านบาท (อารมณ์ โรจน์สุจิตร และคณะ, 2553) ส่วนการเกิดโรคในปัจจุบันอยู่ในระหว่างการสำรวจโดยสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ แต่จากการเสวนาเรื่องโรครากขาวซึ่งจัดโดยองค์การบริหารส่วนตำบลโคกม่วง อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลาร่วมกับสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้สอบถามความเสียหายจำนวนต้นยางพาราที่ตายจากโรครากขาว พบว่า มีต้นตายตั้งแต่ 3 ต้น ถึงมากกว่า 200 ต้น โดยส่วนใหญ่เป็นยางพาราที่ปลูกในรอบที่ 2 และรอบที่ 3

สำหรับการควบคุมโรครากขาวของยางพารานิยมใช้สารเคมี เช่น ไตรเดอร์มอร์ฟ (tridermorph) โปรโคนาโซล (cyproconazole) โปรปิโคนาโซล (propiconazole) เฮกซะโคนาโซล (hexaconazole) และคาร์บอกซิน (carboxin) (เสมอใจ ชื่นจิตต์, 2555) ซึ่งเป็นวิธีที่อาจก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมได้ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นการควบคุมโรคโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงมีความจำเป็นเพิ่มขึ้น แต่การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปของเชื้อสดมักมีข้อจำกัดในการนำไปใช้จริงในแปลงเกษตรกรหลายประการ การนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จ สำหรับใช้ในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญมาก จึงจำเป็นต้องเร่งทำการศึกษาและพัฒนาสูตรสำเร็จ (formulation) แทนการใช้เชื้อสด ศึกษาคุณสมบัติต่างๆ อายุการเก็บรักษา และศึกษาประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จนี้ในการควบคุมในเรือนกระจก เพื่อผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

2. การตรวจเอกสาร

2.1 โรครากขาวของยางพารา

2.1.1 สาเหตุ

โรครากขาวของยางพาราเกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem เป็นเชื้อจำพวกเห็ด (Basidiomycetes) ซึ่งมีการจัดหมวดหมู่ของเชื้อดังนี้ (Ryvarden, 1991)

Kingdom: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Class: Basidiomycetes

Subclass: Agaricomycetidae

Order: Polyporales

Family: Meripilaceae

Genus: *Rigidoporus*

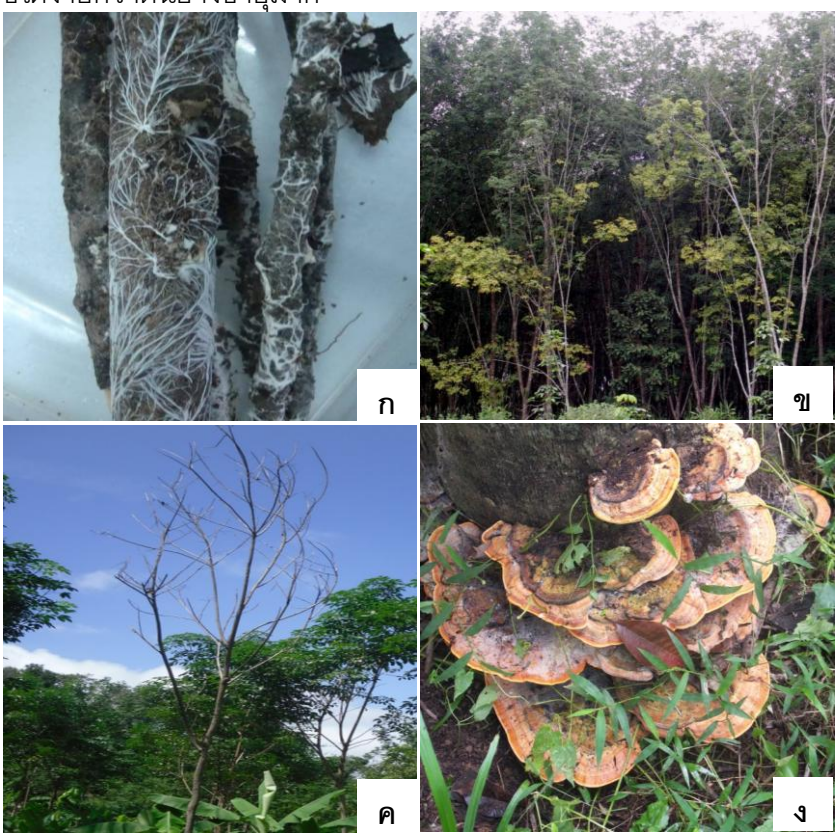
Species: *R. microporus*

อารมณ์ โรจน์สุจิตร และคณะ (2552) ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อ *R. microporus* พบว่า เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth ผสมน้ำสกัดฟางข้าว แหล่งคาร์บอนที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ดีคือ ฟรุคโตส มอลโตส กลูโคส เซลลูโลส และแป้ง ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย พบว่าเชื้อราสามารถใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุดรองลงมาคือ แอสพาราจีน เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต และเส้นใยสามารถเจริญได้ดีที่ระดับอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส โดยเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 และ 40 องศาเซลเซียส และยังพบว่าเส้นใยสามารถเจริญได้ที่ ระดับ pH 4-10 โดยเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับ pH 6-7 ส่วนลักษณะของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาว แบน แตกแขนง เจริญแผ่เป็นวงกลมและเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 6 วัน โดยมีอัตราการเจริญ 1.3 เซนติเมตรต่อวัน เส้นใยไม่มีสี มีผนังกั้น และไม่มี clamp connection มีความกว้าง 2.8-7.2 ไมโครเมตร (Kaewchai, 2010) ดอกเห็ด (fruiting body) มีลักษณะเป็นแผ่นครึ่งวงกลม ไม่มีก้าน อาจมีขนาดกว้างถึง 20 เซนติเมตรขึ้นอยู่กับอายุของดอกเห็ด ผิวเรียบ ด้านบนของดอกมีสีน้ำตาลแดงและส้ม ด้านล่างสีขาวมีลักษณะเป็นเส้นใยอัดกันแน่นและมีรูจำนวนมาก (pores) ระบบเส้นใยเป็นแบบ monomitic มีผนังกั้น ผนังหนา ไม่มีสี ไม่มี clamp connection และสร้างสปอร์ขนาด 3.6-4.1 ไมโครเมตร

2.1.2 ลักษณะอาการของโรค

โรครากขาวของยางพาราจัดเป็นโรคทางรากที่สำคัญที่สุด เนื่องจากเชื้อเข้าทำลายยางพาราตั้งแต่ระยะยางอ่อน (1-5 ปี) ในกรณีที่พื้นที่นั้นเคยมีการปนเปื้อนของเชื้อนี้มาก่อน หรือทำให้เกิดความเสียหายกับยางในระยะต้นโต อายุมากกว่า 15 ปีขึ้นไป (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล,

2522) อาการที่ปรากฏคือ รากที่เป็นโรคจะปรากฏเส้นใยเชื้อราสีขาวลักษณะเป็นร่างแหแผ่ปกคลุมทั่วราก (ภาพที่1ก.) เมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้นมีลักษณะนูนกลมสีเปลี่ยนเป็นสีทองจนถึงสีน้ำตาลแดง ส่วนใบมีขนาดเล็กลง สีเหลือง ทรงพุ่มมีขนาดเล็ก (ภาพที่1ข.) ในระยะที่เชื้อเข้าทำลายระบบรากค่อนข้างรุนแรงแล้ว จะทำให้ใบร่วงและยืนต้นตายในที่สุด (ภาพที่1ค.) และระหว่างที่ยางแสดงอาการโรคระยะหนึ่งหรือหลังต้นยางตายจะเกิดดอกเห็ดสีส้มที่โคนต้น ดอกเห็ดมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลม ไม่มีก้าน เจริญซ้อนกันเป็นชั้น ๆ ดอกอายุน้อยมีสีส้ม ขอบดอกขาว (ภาพที่1ง.) เมื่ออายุมากขึ้นดอกแข็งกระด้าง มีสีน้ำตาลแดง และสร้างสปอร์จำนวนมากเพื่อแพร่กระจายต่อไป (เสมอใจ ชื่นจิตต์, 2555) เนื้อไม้ของรากที่เป็นโรคในระยะลุกลามมีสีขาวหรือครีมและแข็ง ส่วนต้นที่เป็นโรคตายใหม่ๆเนื้อไม้มีสีน้ำตาลและแข็งบางครั้งมีสีเทาต่อมาจะยุ่ยและเบา จากการศึกษาของ Nicole และ Benhamou (1991) พบว่าต้นยางอายุน้อยสามารถชักนำให้เกิดการติดเชื้อได้ง่ายกว่าต้นยางอายุมาก



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการโรครากขาวของยางพารา

ก. พบเส้นใยเชื้อราสีขาวบริเวณรากที่เป็นโรค

ข. ใบยางเหลือง ทรงพุ่มเล็ก

ค. ยางยืนต้นตาย

ง. พบดอกเห็ดบริเวณโคนต้น

2.1.3 กระบวนการ การเข้าทำลายของโรค

กระบวนการหรือกลไกการเข้าทำลายของเชื้อ *R. microporus* โดยสรุปมี 3 ขั้นตอนคือ

1) ไรโซมอฟของเชื้อราเจริญอยู่ผิวรากภายนอก

2) เมื่อไม่มีอาหารจากภายนอกหรือดินขาดออกซิเจน เชื้อราจะเข้าทำลายเซลล์รากพืชโดยไรโซมอฟเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเส้นใยที่มีผนังเซลล์บางขึ้นเพื่อเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อปลดปล่อย extracellular enzyme เข้าย่อยสลายเนื้อไม้ (Nandris *et al.,* 1987) เช่น การปลดปล่อย lytic enzyme เพื่อย่อยสลายสารพวกคาร์โบไฮเดรตในผนังเซลล์ของไม้ ซึ่งในช่วงการเข้าทำลายจะผลิต cellulolytic enzyme เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสที่อยู่ในท่อน้ำท่ออาหาร โดยการปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายเซลลูโลส เพื่อให้ได้แหล่งอาหารที่เป็นคาร์บอนก่อนจะเข้าไปย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลส เพื่อเจริญอยู่ภายในเซลล์พืชนอกจากนี้ยังมีเอนไซม์แลคเคสที่เชื้อราปลดปล่อยออกในช่วงการแทงผ่านเข้าไปในรากของต้นยาง เอนไซม์นี้มีบทบาทในการควบคุมเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อย่อยสลายลิกนินและทำให้มีการสะสมของฟีนอล ซึ่งมีผลในการต่อต้านการสร้างลิกนินของพืชด้วย และนอกจากที่เส้นใยจะเข้าสู่รากพืชโดยการสร้างเอนไซม์มาย่อยสลายเนื้อไม้แล้วยังสามารถเข้าสู่รากโดยผ่านทางช่องเปิดธรรมชาติ เช่น เลนติเซล หรือทางบาดแผลได้อีกด้วย (Nicole and Benhamou, 1991)

3) เส้นใยเจริญอยู่ภายในเซลล์พืชโดยการย่อยผนังเซลล์ของระบบท่อน้ำท่ออาหาร และแพร่กระจายสู่เซลล์อื่นโดยการแทงผ่านทางช่องว่างและท่อต่างๆของเซลล์ จึงสามารถพบเส้นใยเชื้อราได้ทั้งระหว่างเซลล์ ในเซลล์และในผนังเซลล์ และพบว่าการที่เชื้อเจริญอยู่ภายในท่ออาหารทำให้น้ำยางตกตะกอนจับเป็นก้อนส่งผลให้ปริมาณน้ำยางในต้นยางลดลง (Nandris *et al.,* 1987)

จากการตรวจสอบเนื้อไม้ที่เป็นโรค พบว่าโครงสร้างของเซลล์ถูกทำลายในส่วนของ middle lamella และผนังเซลล์ถูกย่อยสลาย ทั้งนี้เกิดจากเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโครงสร้างของพืชได้ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย เช่น 1. glycosidases (β-glucosidase, α-galactosidase และ β- galactosidase) 2. polysaccharidases (CM-cellulase, pectinase และ xylanase) และ 3. phenol oxidases (laccase และ peroxidase) เนื้อเยื่อของพืชเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *R. microporus* นั้นพบการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในปริมาณมากเป็นเอนไซม์หลัก ในขณะที่เชื้อราทำลายเนื้อไม้อื่น เช่น *Phellinus noxius* จะสร้าง glycosidase และ polysaccharidases เป็นหลัก (Nandris *et al.,* 1987)

2.1.4 การแพร่ระบาดของโรค

โรครากขาวของยางพาราส่วนใหญ่แพร่ระบาดโดยการสัมผัสกันระหว่างรากที่เป็นโรคกับรากจากต้นปกติ ทำให้เชื้อเจริญลุกลาม หรือโดยที่ปลูกยางในรอบที่ 2 หรือ 3 และไม่ได้ขุดทำลายตอเก่าของต้นที่เคยเป็นโรค รากจึงมีเชื้อโรคอยู่ หรือสปอร์ของเชื้อราปลิวไปตามลม ไปตามน้ำ แล้วไปตกที่ต้นยางปกติ เมื่อมีความชื้นเพียงพอจะเจริญลุกลามไปยังระบบรากกลายเป็นแหล่งเชื้อโรคแหล่งใหม่ต่อไป (เสมอใจ ชื่นจิตต์, 2555) นอกจากนี้การระบาดและความรุนแรงของโรครากขาวยังขึ้นกับปัจจัยสิ่งแวดล้อมหลายประการ โดยลักษณะดิน ทรายหรือดินร่วนทราย ระดับ pH 5-7 มีปริมาณน้ำในดิน 80-90 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณฝนมากกว่า 4,000 มิลลิเมตรต่อปี เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (อารมณ์ โรจน์สุจิตร, 2551)

2.1.5 การป้องกันกำจัด

การควบคุมโรคนี้กระทำได้โดยต้องดูแลอย่างใกล้ชิด เมื่อพบต้นเป็นโรค (สังเกตจากทรงพุ่ม ใบเล็กเหลือง และขุดดูราก) ให้ตัด ขุดตอ และเผาทำลายตอยางเก่า เพื่อลดปริมาณเชื้อ ส่วนเชื้อที่อาจตกค้างที่รากที่หลงเหลืออยู่ในดิน ให้ใช้ไฟสุมเผาเช่นกัน หากพบการเข้าทำลายของโรคอย่างรุนแรง จะใช้สารเคมีควบคุมโรค เช่น โปรปิโคนาโซล (propiconazole) ไตรเดอร์มอร์ฟ (tridermorph) ไซโปรโคนาโซล (cyproconazole) เป็นต้น (อุไร จันทรประทิน, 2540) ซึ่งมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง

2.1.6 การควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธี

ปัจจุบันมีการควบคุมโรคพืชด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิด *เช่น Trichoderma harzianum* (จิระเดช แจ่มสว่าง และคณะ, 2536; D'Souza *et al.,* 2001) *Chaetomium cupreum* (เกษม สร้อยทอง, 2536) *Gliocladium virens* (Ristaino *et al.,* 1994) *Bacillus subtilis* และ *Streptomyces* spp. (เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และอัศนี ปาจีนบูรวรรณ์, 2548) สำหรับการควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธีด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์นั้นยังไม่เป็นที่นิยมแพร่หลาย เนื่องงานวิจัยส่วนใหญ่ยังอยู่ระหว่างการศึกษาหรือผลวิจัยที่ได้ให้ผลในระดับห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองเท่านั้น อารมณ์ โรจน์สุจิตร (2541) รายงานว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของ *R. microporus* ทั้งในจานทดลองและในดินที่บรรจุในหลอดทดลองได้ดี แต่เมื่อทดสอบในสภาพเรือนทดลอง พบว่าไม่สามารถควบคุมโรครากขาวของกล้ายางได้ Jayasuriya และคณะ (2007) รายงานว่า *T. harzianum* (T310) ซึ่งแยกได้จากดินในแปลงปลูกยางพาราจากประเทศศรีลังกา สามารถยับยั้งการเจริญของ *R. microporus* ได้ในระดับห้องปฏิบัติการ และเมื่อ

นำมาทดสอบเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ พบว่า *T. harzianum* (T310) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ T310 ซึ่งประกอบด้วยรำข้าวและมูลสัตว์ มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้าง phialospore ได้จำนวนมาก และสามารถควบคุมโรครากขาวของกล้ายางพาราได้ ในประเทศอินโดนีเซียมีการศึกษาและพัฒนาการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ในรูปการค้าชื่อ ไตรโค เอส พี พลัส (Triko SP plus) สำหรับใช้ร่วมกับผงกำมะถัน โดยใช้ทั้งในระดับต้นกล้าในยางชำถุง ในหลุมปลูกยาง และในแปลงยางใหญ่ (นรินทร์ ศรีปาน, ม.ป.ป.) Kaewchai (2010) ศึกษาเชื้อราต่อต้านที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. microporus* ได้เชื้อจำนวน 30 ไอโซเลท คือ *Acremonium fusidioides* 2 ไอโซเลท, *Aspergillus niger* 2 ไอโซเลท, *Chaetomium aureum* 2 ไอโซเลท, *Ch. bostrychodes* 7 ไอโซเลท, *Ch. cochliodes* 1 ไอโซเลท, *Ch. cupreum* 1 ไอโซเลท, *Ch. fusiforme* 5 ไอโซเลท, *Ch. indicum* 2 ไอโซเลท, *Penicillium canescens* 1 ไอโซเลท, *T. hamatum* 2 ไอโซเลท, *T. harzianum* 2 ไอโซเลท และ *T. viride* 3 ไอโซเลท โดยวิธีการเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA (dual culture) พบว่าจำนวนไอโซเลททั้งหมดของเชื้อ *A. niger, Ch. cochliodes, Ch. bostrychodes, Ch. cupreum ,T. hamatum, T. harzianum* และ *T. viride* ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. microporus* มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในจำนวนนี้ *Trichoderma* ให้เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตสูงสุด รองลงมาคือ *Aspergillus* และ *Chaetomium* โดยเชื้อ *T. viride* STN04, STN05 และ *T. hamatum* STN07 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือ 89.5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเชื้อราต่อต้านจำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. microporus* ซึ่งได้แก่ *A. niger* SN71 และ SN72, *Ch. bostrychodes*, BN08, BN11 และ BS01, *Ch. cupreum* RY202, *T. hamatum* STN07, *T. harzianum* STN01 และ STN02 และ *T. viride* STN04 ไปผลิตสารสกัดหยาบและทดสอบความสามารถในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *R. microporus* พบว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วย hexane จากเชื้อ *Ch. cupreum* RY202 ให้ผลดีที่สุด โดยสามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยบนอาหาร PDA เท่ากับ 82.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol จาก *T. hamatum* STN07 และสารสกัดที่สกัดด้วย ethyl acetate จากเชื้อ *Ch. cupreum* RY202 โดยสามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยบนอาหาร PDA เท่ากับ 80.0 และ 78.0เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า ประสิทธิภาพของ *Ch. cupreum* RY202 ในรูปแบบผงและน้ำมันสามารถลดการเกิดโรครากขาวของยางพาราได้ 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.2 **จุลินทรีย์ปฏิปักษ์** *Streptomyces* spp.

2.2.1 **ลักษณะของ** *Streptomyces* spp.

Streptomyces spp. เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Streptomycetaceae ซึ่งเป็นสกุลที่มีอยู่จำนวนมากและสำคัญที่สุดในแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะคล้ายเชื้อรา อาศัยอยู่ทั่วไปในดิน น้ำ อากาศ ฝุ่นละออง สามารถสร้างเส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ (aerial mycelium) และเจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (substrate mycelium) ลักษณะเส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้นและมีหลายสี เช่น สีดำ ฟ้า น้ำตาล งาช้าง มะกอก ส้ม ม่วง ชมพู แดง ม่วงแดง เหลือง และเหลืองแกมเขียว เป็นต้น (Taddei *et al*., 2006) เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ aerial mycelium จะสร้างสปอร์แบบไม่เคลื่อนที่รูปแบบต่างๆได้แก่ แบบ rectus-flexibilis ซึ่งเป็นสปอร์เส้นตรง(straight) หรือโค้งงอ (flexous) และแบบ spiral สปอร์มีลักษณะวนเกลียว วงกลมปลายเปิด รูปขอ ขดเป็นวงซ้อนกัน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 ไมโครเมตร (อนันต์ วงเจริญ, 2547;Taddei *et al*., 2006) ลักษณะผิวสปอร์มี 5 แบบ คือ ผิวเป็นหนาม (spiny) ผิวเป็นขน (hairy) ผิวเป็นปุ่มปม (warty) ผิวเรียบ (smooth) และผิวย่น (rugose) (Tresner *et al*.,1961) ลักษณะโคโลนีในระยะแรกผิวโคโลนีเรียบ เมื่ออายุมากขึ้น aerial mycelium จะพัฒนามาเป็นสปอร์ ทำให้ผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายแป้ง (powdery) หรือกำมะหยี่ (velvet) มีหลายสี เช่น สีขาว เทา แดง เหลือง น้ำเงิน เขียว และม่วง ซึ่งเป็นสีของสปอร์อยู่ด้านบน ส่วนด้านล่างโคโลนีซึ่งมีเส้นใยเจริญอยู่อาหารมักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อสร้างรงควัตถุเมลานิน (Taddei *et al*., 2006) แต่อาจพบสีอื่นเช่นเดียวกับสีของสปอร์ Swan และคณะ (1994) รายงานว่า *Streptomyces* spp. สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย (anti-bacterial agent) เช่น ampicillin, penicillin-N ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงเบต้าแลคแทม (β-lactam ring) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างเปบติโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย โอลีนโดมัยซิน (oleandomycin) เป็นสารพวกแมคโครไลด์ (macrolide) ผลิตโดย *S. antibioticus* ซึ่งจะจับกับไรโบโซมและยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้อีกหลายชนิด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สารปฏิชีวนะบางชนิดที่ผลิตจากเชื้อในสกุล *Streptomyces* และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

สารปฏิชีวนะ	***Streptomyces* sp. ที่ผลิต**	**เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง**
Amphotericin B	*S. nodosus*	เชื้อรา
Chloramphenical	*S. venezuelae*	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ริกเกตเซีย ไวรัส
Erythromycin	*S. crythreus*	แบคที่เรียแกรมบวกและแกรมลบ และโปรโตซัว
Kanamycin	*S. kanamyceticus*	แบคที่เรียแกรมบวกและแกรมลบ และโปรโตซัว
Vancomycin	*S. orientalis*	แบคที่เรียแกรมบวก
Aureomycin	*S. aureofaciens*	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Streptomycin	*S. griseus*	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Neomycin	*S. fradiae*	แบคทีเรียแกรมลบ
Tetracycline	*S. rimosus*	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Novobiocin	*S. spheroids*	แบคทีเรียแกรมบวก
Coumermycin	*S. rishiriensis*	แบคทีเรียแกรมบวก
Clorobiocin	*S.roseochromogens*	แบคทีเรียแกรมบวก
Lincomycin	*S.lincolnensis*	แบคทีเรีย
Rapamycin	*S. hygroscopisus*	เชื้อรา

ที่มา : อนันต์ วงเจริญ (2547)

2.2.2 การใช้ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

Streptomyces spp. เป็นเชื้อที่มีประโยชน์ทางด้านการเกษตรมาก โดยมีรายงานว่าเชื้อนี้สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เนื่องจากสามารถสร้างสารทุติยภูมิ หรือ bioactive compound ได้หลายชนิด และสามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolytic enzyme เช่น cellulase, hemicellulase, chitinase, amylase, xylanase และ glucanase เป็นต้น ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อรา Walter และ Crawford (1995, อ้างถึงในยศวดี อุดมพิทักษ์เดชา (2552)) รายงานว่า *S. lydicus* WYEC 108 มีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด โดยการสร้างสาร extracellular antifungal

metabolite และเมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่า *S. lydicus* WYEC108 สามารถยับยั้งการงอก oospore ของเชื้อรา *Pythium ultimum* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่าและเมล็ดเน่าของข้าวโพดได้ นอกจากนี้ยังสามารถทำลายผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราได้ ต่อมา Quecine และคณะ (2008) ทดสอบประสิทธิภาพของ *Streptomyces* spp. ในการสร้างเอนไซม์ chitinase มาย่อยสลายเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยการนำเชื้อราสาเหตุโรคมาทดสอบกับน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. พบว่า *S. diastatochromogenes* สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase มาย่อยสลายเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum sublineolum* และ *Pythium* sp.ได้ Prapagdee และคณะ (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสและโรคโคนเน่าของพริกโดยวิธี dual culture และการทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. hygroscopicus* SRA14 พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดได้ดี โดยการสร้างเอนไซม์ chitinase และ β-1,3-glucanase ออกมาย่อยเส้นใยของเชื้อสาเหตุ ทำให้เซลล์ยุบตัวและของเหลวภายในเซลล์ไหลออกมาสู่ภายนอก และยังพบว่า *S. hygroscopicus* SRA14 สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase และ β-1,3-glucanase ได้จำนวนมากเมื่อเจริญอยู่ในระยะ exponential phase – stationary phase

Bordoloi และคณะ (2002) ศึกษาประสิทธิภาพของสาร antibiotic (2-methyl heptylisonicotinate) ซึ่งสกัดได้จาก *Streptomyces* sp. ในการควบคุมเชื้อ *Fusarium* spp. สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชตระกูลกะหล่ำ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. semitectum*, *F. solani* และ *Rhizoctonia solani* ได้ เช่นเดียวกับ Taechowisan และคณะ (2005) ที่รายงานว่าสารปฏิชีวนะ 5,7-dimethoxy-4-p-methoxylphenylcoumarin และ 5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin ที่สกัดจาก *S. aureofaciens* CMUAc130 ที่แยกได้จากรากขิง สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. musae* และ *F. oxysporum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วยและโรคเหี่ยวของข้าวสาลีได้ Ezziyyani และคณะ (2007) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *S. rochei* ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora capsici* สาเหตุโรครากเน่าของพริกไทย โดยใช้ร่วมกับ *T. harzianum* พบว่าสามารถลดปริมาณของเชื้อสาเหตุของโรคได้ 75 เปอร์เซ็นต์ Prabavathy และคณะ (2006) ศึกษาประสิทธิภาพของสาร SPM5C-1 และ SPM5C-2 ที่สกัดได้จาก *Streptomyces* sp. PM 5 ในการยับยั้งโรคไหม้และโรคกาบใบไหม้ของข้าว ที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia grisea* และ *R. solani* ตามลำดับ พบว่า สาร SPM5C-1 ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้อย่างสมบูรณ์

และเมื่อนำสาร SPM5C-1 มาทำการทดสอบในเรือนทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 500 µg/ml พ่นบนต้นข้าวที่เป็นโรค พบว่าสามารถลดการเกิดโรคไหม้และโรคกาบใบไหม้ของข้าวได้ 76.1 เปอร์เซ็นต์ และ 82.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Zarandi และคณะ (2009) รายงานว่าเมื่อนำสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ของข้าวมาผสมกับเชื้อ *S. sindeneusis* แล้วนำไปพ่นบนต้นกล้าของข้าวทำให้ต้นกล้าเกิดอาการไหม้น้อยลง Boukaew และคณะ (2011) ทดสอบประสิทธิภาพของ *S. mycarofaciens* และ *S. philanthi* ในการยับยั้งเชื้อ *Sc. rolfsii* และ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรครากและโคนเน่าและโรคเหี่ยวเขียวของพริก ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ *T. harzianum* และสารคาร์บอกซิน ในสภาพเรือนทดลองและแปลงทดลอง ผลการทดลองพบว่าจากการศึกษาในเรือนทดลอง เชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของโรครากและโคนเน่าได้เทียบเท่ากับการใช้ *T. harzianum* และสารคาร์บอกซิน ส่วนการใช้ *S. philanthi* ร่วมกับ *S. mycarofaciens* สามารถยับยั้งโรคเหี่ยวเขียวในระยะต้นกล้าเทียบเท่ากับการใช้สารสเตรปโตมัยซินซัลเฟต ส่วนในแปลงทดลองพบว่าเชื้อ *S. philanthi* ไอโซเลทที่ 1 สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ *Sc. rolfsii* และ *Ral. solanacearum* ในต้นพริกได้ดี Gopalakrishnan และคณะ (2011) ศึกษาประสิทธิภาพและคุณสมบัติของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากไส้เดือนในปุ๋ยหมักสมุนไพร เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* สาเหตุโรค Fusarium wilt ในถั่วเขียว ด้วยวิธี dual-culture พบว่ามีเชื้อ *Streptomyces* spp. 5 ไอโซเลท (*S. tsusimaensis* CAI-24, *S. caviscabies* CAI-121, *S. setonii* CAI-127, *S. africanus* KAI-32 และ *Streptomyces* KAI-90) ที่สามารถยับยั้งเชื้อโรคดังกล่าวได้ และเมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* spp. ดังกล่าวมาทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารชนิดต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการยับยั้งเชื้อราและส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่ามี *Streptomyces* spp. 4 ไอโซเลทที่สร้าง siderophore, hydrocyanic acid ได้แก่ CAI-24, CAI-121, CAI-127 และ KAI-32 ส่น KAI-90 ไม่สร้างสารดังกล่าวแต่สามารถสร้าง indole acetic acid ได้ ส่วนไอโซเลทที่สร้าง cellulase ได้แก่ KAI-32 และ KAI-9 และไอโซเลทที่สร้าง protease ได้แก่ CAI-24 และ CAI-1270 Xue และคณะ (2013) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินรอบรากพืชเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ *Verticillium dahlia* สาเหตุโรค Verticillium wilt ของฝ้าย พบว่ามี *Streptomyces* spp. 4 ไอโซเลท (*S. cyaneofuscatus* ZY-153, *S. kanamyceticu* B-49, *S. rochei* X-4 และ *S. flavotricini* Z-13) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้ดี โดยการสร้างเอนไซม์ chitinase, β-1,3-glucosidase, cellulase และ

protease ออกมายับยั้งการเจริญและย่อยเส้นใยเชื้อรา *Verticillium dahlia* นอกจากนี้ยังพบว่า *Streptomyces* spp. 4 ไอโซเลท สามารถสร้าง siderophores และ indole acetic acid (IAA)ได้อีกด้วย และเมื่อนำ *Streptomyces* spp. 4 ไอโซเลท มาทดสอบการควบคุมโรค Verticillium wilt ในเรือนกระจก พบว่าสามารถควบคุมโรคได้ตั้งแต่ 18.70 - 65.80 เปอร์เซ็นต์ โดย *S. rochei* X-4 สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด

เชื้อ *Streptomyces* spp. บางชนิดยังมีคุณสมบัติในการช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ Khamna และคณะ (2010) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรบางชนิดในประเทศไทย ในการส่งเสริมการงอกและความยาวของรากข้าวโพดและถั่ว โดยนำเมล็ดข้าวโพดและถั่วมาแช่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml เปรียบเทียบกับการแช่เมล็ดใน standard IAA ความเข้มข้น 50 µg/ml และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบว่า *Streptomyces* sp. สามารถผลิตสารฮอร์โมน Indole-3-acetic acid ที่ช่วยส่งเสริมการงอกและความยาวของรากข้าวโพดและถั่วได้ ซึ่งเมล็ดข้าวโพดและเมล็ดถั่วที่แช่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. มีเปอร์เซ็นต์การงอกเทียบเท่ากับเมล็ดที่แช่ใน standard IAA แต่มีความยาวของรากมากกว่าเมล็ดที่แช่ใน standard IAA และในน้ำกลั่น นอกจากนี้มีการนำ *Streptomyces* spp. มาศึกษาและพัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชชนิดต่างๆอีกหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช

Streptomyces spp.	ยับยั้งโรคพืช	เชื้อสาเหตุ	ที่มา
S. pulcher,	*Fusarium* and	*Fusarium oxysporum*	El-Abyad *et al*.,1993
S. canescens	*Verticillium* wilts	f.sp. *lycopersici,*	
S. citreofluorescens		*Verticillium albo-atrum*	
Streptomyces sp.	Clubroot	*Plasmodiophora brassicae*	Cheah *et al*., 2000
S. viridodiasticus	Basal drop	*Sclerotinia minor*	Tarabily *et al*., 2000
S.diastatochromogenes PonSSII	Potato scab	*Streptomyces scabies*	Neeno *et al*., 2001
S. cyanoviridis,	Root rot disease	*Plectosporium tabacinum*	Youssef *et al*., 2001
S. murinus			
S. grisoplanus			

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Streptomyces spp.	ยับยั้งโรคพืช	เชื้อสาเหตุ	ที่มา
S. hygrosscopicus	Rice sheath blight seedling blight	*Pellicularia sasakii* *P. filamentosa*	Pang *et al*., 2002
Streptomyces spp.	*Phytophthora* root rot	*Phytophthora medicaginis* *Ph. sojae*	Xiao *et al*., 2002
S. padanus	Damping-off of cabbage	*Rhizoctonia solani*	Shih *et al*., 2003
Streptomyces sp. S30	Damping-off	*Rhizoctonia solani*	Cao *et al*., 2004
Streptomyces sp. g10	Fusarium wilt	*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*	Getha *et al*., 2005
Streptomyces sp. DAUFPE 11470 and DAUFPE 14632	Ear rot of maize	*Stenocarpella maydis*	Bressan and Figueiredo, 2005
S. halstedii	Phytophthora blight	*Phytophthora capsici*	Joo, 2005
S. olivaceus	Rhizoctonia root rot	*Rhizoctonia solani*	Shahrokhi *et al*., 2005
Streptomyces spp.	Stem rot of melon	*Macrophomina phaseolina*	Etebarian, 2006
Streptomyces sp. 3	Fusarium head blight	*Fusarium graminearum*	Nourozian *et al*., 2006

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Streptomyces spp.	ยับยั้งโรคพืช	เชื้อสาเหตุ	ที่มา
S. violaceusniger XL-2	Wood-rotting	*Phanerochaete chrysosporium*	Shekhar, 2006
Streptomyces spp.	Damping-off	*Sclerotium rolfsii*	Errakhi *et al*., 2007
S. platensis F-1	Leaf blight/seedling blight fruit rot	*Rhizoctonia solani* *Botrytis cinerea*	Wana *et al*., 2008
Streptomyces spp.	White cottony stem rot	*Sclerotinia sclerotiorum*	Tahtamouni *et al*., 2009
S. alni	root-rot	*Fusarium oxysporum*	El-Sayed, 2010
Streptomyces sp. 422	Stem rot of oilseed rape	*Sclerotinia sclerotiorum*	Baharlouei *et al*., 2011
S. globisporus JK-1	Blast	*Magnaporthe oryzae*	Li *et al*., 2011
Streptomyces spp.	Damping-off	*Sclerotium rolfsii*	Errakhi *et al*., 2007
S. toxytricini vh6, *S. flavotricini* vh8, *S. toxytricini* vh22, *S. avidinii* vh32, *S. tricolor* vh85 *Streptomyces* sp. vh41	Soilborne disease	*Rhizoctonia solani*	Patil *et al*., 2011
Streptomyces sp. A6	Fusarium wilt	*Fusarium udum*	Singh and Chhatpar, 2011
S. mycarofaciens *S. philanthi*	Sclerotium root and Stem rot and Ralstonia wilt	*Sclerotium rolfsii* *Ralstonia solanacearum*	Baukaew *et al*., 2011
S. globisporus JK-1	Grey mold	*Botrytis cinerea*	Li *et al*., 2012

2.3 การผลิตจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปของสารชีวภัณฑ์

ปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิด มาพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบของสารชีวภัณฑ์เนื่องจากการผลิตในรูปแบบสารชีวภัณฑ์จะทำให้เกิดความสะดวกต่อการนำไปใช้ ตัวอย่างสารชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เช่น *T. harzianum* ได้แก่ F-stop® และ ยูนิเซฟ® *B. subtilis* ได้แก่ ลาร์มินา® *Pseudomonas fluorescens* ได้แก่ Top A506® และ *Streptomyces griseoviridis* ได้แก่ Mycostop® การผลิตสามารถผลิตได้หลายรูปแบบ เช่น การผลิต *Trichoderma* sp. ในรูปแบบแกรนูลและแบบเม็ด (Dubey *et al.,* 2009) แบบผงที่เป็นหัวเชื้อแล้วนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อสดสำหรับใช้งาน (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2551) โดยในแต่ละสูตรของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตัวเดียวกันนั้น อาจมีประสิทธิภาพสูงหรือต่ำแตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาวิธีการผลิตสูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และแนวทางการใช้งานที่เหมาะสมเพื่อความสะดวกต่อการใช้งานในแปลงเกษตรกร ทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเพื่อทำการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

การผลิต *Streptomyces* spp. ในรูปของสารชีวภัณฑ์และสูตรสำเร็จ

Sabaratman และ Traquair (2002) ศึกษาการผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces* sp.ในรูปแบบแกรนูล แบบเม็ด และแบบผงละลายน้ำ เพื่อควบคุมรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคเน่าระดับคอดินของมะเขือเทศ ผลการทดสอบพบว่า สูตรสำเร็จแบบผงละลายน้ำ สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด โดยสามารถควบคุมได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบบเม็ดและแบบแกรนูลควบคุมได้ 30 และ 22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Minuto และคณะ (2006) รายงานว่า Mycostop® เป็นสารชีวภัณฑ์ทางการค้าที่ผลิตจาก *S. griseoviridis* K61 ซึ่งคัดเลือกได้จาก Sphagnum peat สามารถใช้ในการควบคุมโรครากเน่าและโรคเหี่ยวของพืชได้ โดย *S. griseoviridis* K61 จะไปอาศัยอยู่ในดินบริเวณผิวรากของพืช และจากการศึกษาการใช้ Mycostop® ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคของมะเขือเทศ (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopercici*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* พบว่า Mycostop® เป็นสารชีวภัณฑ์ที่สามารถควบคุมโรครากเน่าและโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Anitha และ Rabeeth (2009) ศึกษาการผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อ *S. griseus* รูปแบบผงโดยใช้ทัลคัมเป็นสารประกอบหลัก สำหรับใช้ควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในสภาวะเรือนกระจก พบว่ากรรมวิธีที่ใช้สูตรสำเร็จมะเขือเทศมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 26.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 61.10 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่า *S. griseus* ในสูตรสำเร็จมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้นและจะคงที่ในวันที่ 105 โดยมีจำนวนประชากรเท่ากับ 1.22 x 10^9 cfu/g เมื่อนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Haggag และ Abdall (2011) ศึกษาการผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อ *S. aureofaciens* รูปแบบผงโดยใช้ alginate และ starch เป็นสารประกอบหลัก สำหรับใช้ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง โดยใช้สูตรสำเร็จที่ความเข้มข้น 5x10^6 cfu/ ml พ่นพุ่มมะม่วง 5 สายพันธุ์ได้แก่ Ewais, Seddekia, Taimour, Zebda และ Alphonso พบว่า สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในมะม่วงสายพันธุ์ Ewais, Seddekia และTaimour ส่วนในมะม่วงสายพันธุ์ Zebda และ Alphonso สามารถควบคุมโรคได้ 97.4 และ 99.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.4 ผลิตภัณฑ์รูปแบบแกรนูล

ผลิตภัณฑ์แกรนูล คือผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่เป็นผงปริมาณมากที่มีลักษณะเป็นผงขนาดใหญ่หรือผงที่เกาะกันเป็นก้อนเล็กๆ รูปร่างต่างๆกันมีขนาดประมาณ 2-4 มิลลิเมตร หรือเท่ากับแร่งขนาดเบอร์ 4-12 ผลิตภัณฑ์รูปแบบแกรนูลมีข้อดีกว่าแบบผง คือ คงตัวดีกว่าเพราะมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอากาศน้อยกว่า ไม่จับเกาะกันเป็นก้อนแข็งเหมือนแบบผง เปียกน้ำง่ายกว่าแบบผง (อัจฉรา อุทิศวรรณกุล, 2536) และไม่ฟุ้งกระจาย ซึ่งสะดวกต่อการนำไปใช้ นอกจากนี้ขั้นตอนในการผลิตไม่ยุ่งยาก และต้นทุนในการผลิตน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบผลิตภัณฑ์แบบเม็ดจึงได้รับความสนใจในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูล เพื่อควบคุมโรคพืชอย่างแพร่หลาย โดยอมรรัตน์ ชุมทอง (2547) พบว่าการใช้ผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. firmus* ในรูปแบบผงคลุกเมล็ดร่วมกับแกรนูลละลายน้ำสำหรับฉีดพ่น สามารถควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ *R. solani* ที่เป็นสาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งได้ดี เช่นเดียวกับการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา iprodione และส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วหรั่งได้ Wiwattanapatapee และคณะ (2007) พัฒนาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* เป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบแกรนูลฟู่สำหรับหว่านหรือฉีดพ่น ซึ่งมีส่วนประกอบของ citric acid, tartaric acid และ sodium bicarbonate พบว่าสามารถควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ที่เป็นสาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวในสภาพเรือนทดลองได้ดี มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่รอดบนใบและกาบใบข้าวสูง และมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสูตรตำรับสูงถึง 10^9 cfu/g หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 12 เดือน และ วานิด รอดเนียม (2552) ได้พัฒนาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบ

แกรนูลละลายน้ำ ซึ่งมีส่วนประกอบของ sodium alginate, PVP (k-30) และ lactose monohydrate พบว่าสามารถควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ได้ดี มีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดบนใบผักสลัดสูงหลังจากพ่นเป็นเวลา 10 วัน และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในสูตรสำเร็จในปริมาณสูงและค่อนข้างคงตัว

2.5 ผลิตภัณฑ์รูปแบบผง

ผลิตภัณฑ์แบบผง คือผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่เป็นผงละเอียดซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมต่างๆ มีขั้นตอนการผลิตที่ง่าย สะดวกต่อการนำไปใช้ แต่ค่อนข้างฝุ่งกระจาย และจับตัวกันเป็นก้อน (อัจฉรา อุทิศวรรณกุล, 2536) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์แบบผงกันอย่างแพร่หลาย เช่น Srinivasan และ Mathivanan (2009) นำจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความเข้ากันได้และมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting microbial consortia: PGPMCs) มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์แบบผง เพื่อใช้ในการควบคุมโรค sunflower necrosis virus ซึ่งทดสอบโดยการคลุกเมล็ด ผสมกับดินปลูก และพ่นใบพบว่าผลิตภัณฑ์สูตร PGPMC-1 ที่ประกอบด้วย talcum และสารแขวนลอยของเชื้อ *B. licheniformis* strain MML2501 + *Bacillus* sp. strain MML2551 + *Pseudomonas aeruginosa* strain MML2212 +*S. fradiae* strain MML1042 สามารถลดการเกิดโรคได้ 40.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและยังทำให้เมล็ดของทานตะวันมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงถึง 92.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การงอกเพียง 75.2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังช่วยให้เกษตรกรได้ผลผลิตสูงกว่าการใช้สารเคมีในการกำจัดโรค Wijesinghe และคณะ (2011) ได้นำเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* มาพัฒาเป็นผลิตภัณฑ์แบบผงโดยใช้ talc powder และ carboxymethyl cellulose ผสมกับสปอร์แขวนลอยของเชื้อ เพื่อนำมาใช้ควบคุมเชื้อ *Thielaviopsis paradoxa* สาเหตุโรคเน่าดำของสับปะรดโดยทดสอบในดินในหลอดทดลอง พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 52,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Gnanamangai และ Ponmurugan (2012) นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 5 ชนิด (*P. fluorescens*, *B. subtilis*, *T. atroviride*, *T. harzianum* และ *S. sannanensis)* มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์แบบผงเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ *Cercospora theae* สาเหตุโรคใบจุดตานกของใบชาโดยวิธีการพ่นใบ เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี พบว่าผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *P. fluorescens* และ *S. sannanensis* สามารถควบคุมโรคได้ไม่แตกต่างทาง

สถิติกับการใช้สารเคมี และการใช้ผลิตภัณฑ์จากเชื้อ *S. sannanensis* ยังให้ผลผลิตของใบชาได้ไม่แตกกับการใช้สารเคมี

2.6 สารประกอบสำหรับผลิตสูตรสำเร็จ

ในการเตรียมสูตรสำเร็จเพื่อควบคุมโรคพืชนั้น นอกจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แล้วยังประ กอบด้วยสารช่วย (excipients) ซึ่งทำหน้าที่ต่าง ๆ กัน ได้แก่ สารเพิ่มปริมาณ (fillers หรือ diluent) สารยึดเกาะ (binders) สารช่วยแตกกระจายตัว (disintegrants) และสารช่วยไหล (glidant)

2.6.1 สารเพิ่มปริมาณ

สารเพิ่มปริมาณเป็นสารที่เติมลงไปในสูตรสำเร็จ เพื่อเพิ่มขนาดหรือน้ำหนักของแกรนูล โดยสารเพิ่มปริมาณต้องมีคุณสมบัติสามารถเข้ากันได้กับตัวยาและสารประกอบอื่นในสูตรสำเร็จ ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาใดๆ มีความคงตัว ไม่ดูดความชื้น มีการไหลที่ดี ราคาไม่สูง และทำให้แกรนูลมีความแข็งที่เหมาะสม มีการแตกตัวดี ตัวอย่างสารเพิ่มปริมาณ ได้แก่ lactose, sucrose, dextrose, starch, mannitol, sorbitol, calcium sulfate, dibasic calcium phosphate, tribasic calcium phosphate และ microcrystalline cellulose เป็นต้น โดยเฉพาะ lactose เป็นสารเพิ่มปริมาณที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากสามารถละลายน้ำได้ดี มีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลตัวอื่น และราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับสารเพิ่มปริมาณชนิดอื่น lactose เป็นน้ำตาลที่ได้จากน้ำนม ผลิตได้จากการตกผลึกของน้ำนม ซึ่งเหลือจากการทำเนยแข็ง การใช้ lactose ในสูตรสำเร็จโดยส่วนใหญ่จะช่วยให้มีการปลดปล่อยตัวยาออกจากเม็ดเร็ว และทำให้แกรนูลแห้งง่าย ซึ่งแกรนูลที่ได้จาก lactose มีความชื้นระหว่าง 4-5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมากให้การแตกตัวเร็ว มีความกร่อนน้อย น้ำหนักของเม็ดมีความเบี่ยงเบนน้อย (มนต์ชุลี นิติพน, 2534)

2.6.2 สารยึดเกาะ

สารยึดเกาะ (binders) เป็นสารที่เพิ่มแรงเกาะกันของผง ทำให้เกิดการเกาะกันเป็นแกรนูลภายใต้แรงตอกทำให้อัดกันเป็นเม็ดได้และทำให้ได้แกรนูลที่สม่ำเสมอ มีความแข็งเพียงพอและเหมาะสมต่อการตอก โดยคุณสมบัติของสารยึดเกาะที่ดีต้องสามารถเข้ากันได้กับสารตัวอื่นในสูตรสำเร็จ ให้แรงยึดเกาะเพียงพอในการทำให้ผงจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการต่างๆในการผลิตได้ สารยึดเกาะที่ใช้มีหลายชนิด ทั้งที่เป็นพวกน้ำตาลและสารประกอบเชิงซ้อนประเภทที่ได้จากธรรม ชาติ เช่น acacia, gelatin, starch, glucose, sucrose และ gum tragacanth และสารที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น polyvinylpyrolidone (PVP), methyl cellulose เป็นต้น แต่ที่นิยมใช้

มากที่สุดในปัจจุบันคือ polyvinylpyrolidone ซึ่งเป็นสารยึดเกาะที่ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและแอลกอฮอล์ โดยทั่วไปการทำแกรนูลของผงจุลินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำควรใช้ PVP ในรูปสารละลายในน้ำหรือแอลกอฮอล์ ส่วนการทำแกรนูลซึ่งละลายน้ำควรใช้ PVP ในรูปสารละลายในแอลกอฮอล์ โดยใช้ในความเข้มข้น 3-15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้ได้แกรนูลที่ดี แห้งง่าย ตอกได้ดี (มนต์ชุลี นิติพน, 2534)

2.6.3 **สารช่วยแตกกระจายตัว**

สารช่วยแตกกระจายตัว เป็นสารช่วยให้แกรนูลเกิดการแตกตัว หรือกระจายตัวได้ในเวลาอันสมควรเมื่อแกรนูลสัมผัสกับสารละลายหรือน้ำ การผสมสารช่วยในการแตกตัวอาจทำได้โดยผสมในขั้นตอนก่อนทำเป็นแกรนูลหรือผสมในขั้นตอนเป็นแกรนูลแล้ว หรืออาจแบ่งผสมทั้งสองขั้นตอน ตัวอย่างของสารที่ช่วยในการแตกตัว เช่น

starch นิยมใช้กันมาก โดยทั่วไปถ้าหากยิ่งมีปริมาณของ starch ในตำรับมากยิ่งทำให้มีการแตกตัวที่เร็วขึ้น แต่ปัญหาที่ตามมาคือการเกาะตัวกันและความแข็งของแกรนูลจะลดน้อยลง

alginate เป็นสารช่วยในการแตกตัว อยู่ในกลุ่ม hydrophilic colloid substances มีจำหน่ายในรูปของ alginic acid หรือเกลือของ alginic acid โดยเฉพาะในรูปของเกลือ sodium มีคุณสมบัติในการชอบน้ำมากกว่าพวกแป้ง ปริมาณที่ใช้ในตำรับนั้นสำหรับ alginic acid จะใช้ในปริมาณ 1-5 เปอร์เซ็นต์ ส่วน sodium alginate อยู่ที่ 2.5-10 เปอร์เซ็นต์

gum เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการพองตัวในน้ำได้ รวมทั้งเป็นตัวช่วยยึดเกาะที่ดี ปริมาณที่ใช้ 1-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเม็ดยา ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่ agar, pectin และ tragacanth เป็นต้น (จักรพันธ์ ศิริธัญญาลักษณ์, 2538)

2.6.4 **สารช่วยไหล**

สารช่วยไหล (glidant) เป็นสารที่ใส่ลงไปในสูตรสำเร็จ เพื่อเพิ่มการไหลโดยการลดแรงเสียดทานระหว่างอนุภาค ทำให้แกรนูลไหลจาก hopper ลงมาสู่เบ้าได้อย่างสม่ำเสมอ ทำให้ได้แกรนูลที่มีน้ำหนักสม่ำเสมอ สารที่ใช้ในการช่วยไหล เช่น starch, talc, colloidal silicon dioxide, silicate และ calcium phosphate (มนต์ชุลี นิติพน, 2534) ซึ่งสารที่ช่วยในการไหลต้องไม่ทำให้ความคงตัวทั้งทางด้านกายภาพและทางเคมี ของแกรนูลเปลี่ยนแปลงไป (จักรพันธ์ ศิริธัญญาลักษณ์, 2538)

3.วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

3.1 เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพาราในระดับห้องปฏิบัติการ

3.2 เพื่อผลิตสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลและแบบผง สำหรับควบคุมเชื้อรา *R. microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพาราในระดับห้องปฏิบัติการ

3.3 เพื่อทราบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ รูปแบบแกรนูลและแบบผง ในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราในเรือนทดลอง

บทที่ 2
วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์

1.1 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ฟลาสก์ บีกเกอร์ กระบอกตวง haemacytometer แผ่นสไลด์ และ cover slip เป็นต้น

1.2 อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย ลูป มีดผ่าตัด แท่งแก้วสามเหลี่ยม ปากคีบ cork borer ตะเกียงแอลกอฮอล์ และอื่น ๆ

1.3 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 20, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร

1.4 ตู้ปลอดเชื้อ (larminar air flow cabinet)

1.5 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

1.6 ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)

1.7 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

1.8 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

1.9 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

1.10 เครื่องแร่งแกรนูลชนิดเปียกและแห้ง (wet and dry granulator)

1.11 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

1.12 กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo

1.13 เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น

1.14 เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixture)

1.15 เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (analytical balance)

1.16 ตู้เย็น

1.17 ไมโครเวฟ

1.18 กล้องถ่ายรูป

2. วัสดุเกษตรที่ใช้ในการปลูกพืชทดสอบ
   2.1 ต้นกล้ายางพารา
   2.2 กระถาง
   2.3 ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15
   2.4 ป้ายพลาสติก
   2.5 ดินผสม
3. อาหารเลี้ยงเชื้อราและอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
   3.1 potato dextrose agar (PDA)
   3.2 potato dextrose broth (PDB)
   3.3 glucose yeast and malt extract(GYM)
4. สารสำหรับเตรียมสูตรสำเร็จ
   4.1 สารเพิ่มปริมาณ น้ำตาล lactose
   4.2 สารปรับความเป็นกรด-ด่าง
   4.3 สารช่วยแตกกระจายตัว alginate
   4.4 สารช่วยยึดเกาะ polyvinylpyrolidone (PVP)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. agar
2. lactophenol cotton blue
3. arabinose
4. mannitol
5. beef extract
6. $MgSO_4.7H_2O$
7. bromthymol blue
8. NaCl
9. $CaCO_3$
10. xylose
11. yeast extract
12. เอทธานอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
13. casein acid hydrolysate

14. colloidal chitin
15. dextrose
16. HCl
17. gelatin
18. skim milk
19. glucose
20. peptone
21. iodine
22. K_2HPO_4
23. $(NH_4)_2SO_4$
24. $K_2HPO_4.3H_2O$
25. $MgSO_4.7H_2O$
26. $CuSO_4.5H_2O$
27. $FeSO_4.7H_2O$
28. $MnCl_2.4H_2O$
29. $ZnSO_4.7H_2O$

วิธีการดำเนินการ

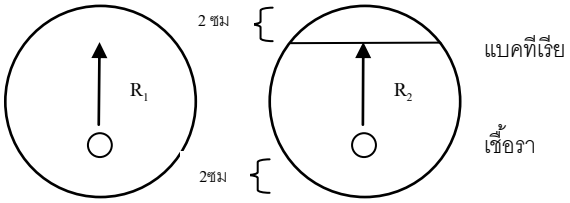
1. การเก็บตัวอย่างดินและแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

เก็บตัวอย่างดินจากสวนยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งเลือกเก็บดินจากแปลงปลูกยางพาราที่มีความอุดมสมบูรณ์ โดยขุดลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร เก็บแปลงละ 5 จุด ๆ ละประมาณ 100 กรัม รวม 500 กรัม คลุกให้เข้ากัน ผึ่งให้แห้ง นำมาแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ด้วยวิธี dilution spread plate โดยชั่งดิน 1 กรัมผสมในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มิลลิลิตร เจือจางที่ 10^{-3} 10^{-4} และ10^{-5} หยดดินแขวนลอยบนอาหาร glucose yeast extract malt extract agar (GYMA) ในจานเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยด้วยแท่งแก้ว บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน เลือกเก็บโคโลนีของ *Streptomyces* spp. ซึ่งผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายแป้งหรือกำมะหยี่มีหลายสี เช่น สีขาว เทา แดง เหลือง น้ำเงิน เขียว และม่วง เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการ การควบคุมโรครากขาวของยางพาราโดยชีววิธีและการคัดเลือกสายพันธุ์ยางต้านทานโรคเพื่อผลิตต้นตอพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี dual culture plate โดยเลี้ยงเชื้อรา *R. microporus* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน และเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. จากข้อ 1 ในอาหาร GYMA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา นำไปวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร พร้อมทั้งขีดเชื้อ *Streptomyces* spp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในแนวตรงข้ามชิ้นวุ้นเชื้อราและห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร โดยในแต่ละไอโซเลททำ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน วัดบริเวณยับยั้งและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และ สมบัติ ศรีชูวงศ์, 2546)

จากสูตรเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $\frac{(R_1 - R_2)}{R_1} x100$



ชุดควบคุม ชุดทดสอบ

R_1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R_2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

คัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ดีที่สุดจำนวน 2 ไอโซเลท เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp.ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในดินในหลอดทดลอง (ดัดแปลงจาก อารมณ์ โรจน์สุจิตร, 2541)

การเตรียมเชื้อรา เลี้ยงเชื้อรา *R. microporus* บนอาหาร PDA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดทดสอบขนาด 2.5X15 เซนติเมตร บ่มไว้เป็นเวลา 5 วัน

การเตรียมดิน นำดินมาผึ่งให้แห้งผสมด้วยแกลบอัตรา 9 : 1 โดยน้ำหนัก แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 30 นาที

การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* spp. นำข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมกับแบคทีเรียแขวนลอย *Streptomyces* spp. จากข้อ 2 ที่ความเข้มข้น $6x10^6$ cfu/ml. ที่ 2 McFarland อัตรา 100 : 20 (กรัม: มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เจริญบนข้าวฟ่างมาผสมกับดินที่ฆ่าเชื้อแล้วอัตรา 10 : 100 โดยน้ำหนัก ซึ่งได้ความเข้มข้นสุดท้าย $2x10^4$ cfu/g. จากนั้นบรรจุลงในหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อ *R. microporus* ให้สูง 10 เซนติเมตร ปิดปากหลอดด้วยจุกสำลีและกระดาษอลูมิเนียม ใช้ดินนึ่งฆ่าเชื้อที่ไม่ผสมเชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นชุดควบคุม เตรียมชุดทดสอบ 2 ชุด ๆ ละ 5 ซ้ำ โดยชุดที่ 1 วางเลี้ยงในสภาพได้รับแสงสว่างตามปกติประมาณวันละ 12 ชั่วโมง ส่วนชุดที่ 2 วางเลี้ยงในที่มืด บันทึกผลโดยการวัดความยาวของเส้นใยเชื้อ *R. microporus* ที่เจริญในหลอดทดลองทุกวันจนเชื้อในหลอดชุดควบคุมเจริญเต็มหลอด คัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* sp. เพียงชนิดเดียวเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

4. การจำแนกชนิดของเชื้อ *Streptomyces* sp.

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

นำเชื้อ *Streptomyces* sp. อายุ 24-48 ชั่วโมง ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ที่คัดเลือกได้จากจากข้อ 3 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังต่อไปนี้

4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อ *Streptomyces* sp. มาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร GYMA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน ศึกษาลักษณะโคโลนี สีโคโลนี รูปร่างและขนาดของเซลล์ การผลิตสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

4.1.2 การติดสีแกรม

การทดสอบการติดสีแกรม กระทำตั้งแต่ระยะการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น โดยนำเชื้อแต่ละไอโซเลตมาเกลี่ยเป็นผิวบาง (smear) บนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ปล่อยให้แห้ง จากนั้นตรึงด้วยความร้อนโดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หยด crystal violet บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง หยดสารละลาย Lugol's iodine ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกด้วยเอทิลแอลกอออล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที ล้างน้ำสะอาด หยด safranin บนรอยเกลี่ย ประมาณ 15-30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายของเลนส์วัตถุ 100 เท่า ถ้าเชื้อแบคทีเรียเป็นแกรมบวกจะติดสีม่วงของ crystal violet และแกรมลบจะติดสีแดงของ safranin

4.1.3 การทดสอบการย่อยเคซีน (Casein Test)

4.1.3.1 การเตรียมเชื้อ *Streptomyces* sp.

นำเชื้อ *Streptomyces* sp. สตรีคบนอาหาร GYMA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน แตะเชื้อ 2 ลูปลงในฟลาสก์ ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน แล้วถ่ายกล้าเชื้อ 5% v/v ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYM อยู่ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

4.1.3.2 การทดสอบ ทดสอบด้วยอาหาร casein agar (ภาคผนวก ก) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเจาะวุ้นให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อ *Streptomyces* sp. จากข้อ 4.1.3.1 หยดลงในหลุมจำนวนหลุมละ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจดูการย่อยสลายเคซีน ทุก 2-3 วัน โดยดูจากวงใสรอบๆ บริเวณที่เชื้อเจริญหรือตรงใต้โคโลนี

4.1.4 การทดสอบการย่อยเจลาติน (Gelatin Liquefaction Test)

ทดสอบด้วยอาหาร gelatin media (ภาคผนวก ก) ในหลอดทดลอง โดย stab เชื้อ *Streptomyces* sp. จากข้อ 4.1.3.1 ลงในหลอด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจดูการย่อยเจลาตินทุกสัปดาห์ โดยนำหลอดเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง ถ้าแข็งตัวแสดงว่าเจลาตินยังไม่ถูกย่อย ให้นำอาหารนั้นไปบ่มต่อ และทดสอบซ้ำในสัปดาห์ต่อไป ถ้าเจลาตินอยู่ในสภาพเหลวหลังจากนำเข้าตู้เย็นแสดงผลเป็นบวก

4.1.5 การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis test)

ทดสอบด้วยอาหาร starch agar (ภาคผนวก ก) จานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเจาะวุ้นให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อ *Streptomyces* sp. จากข้อ 4.1.3.1 หยดลงในหลุมจำนวนหลุมละ 20 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการย่อยแป้ง โดยเท Lugol's iodine ให้ท่วมผิวอาหาร ถ้ามีการย่อยแป้งจะเกิดวงใสรอบโคโลนี เนื่องจากแป้งบริเวณนั้นถูกย่อยหมดไป (แสดงผลบวก)

4.1.6 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ chitinase

ทดสอบด้วยอาหาร M9 medium agar ผสม 2.4% colloidal chitin (ภาคผนวก ก) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเจาะวุ้นให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อ *Streptomyces* sp. จากข้อ 4.1.3.1 หยดลงในหลุมจำนวนหลุมละ 20 ไมโครลิตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยการราด 0.1% congo red ให้ท่วมอาหาร ถ้ามีวงใสรอบหลุมที่หยดเชื้อ แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ออกมาย่อย chitin ได้ ให้ผลเป็นบวกถ้าเป็นสีแดงทั้งหมดแสดงว่าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ให้ผลเป็นลบเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

4.1.7 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ cellulase

ทดสอบด้วยอาหาร carboxyl methyl cellulose (CMC) agar (ภาคผนวก ก) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเจาะวุ้นให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อ *Streptomyces* sp. จากข้อ 4.1.3.1 หยดลงในหลุมจำนวนหลุมละ 20 ไมโครลิตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วันตรวจผลโดยการราด 0.1% congo red ให้ท่วมผิวอาหารถ้ามีวงใสรอบหลุมที่หยดเชื้อ แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์ cellulase ออกมาย่อย cellulose ได้ ให้ผลเป็นบวก ถ้าเป็นสีน้ำตาลทั้งหมดแสดงว่าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ให้ผลเป็นลบเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

4.1.8 การทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon utilization)

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. บนอาหาร GYMA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นใช้ลูปแตะสปอร์ของเชื้อมาขีดเป็นแนวตรง 2 แนว บนผิวหน้าอาหาร basal medium ซึ่งเติมคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ D-glucose, fructose, mannitol, sucrose, xylose, L-rhamnose, D-galactose L(+)arabinose, L-histidine, dextran และ cellobios ความเข้มข้นสุดท้าย 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน ตรวจผลโดยใช้ D-glucose เป็น positive control และอาหาร basal medium ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนเป็น negative control ถ้าการเจริญของเชื้อมากกว่า negative control ให้ผลเป็นบวก ถ้าเชื้อเจริญน้อยกว่าหรือเท่ากับ negative control ให้ผลเป็นลบ และถ้าเชื้อเจริญมากกว่า negative control เล็กน้อยให้ผลการทดลองเป็นบวก/ลบ

4.1.9 การทดสอบการใช้ไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. บนอาหาร GYMA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน จากนั้นใช้ลูปแตะสปอร์ของเชื้อมาขีดเป็นแนวตรง 2 แนว บนผิวหน้าอาหาร basal medium ซึ่งเติมไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ asparagine, potassium nitrate, ammonium chloride, ammonium sulfate, glycine, urea, L-arginine และ β-alanine ความเข้มข้นสุดท้าย 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน ตรวจผลเช่นเดียวกับข้อ 4.1.8

4.1.10 การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ ความเป็นกรด – ด่าง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ

การทนเกลือ เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ในอาหาร GYMA ที่มีระดับความเข้มข้นของ NaCl 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลภายใน 2 สัปดาห์

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ในอาหาร GYMA นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่ระดับอุณหภูมิ 4, 15, 35 และ 45 องศาเซลเซียส pH 7 ตรวจผลภายใน 2 สัปดาห์

ความเป็นกรด – ด่าง เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp.ในอาหาร GYMA pH 4, 6, 8 และ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลภายใน 2 สัปดาห์

ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp.ในอาหาร GYMA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลภายใน 2 สัปดาห์

4.2 ส่งจำแนกเพื่อยืนยันเชื้อ *Streptomyces* sp.

นำเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่คัดเลือกได้จากจากข้อ 3 ไปจำแนกชนิดที่โครงการพัฒนาวิชาการ KU-VECTOR ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ซึ่งจำแนกเชื้อโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis

5. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* sp. ต่อการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* sp. ต่อการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope : SEM) โดยเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. บนอาหาร GYMA เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสารและแพร่ซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเลี้ยงเชื้อรา *R. microporus* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะบริเวณอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารจากเชื้อ *Streptomyces* sp. (ชิ้นที่ 1) และเจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* (ชิ้นที่ 2) นำชิ้นวุ้นทั้งสองมาวางเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อโดยวางชิดกัน เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* แช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer 3 ครั้ง จากนั้น dehydrate โดยแช่ตัวอย่างใน ethanol ที่ความเข้มข้น 50, 60, 70, 80, 90, และ 100 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 2 ครั้งๆละ 15 นาที ทำให้แห้งด้วยเครื่อง critical point drier นำตัวอย่างแห้งที่ได้มาวางบน stub และเคลือบด้วยอนุภาคทองคำ ดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เชื้อราโดยใช้กล้อง SEM Quanta 400, FEI at 10 kV.

6. การทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์จากเชื้อ *Streptomyces* sp.ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus*

6.1 การเตรียมสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces* sp.

นำเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 มาเลี้ยงในข้าวโพดบดผสมกับข้าวโอ๊ตที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก โดยผสมกับแบคทีเรียแขวนลอย *Streptomyces* sp. ที่ความเข้มข้น $6x10^8$ cfu/ml อัตรา 100 : 20 (กรัม : มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน นำมาแช่ใน ethanol เป็นเวลา 7 วัน กรองเอากากออก นำสารที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator

6.2 การทดสอบ minimum inhibition concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus*

หาค่า MIC และ MFC โดยวิธี broth microdilution assay ใน 96-well microtiter plates โดยแต่ละหลุมมีปริมาตรรวมเท่ากับ 100 ไมโครลิตร เตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ให้มีความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในหลุมแถวแรกปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วเจือจางแบบสองเท่า (two-fold serial dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรของทุกหลุม จากนั้นดูดสารสกัดจากหลุมแถวแรกปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมแถวที่สองแล้วผสมกันโดยดูดขึ้นดูดลง 4 ครั้ง แล้วดูดใส่หลุมแถวที่สาม ทำเช่นนี้จนกระทั่งถึงแถวสุดท้ายและจะดูดสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตรทิ้งไป ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 2,000.00, 1000.00, 500.00, 250.00, 125.00, 62.5, 31.3, และ15.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเตรียมสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน (positive control) โดยเตรียมเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. แต่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 400.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ได้สารกำจัดเชื้อราที่มีความเข้มข้น 200.00, 100.00, 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.13, และ1.56 ตามลำดับ และใช้ 1%dimethyl sulfoxide เป็น negative control จากนั้นเติมเส้นใยแขวนลอยของเชื้อรา *R. microporus* เข้มข้น $1x10^6$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมทุกหลุมๆละ 50 ไมโครลิตร ซึ่งทำให้มีปริมาณเส้นใยเชื้อราสุดท้ายเป็น $1x10^4$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น1000.00, 500.00, 250.00, 125.00, 62.5, 31.3, 15.6 และ 7.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายของสารกำจัดเชื้อราเป็น 100.00, 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.13, 1.56 และ 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ บันทึกผลโดยอ่านค่า MIC ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ 72 ชั่วโมง อ่านค่า MFC ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อรา โดยนำหลุมที่ให้ค่า MIC และหลุมก่อนหน้า มา spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สังเกตการเจริญของเชื้อ ถ้าเชื้อไม่เจริญแสดงว่าเป็นค่า MFC

6.3 การทดสอบ Thin-layer chromatography bioautography

ทดสอบความสามารถของสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี bioautography โดยใช้แผ่น thin layer chromatography (TLC) โดยนำสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. มาละลายใน ethanol อัตรา 10 มิลิกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ หยดบน TLC Plate (silica gel 60 F254

(0.2 mm thick); Merck) ขนาด 25 มิลลิเมตร x 70 มิลลิเมตร นำไปใส่ developing solvent (hexane : ethanol (8:1, v/v) ในถังแก้ว ปิดฝาจนกระทั่ง developing solvent เคลื่อนได้ความสูง 50 มิลลิเมตร จึงนำแผ่น TLC ออกมาปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง ตรวจหาตำแหน่งสาร โดยนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต บันทึกระยะทางที่สารเคลื่อนที่ คำนวณค่า อัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (rate of flow : Rf) ของสารแต่ละชนิด จากสูตร

$$R_f = \left[\frac{\text{ระยะทางสารเคลื่อนที่จากตำแหน่งเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่จากตำแหน่งเริ่มต้นถึงตำแหน่งสูงสุด}} \right]$$

จากนั้นนำแผ่น TLC มาวางใน plate ปลอดเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทับบนแผ่น TLC รอจนอาหารแข็งตัว จึงวางเชื้อ *R. microporus* บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน ดูการยับยั้งของสารแต่ละชนิดบน TLC plate โดยสังเกตวงใสบริเวณที่มีแถบของสารปรากฏ

7. การผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces* sp.

7.1 การศึกษาผลของสารประกอบชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตสูตรสำเร็จต่อการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* sp. และเชื้อรา *R. microporus*

7.1.1 เชื้อ *Streptomyces* sp.

ทดสอบโดย เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ในอาหาร GYMA ที่มีความเข้มข้นของสารประกอบชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตสูตรสำเร็จ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการ spread plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ นับจำนวนโคโลนีเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

7.1.2 เชื้อรา *R. microporus*

ทดสอบโดย ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขอบโคโลนีของ *R. microporus* อายุ 5 วัน วางกลางจานอาหาร PDA ที่มีความเข้มข้นของสารประกอบที่ใช้ในการผลิตสูตรสำเร็จ 1 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

7.2 การผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces* sp.
ดัดแปลงสูตรจาก อมรรัตน์ ชุมทอง (2547) และสิทธิบัตรเลขที่ 0701001394

7.2.1 ชนิดแกรนูล เตรียมสูตรสำเร็จโดยการนำสารประกอบต่างๆ ได้แก่ lactose monohydrate PVP (k-30) sodium alginate และข้าวโพดบด ผสมกับเซลล์แขวนลอยเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่ความเข้มข้น 10^{11} cfu/ml (ตารางที่ 3) ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมจนมีลักษณะเป็นก้อนหมาดพอเหมาะ นำส่วนผสมที่ได้ผ่านแร่งเบอร์ 12 กดให้ส่วนผสมออกมา

เป็นแกรนูล แล้วนำไปผึ่งลมในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปรับปรุงอัตราส่วนและชนิดของสารประกอบต่างๆ ให้เหมาะสม นำสูตรสำเร็จที่ได้ไปประเมินคุณสมบัติในขั้นต่อไป

ตารางที่ 3 สารประกอบของสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล

สารประกอบ	สูตรสำเร็จ			
	1	2	3	4
Lactose monohydrate (% w/w)	67	63	59	55
PVP (k-30) (% w/w)	6	8	10	12
Sodium alginate (% w/w)	2	4	6	8
ข้าวโพดบด(% w/w)	10	10	10	10
เซลล์แขวนลอย x10^{11}cfu/ml (% v/w)	5	5	5	5
น้ำกลั่น (% v/w)	10	10	10	10

7.2.1 ชนิดผง เตรียมสูตรสำเร็จนำสารประกอบต่างๆ ได้แก่ lactose monohydrate PVP (k-30) และข้าวโพดบด ผสมกับเซลล์แขวนลอยเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่ความเข้มข้น 10^{11} cfu/ml (ตารางที่ 4) ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสม แล้วนำไปผึ่งลมในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง บดให้ละเอียด ปรับปรุงอัตราส่วนและชนิดของสารประกอบต่างๆ ให้เหมาะสม นำสูตรสำเร็จที่ได้ไปประเมินคุณสมบัติในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4 สารประกอบของสูตรสำเร็จชนิดผง

สารประกอบ	สูตรสำเร็จ			
	1	2	3	4
Lactose monohydrate (% w/w)	63	61	59	57
PVP (k-30) (% w/w)	2	4	6	8
ข้าวโพดบด(% w/w)	10	10	10	10
เซลล์แขวนลอย x10^{11}cfu/ml (% v/w)	5	5	5	5
น้ำกลั่น (% v/w)	20	20	20	20

8. การประเมินผลสูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces* sp.

8.1 การทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จ

ตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี dilution spread plate โดยสุ่มสูตรสำเร็จ จำนวน 5 จุดๆละ 1 กรัม ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อ *Streptomyces* sp. ในสูตรสำเร็จนั้นๆ

8.2 การทดสอบความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เตรียมสารแขวนลอยของสูตรสำเร็จที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ วัดค่า pH ด้วย pH meter โดยวัด 5 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย

8.3 การทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ

ชั่งสูตรสำเร็จ 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 99 มิลลิลิตร แล้วนำมาละลายโดยใช้แท่งแม่เหล็กคน ตั้งความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งสูตรสำเร็จละลายน้ำ บันทึกระยะเวลาในการละลายน้ำแต่ละสูตรสำเร็จ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

8.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* sp. ในสูตรสำเร็จ ในการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* ในห้องปฏิบัติการ

ทดสอบโดยเจาะอาหารวุ้น GYMA ให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำสารแขวนลอยของสูตรสำเร็จเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ หยดลงในหลุมจำนวนหลุมละ 30 ไมโครลิตร แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรเจาะขอบโคโลนีของเชื้อรา *R. microporus* วางกลางจานเลี้ยงเชื้อ ทำ 5 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

8.5 การทดสอบการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* sp.ในสูตรสำเร็จภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

ตรวจนับปริมาณเชื้อในสูตรสำเร็จทันทีที่ผลิตได้ และตรวจนับทุกเดือนหลังจากเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี dilution spread plate พร้อมทั้งทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี mycelial growth inhibition test ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย

9. การประเมินประสิทธิภาพสูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces* sp. ต่อการยับยั้งโรครากขาวของยางพาราในเรือนกระจก

9.1 การเตรียมเชื้อรา *R. microporus* (inoculums source) โดยเลี้ยงในถุงเพาะเห็ดที่มีส่วนผสมของ ขี้เลื่อยยางพารา : รำ : น้ำตาลทราย : น้ำ อัตรา 100 : 3 : 2 : 50 (โดยน้ำหนัก) ถุงละ 400 กรัม บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือนครึ่งถึง 2 เดือน (อารมณ์ โรจน์สุจิตร, 2541)

9.2 การเตรียมดิน โดยใช้ดินไม่นึ่งฆ่าเชื้อ และเป็นดินจากแหล่งเดียวกัน ผสมให้เนื้อดินมีความสม่ำเสมอ บันทึกรายละเอียดของดิน เช่น ชนิด ความชื้น ค่า pH และจุลินทรีย์ในดิน

9.3 การปลูกเชื้อและการปลูกต้นยาง โดยใช้ต้นกล้ายางพาราอายุ 1 ปี ปลูกในท่อผ่าตามยาว ตามเทคนิคมินิไรโซตรอน (สายัณห์ สดุดี และนเรศ จิโสะ, 2551) ท่อละ 1ต้น ฝังก้อนเชื้อลงในท่อ PVC ท่อละ 1 ก้อน

9.4 การใส่แบคทีเรียแขวนลอยและสูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces* sp. และสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 6 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ ๆ ทำการทดสอบในยางพันธุ์ RRIM 600 มีกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลของเชื้อ *Streptomyces* sp. ควบคุมเชื้อ *R. microporus*
กรรมวิธีที่ 2 ใช้สูตรสำเร็จชนิดผงของเชื้อ *Streptomyces* sp. ควบคุมเชื้อ *R. microporus*
กรรมวิธีที่ 3 ใช้เซลล์แขวนลอย *Streptomyces* sp. ควบคุมเชื้อ *R. microporus*
กรรมวิธีที่ 4 ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน ควบคุมเชื้อ *R. microporus*
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อรากขาว *(R. microporus*) เพียงอย่างเดียว
กรรมวิธีที่ 6 ปลูกพืชตามปกติ

ประเมินระดับความรุนแรงของโรคโดยให้ระดับความรุนแรงของโรคดังนี้ (ดัดแปลงจาก Wattanasilakorn *et al*., 2012)

ระดับ 0 : ไม่แสดงอาการ
ระดับ 1 : แสดงอาการเหี่ยว
ระดับ 2 : แสดงอาการใบเหลือง
ระดับ 3 : แสดงอาการใบร่วง
ระดับ 4 : แสดงอาการต้นตาย

นำค่าจากการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรค มาคำนวณดัชนีการเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์การลดโรคจากสูตร

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค} = \left[\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ} \times 100}{\text{จำนวนต้นยาง x ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right]$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การลดโรค} = 100 - \left[\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ x 100}}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right]$$

พร้อมทั้งนำดินหลังการทดลอง มาทดสอบหาปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง เปรียบเทียบกับดินก่อนการทดลอง

บทที่ 3
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดินและแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

เก็บตัวอย่างดินในสวนยางพาราจำนวน 60 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร GYMA ได้เชื้อจำนวน 258 ไอโซเลท (ตารางที่ 5) ซึ่งเชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่ในระยะแรกผิวโคโลนีเรียบ สร้างเส้นใยอากาศ เมื่ออายุมากขึ้นผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายแป้ง สีขาว เทา และส้ม บางไอโซเลทสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลเข้ม ดำ และเหลือง สอดคล้องกับการศึกษาของ Taddei และคณะ (2006) ที่ได้รายงานไว้ว่า *Streptomyces* spp. มีลักษณะคล้ายเชื้อรา สามารถสร้างเส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเส้นใยดังกล่าวจะพัฒนามาเป็นสปอร์ ทำให้ผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายแป้งหรือกำมะหยี่ มีหลายสี เช่น สีขาว เทา แดง เหลือง น้ำเงิน เขียว และม่วง ซึ่งเป็นสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบน ส่วนด้านล่างโคโลนีซึ่งมีเส้นใยเจริญอยู่อาหารมักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อสร้างรงควัตถุเมลานิน

ตารางที่ 5 สถานที่เก็บตัวอย่างดินจากสวนยางพารา จำนวนตัวอย่างดินและจำนวนไอโซเลทของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน

จังหวัด	จำนวนตัวอย่างดิน	จำนวน เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้	ลำดับไอโซเลท
จ.กระบี่			
อ.คลองท่อม	1	5	1 – 5
อ.เมือง	2	16	6 – 21
อ.อ่าวลึก	5	16	22 – 37
จ.ชุมพร			
อ.พะโต๊ะ	2	9	38 – 46
อ.เมือง	2	9	47 – 55
อ.ละแม	2	7	56 – 62
อ.หลังสวน	1	5	63 – 67

ตารางที่ 5 (ต่อ)

จังหวัด	จำนวนตัวอย่างดิน	จำนวนเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้	ลำดับไอโซเลท
จ.ตรัง			
อ.นาโยง	1	6	68 – 73
อ.เมือง	1	5	74 – 78
อ.สิเกา	1	5	79 – 83
จ.นครศรีธรรมราช			
อ.จุฬาภรณ์	1	5	84-88
อ.ชะอวด	1	4	89-92
อ.ทุ่งสง	3	14	93-106
อ.ทุ่งใหญ่	2	8	107-114
อ.นาบอน	1	5	115-119
อ.พรหมคีรี	1	5	120-124
อ.ลานสกา	2	7	125-131
จ.พัทลุง			
อ.บางแก้ว	1	5	132-136
อ.ป่าบอน	1	9	137-145
อ.เมือง	1	5	146-150
จ.พังงา			
อ.ตะกั่วทุ่ง	2	4	151-154
อ.ทับปุด	1	7	155-161
อ.เมือง	1	5	162-166

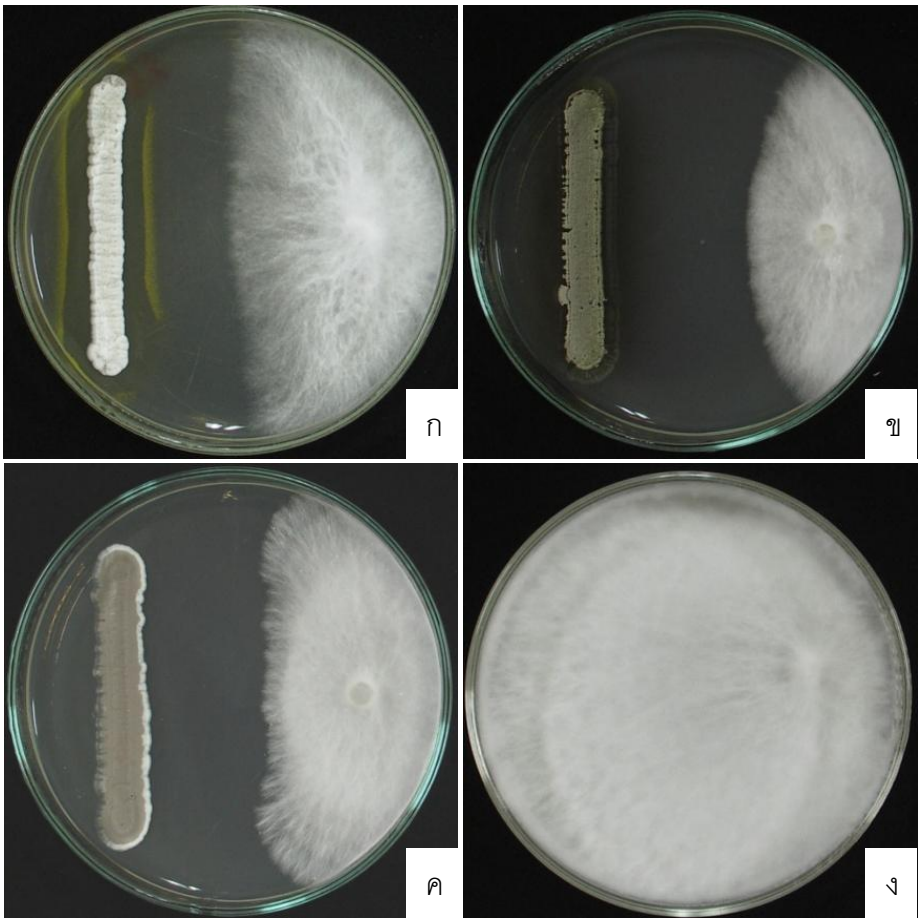
ตารางที่ 5 (ต่อ)

จังหวัด	จำนวนตัวอย่างดิน	จำนวนเชื้อ*Streptomyces* spp. ที่แยกได้	ลำดับไอโซเลท
จ.ภูเก็ต			
อ.กะทู้	2	4	167-170
อ.ถลาง	2	7	171-177
อ.เมือง	2	4	178-181
จ.ระนอง			
อ.กระบุรี	4	16	182-197
อ.เมือง	2	7	198-204
จ.สุราษฎร์ธานี			
อ.กาญจนดิษฐ์	3	10	205-214
อ.ท่าชนะ	2	9	215-223
อ.บ้านนาเดิม	3	15	224-238
อ.พระแสง	1	5	234-243
อ.เมือง	1	3	244-246
อ.เวียงสระ	2	12	247-258

2. การคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากข้อ 1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA ตรวจผลโดยการวัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เจริญเข้าหาแนวขีดเชื้อ *Streptomyces* spp. ในวันที่ 7 หลังการทดสอบ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 0.00- 83.57 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียง 61 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (ตารางภาคผนวกที่ 1) โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิ ภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลท106 รองลงมาคือ 110 และ 25 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 83.57, 74.29 และ 70.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ทำการคัดเลือกเพียง 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท106 (S106) และไอโซเลท 110 (S110) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีลักษณะการยับยั้งแบบเกิดบริเวณยับยั้งระหว่างแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเชื้อราสาเหตุ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Streptomyces* spp. สร้างสารบางอย่างออกมาซึ่งเป็นสารที่สามารถละลายน้ำและแพร่ซึมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Pridham and Tresner, 1974) ซึ่งสารดังกล่าวอาจมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราได้ ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเข้าใกล้หรือข้ามผ่านเชื้อ *Streptomyces* spp. ไปได้



ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทต่างๆในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ภายหลังการทดสอบ 7 วัน

ก. *Streptomyces* sp.ไอโซเลท 25

ข. *Streptomyces* sp.ไอโซเลท 106

ค. *Streptomyces* sp.ไอโซเลท 110

ง. *Rigidoporus microporus* (ชุดควบคุม)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp.ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในดินในหลอดทดลอง

เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 คือไอโซเลท 106 และ 110 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ในดินในหลอดทดลองเพื่อจำลองสภาพแวดล้อมให้ใกล้เคียงกับธรรมชาติ โดยการผสมเชื้อ *Streptomyces* spp. ในดินในหลอดทดสอบเปรียบเทียบกับดินที่ไม่ใส่เชื้อ ทำการทดลองสองชุดทดสอบโดยชุดที่ 1 วางเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงสว่างตามปกติ(แสง12 ชม.-มืด 12 ชม.) ส่วนชุดที่ 2 วางเลี้ยงในที่มืด หลังการทดสอบ 10 วัน พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท 106 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรารากขาวได้ดีกว่าไอโซเลท 110 และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทั้งในชุดทดสอบที่วางเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงปกติและการวางเลี้ยงในที่มืด (ภาพที่3 และ ตารางที่ 6) โดยเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท 106 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดทดสอบที่วางเลี้ยงในสภาพปกติและการวางเลี้ยงในที่มืดเท่ากับ 96.34 และ 95.05 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 6) ส่วนไอโซเลท 110 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดทดสอบที่วางเลี้ยงในสภาพปกติ และการวางเลี้ยงในที่มืดเท่ากับ 71.58 และ 69.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสภาพของแสงไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. นอกจากนี้ยังพบว่า เส้นใยของเชื้อราเปลี่ยนเป็นสีเหลืองน้ำตาล ขาดเป็นท่อนและอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แสดงว่าเชื้อไอโซเลท 106 ปล่อยสารบางชนิดออกมาย่อยสลายเส้นใยของเชื้อราทำให้ไม่สามารถเจริญได้ จึงคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท 106 เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* และผลิตเป็นสูตรสำเร็จสำหรับทดสอบการควบคุมโรครากขาวในเรือนทดลอง

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ในดินในหลอดทดลอง

กรรมวิธี	การเจริญของเชื้อ *R. microporus* (มิลลิเมตร)[1/]		เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง [2/]
	5 วัน	10 วัน	
ไอโซเลท 106 วางเลี้ยงที่ แสง12 ชม.-มืด 12 ชม.	1.10±0.20d[3/]	3.50±0.90e	96.34±0.90a
ไอโซเลท 110 วางเลี้ยงที่ แสง12 ชม.-มืด 12 ชม.	16.10±1.23c	27.00±1.40d	71.58±1.42b
ชุดควบคุม วางเลี้ยงที่ แสง12 ชม.-มืด 12 ชม.	35.00±0.00b	95.00±0.00b	0.00±0.00c
ไอโซเลท 106 วางเลี้ยงที่มืด	1.65±0.08d	5.00±0.30e	95.05±0.30a
ไอโซเลท 110 วางเลี้ยงที่มืด	16.61±0.81c	30.90±1.20c	69.10±1.22b
ชุดควบคุม วางเลี้ยงที่มืด	38.00±0.00a	100.00±0.00a	0.00±0.00c
C.V. (%)	6.78	3.84	3.10

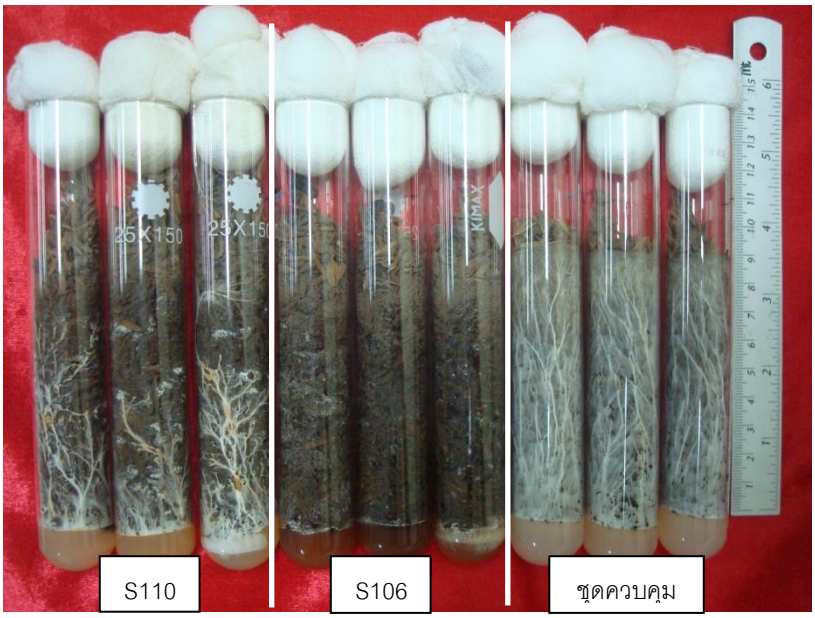
[1/] ค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ในดินที่ผสม และไม่ผสมเชื้อ *Streptomyces* spp. ในหลอดทดลอง เฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

[2/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในหลอดทดลอง หลังจากการทดสอบ 10 วัน เฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ คำนวณจาก

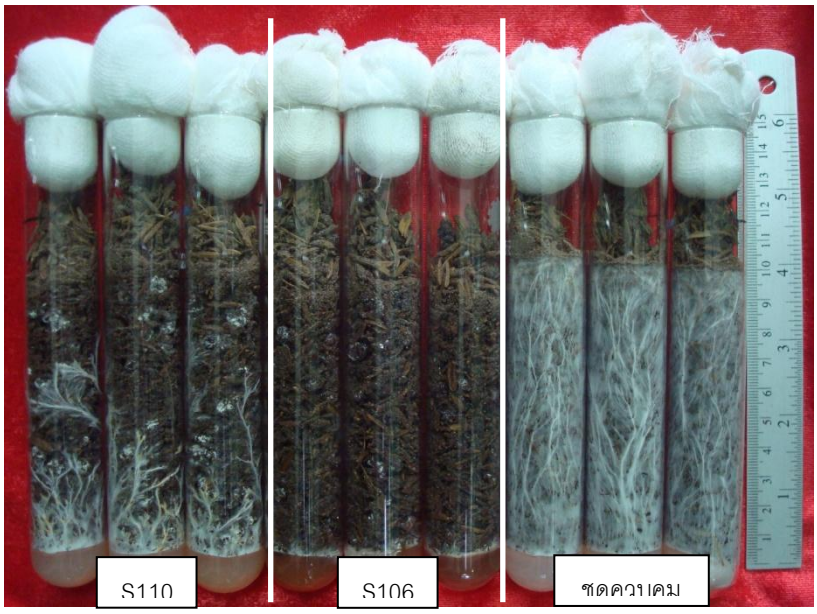
$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง} = 100 - \left(\frac{\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญในกรรมวิธีทดสอบ}}{\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญในกรรมวิธีควบคุม}} \right)$$

[3/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

ก.



ข.



ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลทต่างๆในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ในดิน ภายหลังการทดสอบ 10 วัน

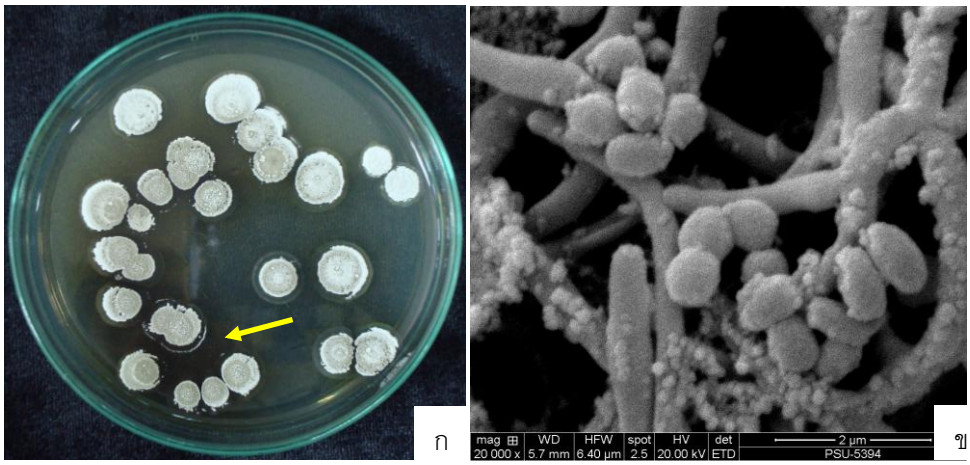
ก. ชุดทดสอบที่ 1 วางเลี้ยงในสภาพได้รับแสงปกติ (แสง 12 ชม.- มืด 12 ชม.)

ข. ชุดทดสอบที่ 2 วางเลี้ยงในที่มืด

4. การจำแนกชนิดของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท 106

เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่คัดเลือกได้จากจากข้อ 3 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี (ตารางที่ 7) เพื่อนำข้อมูลมาประกอบการจำแนกชนิดตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteria (Holt *et al*., 1994) โดยศึกษาในส่วนของสีโคโลนี การสร้างสปอร์ อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง ที่สามารถเจริญได้ ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน การทนเค็ม การสร้างรงควัตถุ การสร้าง diffusible pigment ความไวต่อสารปฏิชีวนะ และการสร้างเอนไซม์ เช่น chitinase และ caseinase เป็นต้น ซึ่งเมื่อนำลักษณะดังกล่าวมาประกอบกันเพื่อจำแนกชนิดตามหนังสือ Bergey's Manual พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท 106 ให้ผลการทดลองไม่ตรงกับ Bergey's Manual ดังนั้นจึงส่ง *Streptomyces* sp. ไอโซเลท 106 ไปจำแนกชนิดที่โครงการพัฒนาวิชาการ KU-VECTOR ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน โดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis พบว่า *Streptomyces* sp. ไอโซเลท 106 ตรงกับ accession number AB184627 ซึ่งจำแนกชนิดได้เป็น *S. griseus* subsp. *formicus* strain: NBRC 14886 โดยมีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ พบว่า *S. griseus* subsp. *formicus* S106 มีโคโลนีสีเทา เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างเส้นใยอากาศ มีสายสปอร์เป็นเส้นตรง (ภาพที่ 4) เจริญได้ตั้งแต่ที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 6-8 เจริญบนอาหาร YMEA ผสม NaCl ได้สูงสุด 4 เปอร์เซ็นต์ สามารถใช้น้ำตาล D-glucose fructose mannitol sucrose D(+)xylose L-rhamnose D-galactose L(+)arabinose dextran และ L-histidine เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถใช้ glycine β -alanine และ L-arginine เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase และ proteinase (ตารางที่ 8 และภาพที่ 5) สร้างรงควัตถุที่แพร่ในอาหาร และสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ streptomycin ได้



ภาพที่ 4 ลักษณะของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus*

ก. ลักษณะโคโลนี การสร้างรงควัตถุ และการสร้าง diffusible pigment

ข. ลักษณะของเส้นใยอากาศและการสร้างสปอร์

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus*

Character	S106
Color of aerial mycelium	gray
Gram reaction	+
Production of diffusible pigment	+
Utilization of carbon source	
D-glucose	+
Fructose	+
Manitol	+
Sucrose	+
D(+)-xylose	+
L-rhamnose	+
D-galactose	+
L(+)arabinose	+
Dextran	+
L-histidine	+
Utilization of nitrogen source	
Asparagine	-
Potassium nitrate	-
Ammonium chloride	-
Ammonium sulfate	-
Glycine	+
Urea	-
L-arginine	+
β -alanine	+

+ = positive, - = negative, ± doubtful

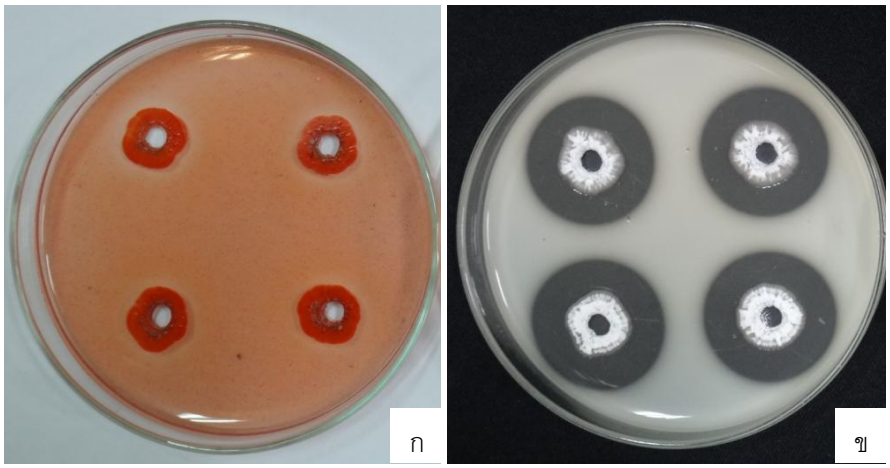
ตารางที่ 7 (ต่อ)

Character	S106
Growth at	
10°C	±
20°C	+
30°C	+
40°C	+
pH 4	+
pH 6	+
pH 8	+
pH 10	+
Growth with	
NaCl 2%	+
NaCl 4%	+
NaCl 6%	-
Casein digestion test	+
Starch hydrolysis test	-
Gelatin hydrolysis test	-
Chitinase production	+
Cellulose production	-
Resistance to	
streptomycin (50 μg/ml)	+

+ = positive, - = negative, ± = doubtful

ตารางที่ 8 ความสามารถของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆโดยประเมินจากวงใสที่เกิดจากการย่อย substrate เฉพาะ หลังการทดสอบ 5 วัน

ชนิดเอนไซม์	ขนาดของวงใส(มม.)
Chitinase	15.00
Caseinase (proteinase)	28.75
Cellulose	00.00
Amylase	00.00



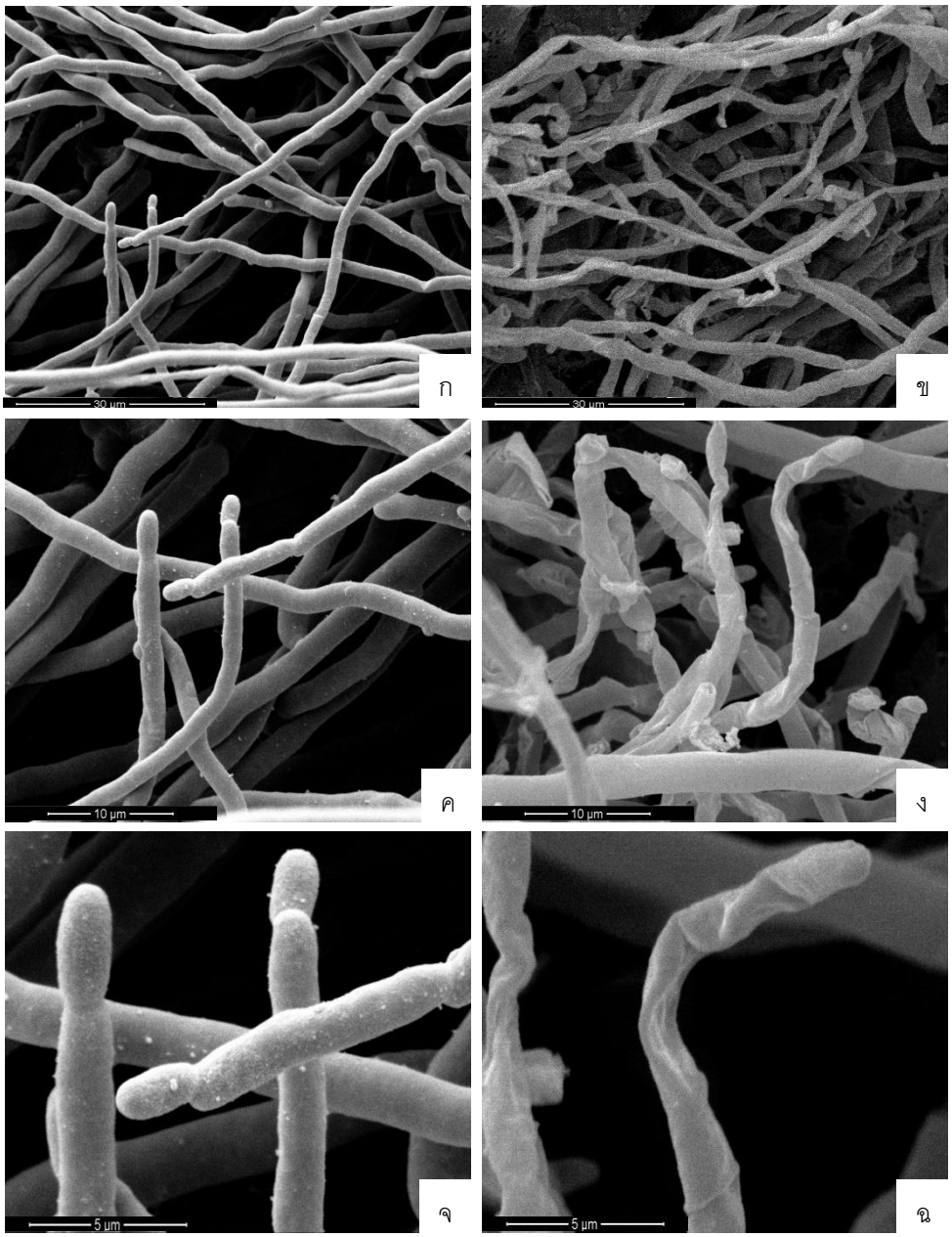
ภาพที่ 5 ลักษณะวงใสที่เกิดจากการย่อย substrate โดยเอนไซม์ chitinase และ caseinase (proteinase)

ก. วงใสที่เกิดจากการย่อย substrate โดยเอนไซม์ chitinase บนอาหาร M9 medium agar ผสม 2.4% colloidal chitin

ข. วงใสที่เกิดจากการย่อย substrate โดยเอนไซม์ caseinase (proteinase) บนอาหาร casein agar

5. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ต่อการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ต่อการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า เมื่อนำเชื้อรา *R. microporus* มาเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* จะส่งผลให้เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะผิดปกติ คือมีอาการเหี่ยวย่นและบิดเบี้ยวอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 6) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *Streptomyces* spp. สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างโปรตีน หรือทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ซึ่งสารที่สร้างโดย *Streptomyces* spp. ส่วนใหญ่จะพบเป็นกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลาย ซึ่งสอดคลองกับการทดลองของ Xue และคณะ (2013) ที่พบว่า *Streptomyces* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Verticillium dahlia* สาเหตุโรคเหี่ยวของฝ้ายได้ โดยการสร้างเอนไซม์ chitinase, β -1,3- glucosidase, cellulase และ protease ออกมาย่อยผนังเส้นใยเชื้อราก่อโรค และจากการศึกษาของ Gopalakrishnan และคณะ (2011) พบว่า *Streptomyces* spp. สามารถสร้างเอนไซม์ cellulase และ protease ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* สาเหตุโรค Fusarium wilt ในถั่วเขียวได้



ภาพที่ 6 อาการผิดปกติของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ภายหลังการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* เป็นเวลา 5 วัน บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ก., ค. และ จ. เส้นใยปกติในชุดควบคุม (2000X, 4000X, 10000X)

ข., ง. และ ฉ. เส้นใยเหี่ยวย่นในชุดทดสอบ(2000X, 4000X, 10000X)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์จากเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

6.1 การเตรียมสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces* spp.

เมื่อนำเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ซึ่งผ่านการคัดเลือกจากการทดสอบประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในดิน มาสกัดสารด้วย ethanol แล้วนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator พบว่า ได้สารสกัดหยาบสีน้ำตาลเข้ม และเหนียว (ภาพที่ 7)

ภาพที่ 7 สารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus*

6.2 การทดสอบ minimum inhibition concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus*

จากการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* และสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี broth microdilution assay ใน 96-well microtiter plates หลังการทดสอบ 3 วัน พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MFC เท่ากับ 125.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซินมีค่า MIC เท่ากับ 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MFC เท่ากับ 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 9) ดังตารางที่ 3 เช่นเดียวกับการทดลองของ Valanarasu และคณะ (2010) ที่พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Streptomyces* sp. ERI-04 ซึ่งสกัดด้วย acetone สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

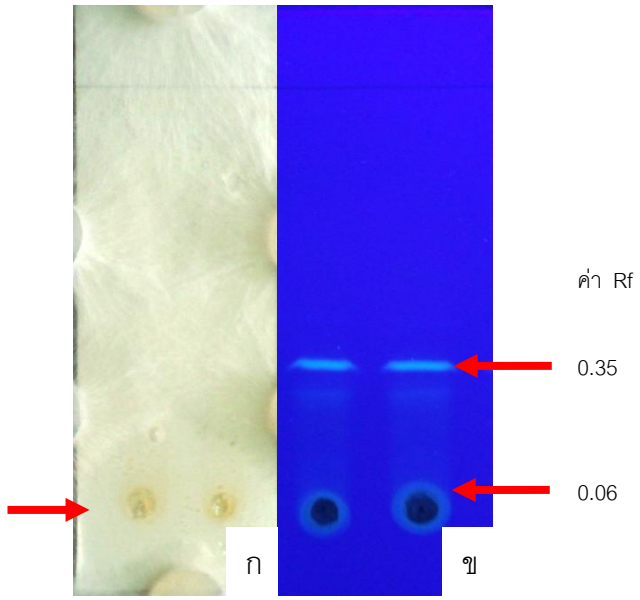
Aspergillus niger MTCC 1344 และ *Curvularia lunata* 46/01 ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารเคมีกำจัดเชื้อราคีโตโคนาโซลมีความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น <12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 9 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญ(MFC)ของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ของสารสกัดจาก *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* หลังการทดสอบ 72 ชั่วโมง

เชื้อรา *Rigidoporus microporus*	สารสกัดหยาบ S106 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
	MIC/MFC	MIC/MFC
ไอโซเลทที่ 2	62.5/125.0	0.78/0.78
ไอโซเลทที่ 24	62.5/125.0	0.78/0.78
ไอโซเลทที่ 25	62.5/125.0	0.78/0.78

6.3 **การทดสอบ** Thin-layer chromatography bioautography

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากจากเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* มาตรวจหาตำแหน่งของสารต้านเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี Bioautography โดยใช้แผ่น Thin layer chromatography (TLC) พบว่าตำแหน่งของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ชัดเจน (เกิดบริเวณยับยั้ง) คือตำแหน่งที่มีค่า Rf (rate of flow) เท่ากับ 0.06 นอกจากนี้ยังชี้ให้เห็นว่าสารต้านเชื้อราดังกล่าวเป็นสารชนิดที่มีขั้วสูง เนื่องจากสารดังกล่าวสามารถละลายได้น้อยในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ (hexane) และถูกดูดซับได้ดีด้วยซิลิกาเจลทำให้เคลื่อนที่ได้น้อย ค่า Rf จึงมีค่าต่ำ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การทดสอบความสามารถของสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ด้วยวิธี Bioautography บนแผ่น TLC

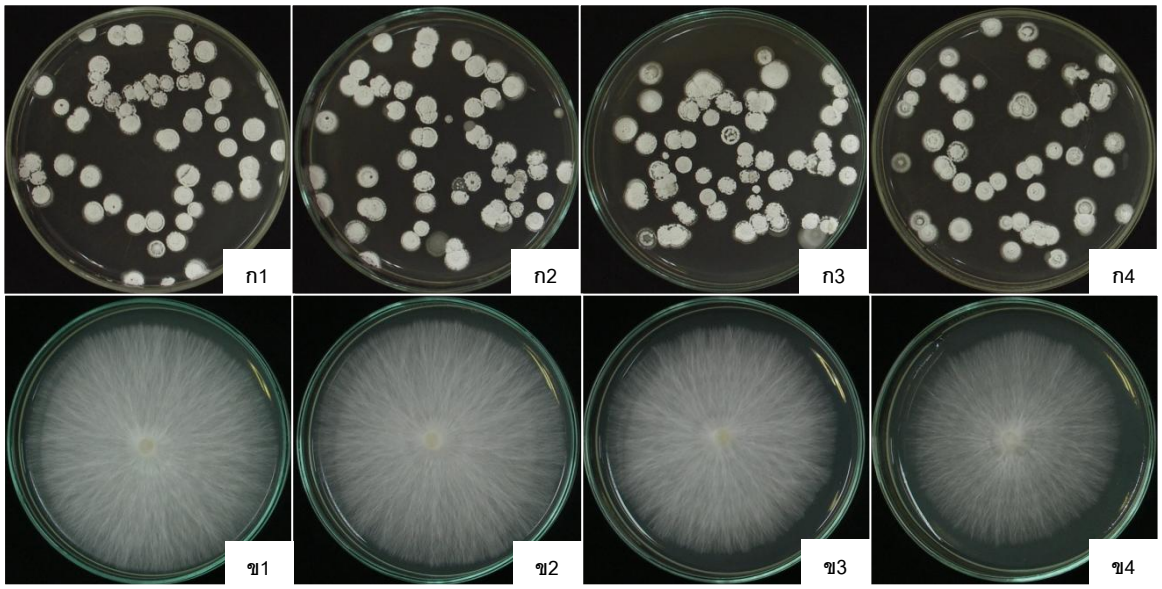
ก. ที่ลูกศรชี้ คือบริเวณที่เชื้อรา *R. microporus* ถูกยับยั้ง โดยสารสกัดจากเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus*

ข. ที่ลูกศรชี้ คือตำแหน่งของสารที่แยกตัวออกจากสารสกัดหยาบ

7. การผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus*

7.1 การศึกษาผลของสารประกอบในการผลิตสูตรสำเร็จต่อการเจริญของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* และเชื้อรา *R. microporus*

เมื่อนำเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* และเชื้อรา *R. microporus* มาเลี้ยงบนอาหาร GYMA และ PDA ที่ผสมด้วยสารประกอบชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตสูตรสำเร็จ ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดสอบผลกระทบของสารต่อการเจริญของเชื้อ พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* และการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งผสมด้วยสารประกอบสำหรับผลิตสูตรสำเร็จไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 2) กับการเจริญบนอาหารชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารประกอบทุกชนิดที่ใช้สำหรับทำสูตรสำเร็จ ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* และเชื้อ *R. microporus* (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การเจริญของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* และ *Rigidoporus microporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารประกอบในการผลิตสูตรสำเร็จแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น1 เปอร์เซ็นต์

ก. เชื้อ *S.griseus* subsp. *formicus*

ข. เชื้อ *Rigidoporus microporus*

1.ชุดควบคุม

2. อาหารเลี้ยงเชื้อผสม lactose

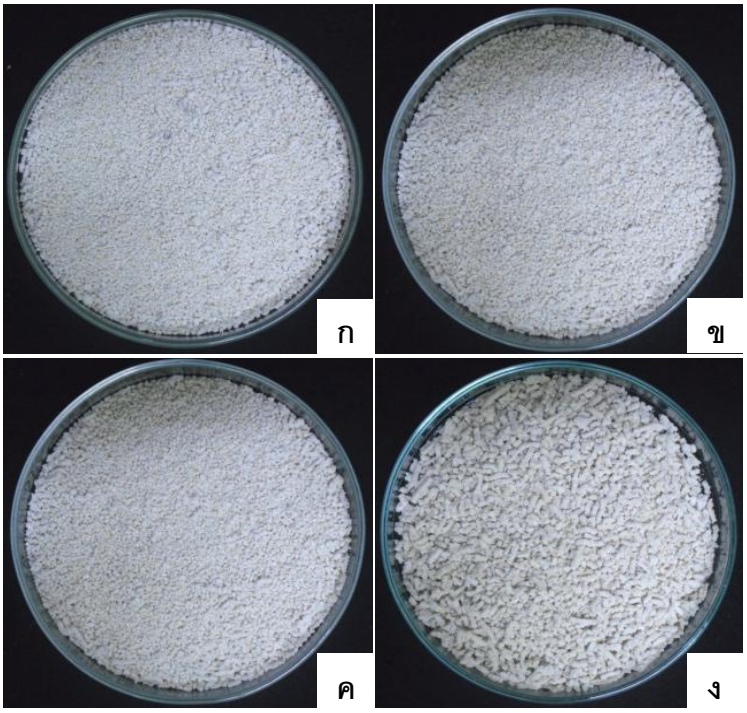
3. อาหารเลี้ยงเชื้อผสม alginate

4. อาหารเลี้ยงเชื้อผสม polyvinylpyrolidone

7.2 การผลิตสูตรสำเร็จของ *S. griseus* subsp. *formicus*

7.2.1 การผลิตสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล

เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* sp. มาผลิตเป็นสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลด้วยวิธี wet granulation โดยนำเชื้อมาผสมกับสารประกอบได้แก่ lactose monohydrate, sodium alginate, PVP (k-30) และข้าวโพดบด อัตราส่วนตามตารางที่ 3 พบว่าสามารถผลิตสูตรสำเร็จได้ 4 สูตร แต่ละสูตรมีลักษณะเป็นแกรนูลสีเทาครีม ขนาดไม่เท่ากัน โดยสูตรที่ 4 ที่ประกอบด้วยสารยึดเกาะ (PVP (k-30)) ปริมาณมากจะมีแกรนูลขนาดใหญ่กว่าสูตรอื่นๆ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ลักษณะสูตรสำเร็จเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ชนิดแกรนูล

ก. สูตรที่ 1 ประกอบด้วย lactose monohydrate, sodium alginate, PVP (k-30) ข้าวโพดบด เซลล์แขวนลอย และน้ำกลั่น อัตราส่วน 67 : 6 : 2 : 10 : 5 : 10 เปอร์เซ็นต์

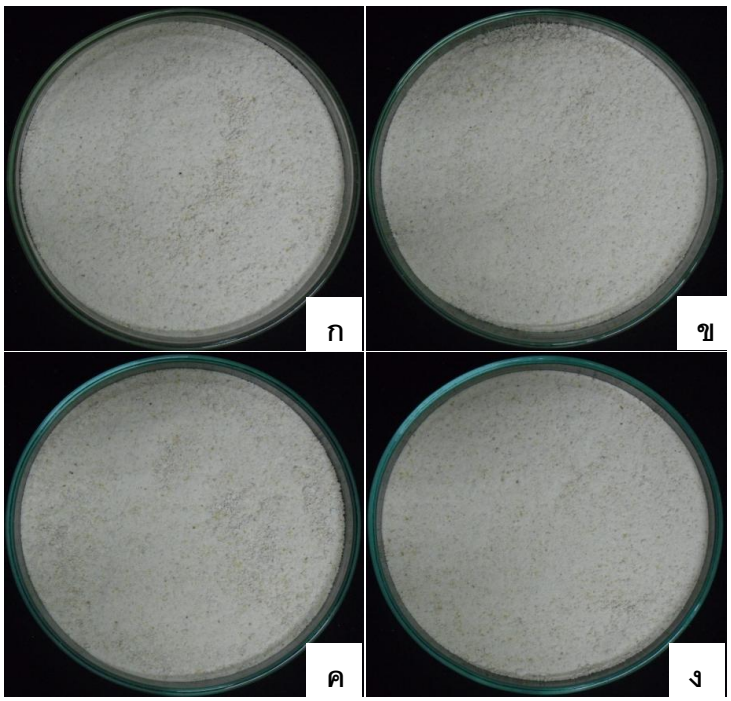
ข. สูตรที่ 2 ประกอบด้วย lactose monohydrate, sodium alginate, PVP (k-30) ข้าวโพดบด เซลล์แขวนลอย และน้ำกลั่น อัตราส่วน 63 : 8 : 4 : 10 : 5 : 10 เปอร์เซ็นต์

ค. สูตรที่ 3 ประกอบด้วย lactose monohydrate, sodium alginate, PVP(k-30) ข้าวโพดบด เซลล์แขวนลอย และน้ำกลั่น อัตราส่วน 59 : 10 : 6 : 10 : 5 :10 เปอร์เซ็นต์

ง. สูตรที่ 4 ประกอบด้วย lactose monohydrate, sodium alginate, PVP (k-30) ข้าวโพดบด เซลล์แขวนลอย และน้ำกลั่น อัตราส่วน 55 : 12 : 8 : 10 : 5 :10 เปอร์เซ็นต์

7.2.2 การผลิตสูตรสำเร็จชนิดผง

เมื่อนำเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* มาผลิตเป็นสูตรสำเร็จรูปแบบผงโดยนำมาผสมกับสารประกอบได้แก่ lactose monohydrate, PVP (k-30) และข้าวโพดบด อัตราส่วนตามตารางที่ 4 พบว่าสามารถผลิตสูตรสำเร็จได้ 4 สูตร แต่ละสูตรมีลักษณะเป็นผงละเอียด สีเทาครีม (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ลักษณะสูตรสำเร็จเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ชนิดผง

ก. สูตรที่ 1 ประกอบด้วย lactose monohydrate, PVP (k-30), ข้าวโพดบด เซลล์แขวนลอย และน้ำกลั่น อัตราส่วน 63 : 2 : 10 : 5 : 20 เปอร์เซ็นต์

ข. สูตรที่ 2 ประกอบด้วย lactose monohydrate, PVP (k-30), ข้าวโพดบด เซลล์แขวนลอย และน้ำกลั่น อัตราส่วน 61 : 4 : 10 : 5 : 20 เปอร์เซ็นต์

ค. สูตรที่ 3 ประกอบด้วย lactose monohydrate, PVP (k-30), ข้าวโพดบด เซลล์แขวนลอย และน้ำกลั่น อัตราส่วน 59 : 6 : 10 : 5 :20 เปอร์เซ็นต์

ง. สูตรที่ 4 ประกอบด้วย lactose monohydrate, PVP (k-30), ข้าวโพดบด เซลล์แขวนลอย และน้ำกลั่น อัตราส่วน 57 : 8 : 10 : 5 :20 เปอร์เซ็นต์

8. การประเมินผลสูตรสำเร็จของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus*

8.1 การทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จ

เมื่อนำสูตรสำเร็จทั้งชนิดแกรนูลและชนิดผงมาตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA พบว่า สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 3 และสูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 4 มีปริมาณเชื้อมากที่สุด และมีความสม่ำเสมอของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* เท่ากันทั้งสูตร โดยแต่ละสูตรมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ $1.96\pm0.02x10^{6}$ และ $1.05\pm0.03\ x10^{6}$ cfu/g ตามลำดับ (ตารางที่ 10) แสดงถึงความเหมาะสมของส่วนประกอบในสูตรสำเร็จแต่ละชนิด โดยสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 3 ประกอบด้วย lactose monohydrate 59 เปอร์เซ็นต์ PVP (k-30) 10 เปอร์เซ็นต์sodium alginate 6 เปอร์เซ็นต์ ข้าวโพดบด 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำกลั่น 10 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์แขวนลอยเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* เข้มข้น $6x10^{11}$cfu/ml 5 เปอร์เซ็นต์ และสูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 4 ประกอบด้วย lactose monohydrate 52 เปอร์เซ็นต์ PVP (k-30) 8 เปอร์เซ็นต์ ข้าวโพดบด 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำกลั่น 20 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์แขวนลอยเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* เข้มข้น 10^{11}cfu/ml 5 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือ สูตรสำเร็จทั้งสองสูตรนี้มีความสม่ำเสมอและมีการกระจายตัวของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ดีที่สุด เหมาะสมสำหรับนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 10 ปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จหลังการผลิต 24 ชั่วโมง

จุดที่	ปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จ x10^6 cfu/กรัม[1/]							
	สูตรสำเร็จชนิดแกรนูล				สูตรสำเร็จชนิดผง			
	1	2	3	4	1	2	3	4
1	1.30±0.17ab[2/]	1.60±0.06bc	1.93±0.03a	1.60±0.00a	1.27±0.12b	1.50±0.06a	1.40±0.00a	1.53±0.09b
2	1.03±0.03b	1.50±0.06c	1.90±0.00a	1.67±0.15a	1.20±0.06b	1.47±0.07a	1.50±0.10a	1.63±0.09ab
3	1.50±0.23ab	1.50±0.00c	2.00±0.06a	1.67±0.09a	1.60±0.10a	1.40±0.06a	1.60±0.12a	1.87±0.03a
4	1.70±0.12a	1.70±0.06ab	1.97±0.07a	1.70±0.06a	1.67±0.03a	1.47±0.03a	1.53±0.07a	1.77±0.03ab
5	1.20±0.06b	1.80±0.00a	2.00±0.06a	1.73±0.09a	1.23±0.07b	1.43±0.09a	1.60±0.00a	1.57±0.09b
เฉลี่ย	1.35±0.08	1.62±0.04	1.96±0.02	1.67±0.04	1.39±0.06	1.45±0.03	1.53±0.03	1.67±0.04
C.V. (%)	18.34	4.78	4.27	9.26	10.15	7.54	8.54	7.32

[1/]ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จ ทั้ง 8 สูตร เฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

8.2 การทดสอบความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เตรียมสารแขวนลอยของสูตรสำเร็จทั้งชนิดแกรนูลและชนิดผง ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ วัดค่า pH ด้วย pH meter พบว่า สูตรสำเร็จทั้งชนิดแกรนูลและผงมีลักษณะเป็นกรดอ่อนคือมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.83±0.004-5.91±0.010 และ 6.02±0.004-6.14±0.005 ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

8.3 ความสามารถในการละลายน้ำ

เมื่อนำสูตรสำเร็จที่ผลิตได้มาทดสอบความสามารถในการละลายน้ำในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แท่งแม่เหล็กคน ตั้งความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าระยะเวลาในการละลายน้ำของสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลอยู่ในช่วง 6 นาที 11 วินาที (371.00 วินาที) -7 นาที 16 วินาที (436.33 วินาที) โดยสูตรที่ 1 ใช้เวลาในการละลายน้ำน้อยที่สุดคือ 6 นาที 11 วินาที และสูตรที่ 4 ใช้เวลามากที่สุดคือ 7 นาที 16 วินาที ส่วนสูตรสำเร็จชนิดผงพบว่าใช้เวลาในการละลายน้ำอยู่ในช่วง 7 นาที 14 วินาที (433.67 วินาที) - 7 นาที 46 วินาที (466.00 วินาที) ซึ่งละลายได้ค่อนข้างช้ากว่าสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล เนื่องจากเมื่อเปียกน้ำจะจับตัวกันเป็นก้อนทำให้ละลายได้ช้า (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ความเป็นกรด-ด่างและการละลายน้ำของสูตรสำเร็จที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

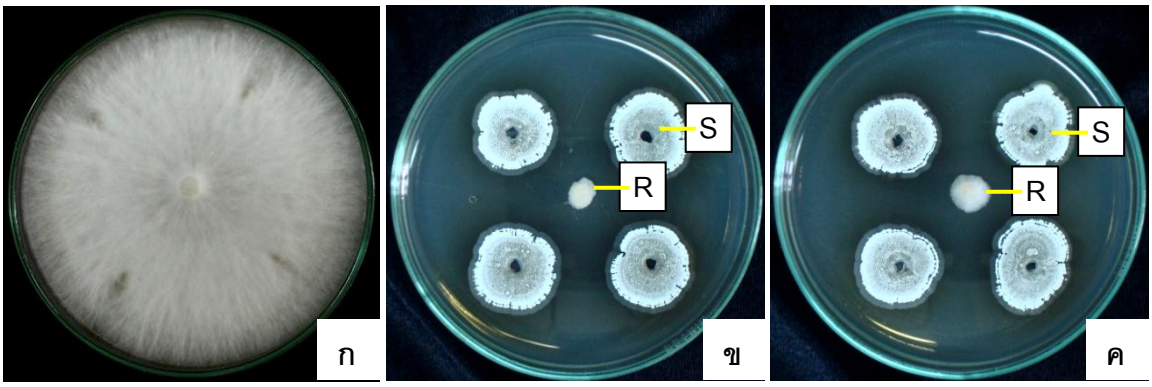
สูตรสำเร็จ	ค่าความเป็นกรด-ด่าง[1/]	การละลายน้ำ (วินาที)[1/]
Granule 1	5.97±0.020	371.00±3.79a[2/]
Granule 2	5.83±0.004	387.33±1.45b
Granule 3	5.91±0.010	404.33±2.03c
Granule 4	5.95±0.008	436.33±1.86d
Powder 1	6.02±0.004	433.67±2.60d
Powder 2	6.07±0.005	434.33±2.33d
Powder 3	6.11±0.004	449.33±1.76e
Powder 4	6.14±0.005	466.00±2.52f
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	6.77±0.005	-
C.V. (%)	-	0.98

[1/]ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างและการละลายน้ำของสูตรสำเร็จทั้ง 8 สูตร เฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

8.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จในการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* ในห้องปฏิบัติการ

เมื่อนำสูตรสำเร็จที่ผลิตได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี mycelial growth inhibition test บนอาหาร PDA พบว่าสูตรสำเร็จทั้ง 8 สูตร สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ โดยสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 86.11-88.61 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสูตรสำเร็จชนิดผงมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 81.63 - 85.93 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุมซึ่งใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนสูตรสำเร็จ (ภาพที่12 และ ตารางที่ 12)



ภาพที่ 12 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จต่อการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ภายหลังการผลิต 24 ชั่วโมง

ก. เชื้อรา *R. microporus* ชุดควบคุม

ข. เชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* จากสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 3 (S) กับเชื้อรา *R. microporus* (R)

ค. เชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* จากสูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 4 (S) กับเชื้อรา *R. microporus* (R)

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จหลังการผลิต 24 ชั่วโมง

รูปแบบแกรนูล		รูปแบบผง	
สูตร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง[1/]	สูตร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง[1/]
Granule 1	86.95±0.28b[2/]	Powder 1	81.63±0.82c
Granule 2	86.11±0.32b	Powder 2	84.07±0.37b
Granule 3	88.61±0.28a	Powder 3	83.33±0.00b
Granule 4	86.67±0.45b	Powder 4	85.93±0.37a
ชุดควบคุม	00.00±0.00c	ชุดควบคุม	00.00±0.00d
C.V. (%)	0.87	C.V. (%)	1.12

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* หลังจากการทดสอบ 5 วัน เฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ คำนวณจาก

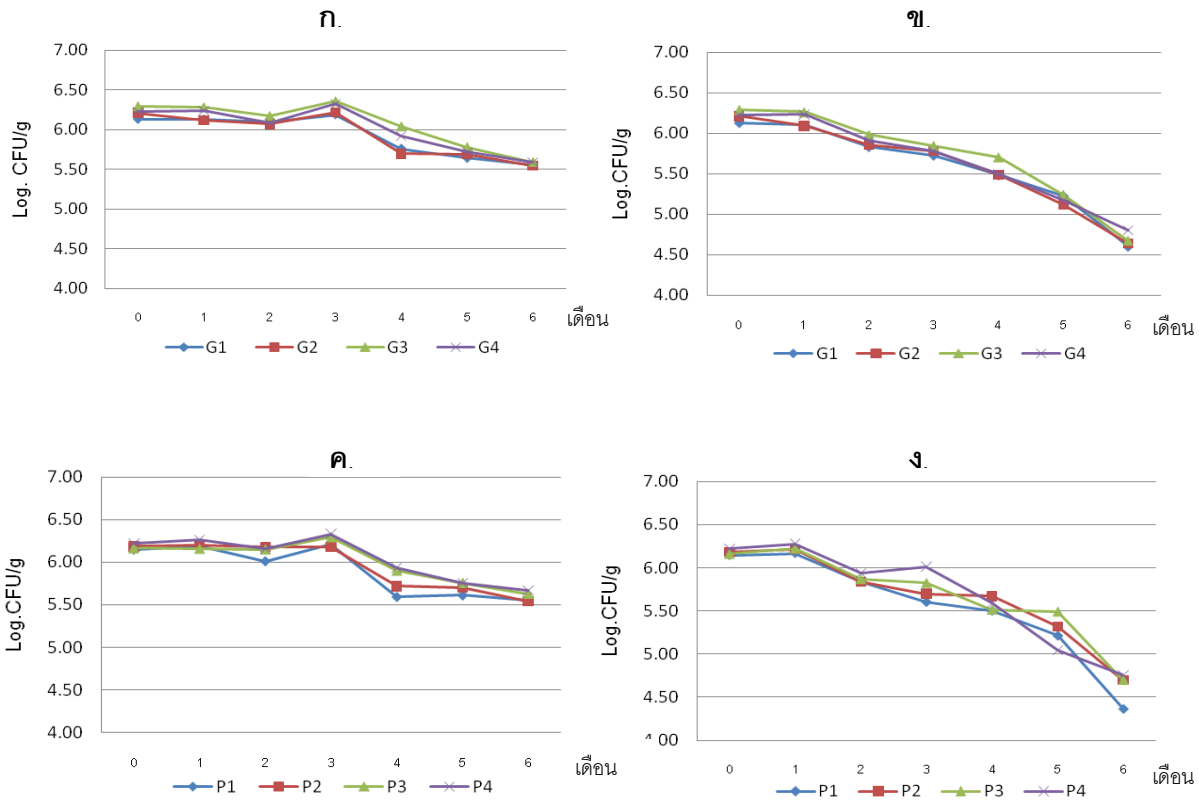
$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง} = 100 - \left(\frac{\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญในกรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญในกรรมวิธีควบคุม}} \right)$$

[2/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ เมื่อความแตกต่างที่มีนัยสำคัญยิ่งระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

การนำจุลินทรีย์ในรูปของเชื้อสดมาใช้ในการควบคุมโรคพืชมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ความคงตัวของเชื้อ ความไม่สะดวกในการนำไปใช้ จึงต้องมีการพัฒนาสูตรสำเร็จให้อยู่ในรูปแบบที่มีความคงตัวสูง และสะดวกเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในสภาพสวนยางพารา โดยรูปแบบที่น่าสนใจคือสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีความคงตัวดี เพราะมีพื้นที่ผิวสัมผัสอากาศน้อย ไม่จับตัวเป็นก้อน และชนิดผง ซึ่งมีขั้นตอนการผลิตที่ง่ายและสะดวกต่อการนำไปใช้ (อัจฉรา อุทิศวรรณกุล, 2536) ดังนั้นจึงนำ *S. griseus* subsp. *formicus* มาผลิตเป็นสูตรสำเร็จรูปแบบแกรนูลและชนิดผง และเมื่อทำการประเมินสูตรสำเร็จที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลที่ผลิตได้ มีความสามารถละลายน้ำได้ในช่วง 6 นาที 11 วินาที -7 นาที 16 วินาที มีค่าความเป็นกรดอ่อน (pH 5.83-5.97) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของวานิด รอดเนียม (2552) ที่นำ *B. subtilis* มาพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล โดยพบว่าระยะเวลาในการละลายน้ำของสูตรสำเร็จอยู่ในช่วง 5-18 นาที และมีค่าความเป็นกรดอ่อนถึงปานกลาง ส่วนสูตรสำเร็จชนิดผงมีความสามารถละลายน้ำได้ในช่วง 7 นาที 14 วินาที - 7 นาที 46 วินาที มีค่าความเป็นกรดอ่อน (pH 6.02-6.04) และเมื่อนำสูตรสำเร็จทั้งชนิดแกรนูลและชนิดผงมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี mycelial growth inhibition test พบว่า สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 86.11-88.61 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสูตรสำเร็จชนิดผงมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 81.63 - 85.93 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการทดลองของ Sabaratman และ Traquair (2002) พบว่าสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลและชนิดผงของเชื้อ *Streptomyces* sp. Di-944 ที่ผลิตเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ *Rhizoctonia solani* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบด้วยวิธี dilution spread plate ในระดับห้องปฏิบัติการ จากเหตุผลข้างต้นจึงได้นำสูตรสำเร็จที่ผลิตได้ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อโรครากขาวของยางพาราในเรือนทดลอง ว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้หรือไม่ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาและปรับปรุงต่อไป

8.5 การทดสอบการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) และ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน

เมื่อตรวจนับปริมาณเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จทันทีที่ผลิตได้และนำไปเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) และ 4 องศาเซลเซียส ตรวจนับทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี dilution spread plate พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อ ที่มีชีวิตรอดในสูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่อนข้างคงที่ในช่วงเดือนที่ 1-3 และลดลงทุกๆเดือนหลังจากเดือนที่ 3 ส่วนสูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส)นั้น พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อในสูตรสำเร็จเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนแรกของการเก็บรักษา (ภาพที่13) นอกจากนี้ยังพบว่าการเก็บรักษาทั้งสองแบบไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น และเมื่อนำสูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) และ 4 องศาเซลเซียส มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี mycelial growth inhibition test พบว่าสูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ค่อนข้างคงที่ในช่วงเดือนที่ 1-3 มีประสิทธิภาพสูงกว่าสูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ที่ลดลงตั้งแต่เดือนแรกของการเก็บรักษา(ตารางที่ 13 และ 14) ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากจำนวนประชากรที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง สอดคล้องกับการทดลองของ Sabaratman และ Traquair (2002) ที่ศึกษาประสิทธิภาพและความมีชีวิตรอดของเชื้อ *Streptomyces* sp. Di-944 ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลและชนิดผง โดยการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 และ 24 องศาเซลเซียส พบว่าสูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพและความมีชีวิตรอดของเชื้อ *Streptomyces* sp. Di-944 สูงกว่าการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เนื่องจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ทำงานได้ช้าลง ทั้งยังช่วยป้องกันการสะสมสารพิษและการสูญเสียสารอาหารของจุลินทรีย์ (Kirsop and Doyle, 1991)ทำเชื้อจุลินทรีย์ในสูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีชีวิตรอดของเชื้อสูงกว่าการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้อง ส่งผลให้สูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสูงกว่าสูตรสำเร็จที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 13 จำนวนประชากรของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จจากการทดสอบ 6 เดือน

ก. สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข. สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ค. สูตรสำเร็จชนิดผงเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ง. สูตรสำเร็จชนิดผงเก็บที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ

G1 = สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 1

G2 = สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 2

G3 = สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 3

G4 = สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 4

P1 = สูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 1

P2 = สูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 2

P3 = สูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 3

P4 = สูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 4

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* โดยเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล จากการทดสอบ 6 เดือน

สูตรสำเร็จ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Rigidoporus microporus*[1/]						
	เริ่มต้น	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่5	เดือนที่ 6
Granule 1 เก็บที่ 4 °C	86.95±0.28b[2/]	82.59±0.98cd	79.63±0.98ab	91.85±0.37b	65.19±0.74c	64.81±0.98b	63.19±0.15ab
Granule 2 เก็บที่ 4 °C	86.11±0.32b	80.07±0.07e	80.74±2.43ab	89.26±0.37c	65.93±0.74c	63.70±0.98b	60.96±0.52b
Granule 3 เก็บที่ 4 °C	88.61±0.28a	85.93±0.37b	81.85±0.37a	94.44±0.64a	72.30±0.32a	69.48±0.83a	66.15±0.52a
Granule 4 เก็บที่ 4 °C	86.67±0.45b	87.78±0.37a	80.00±1.48ab	93.33±0.74b	68.89±0.98b	68.89±0.37a	64.44±0.98a
Granule 1 เก็บที่อุณหภูมิห้อง	86.95±0.28b	82.22±0.00d	76.30±1.96b	66.67±1.28e	60.37±0.98d	54.81±0.74c	32.22±1.11d
Granule 2 เก็บที่อุณหภูมิห้อง	86.11±0.32b	80.96±0.15e	79.63±1.33ab	72.07±0.52d	59.63±0.37d	50.74±0.98d	34.07±0.74d
Granule 3 เก็บที่อุณหภูมิห้อง	88.61±0.28a	85.19±0.37b	78.52±0.74ab	73.04±0.77d	65.93±0.74c	54.81±0.74c	35.56±1.28d
Granule 4 เก็บที่อุณหภูมิห้อง	86.67±0.45b	84.44±0.37c	78.52±1.92ab	72.89±0.32d	60.00±0.37d	53.331.28±c	44.44±3.7c
ชุดควบคุม	00.00±0.00c	00.00±0.00f	00.00±0.00c	00.00±0.00f	00.00±0.00e	00.00±0.00e	00.00±0.00e
C.V. (%)	1.08	0.96	3.58	1.56	1.99	2.75	5.62

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* หลังจากการทดสอบ 5 วัน เฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* โดยเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดผง จากการทดสอบ 6 เดือน

สูตรสำเร็จ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Rigidoporus microporus*[1/]						
	เริ่มต้น	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่5	เดือนที่ 6
Powder 1 เก็บที่ 4 °C	81.63±0.82c[2/]	82.96±0.37d	68.52±6.68b	85.19±0.37d	63.19±0.15c	63.33±0.64b	61.11±1.11a
Powder 2 เก็บที่ 4 °C	84.07±0.37b	85.93±0.74b	82.96±0.74a	88.52±0.74c	67.04±0.98b	66.67±0.00b	60.37±0.98a
Powder 3 เก็บที่ 4 °C	83.33±0.00b	87.04±0.37ab	82.22±0.00a	90.96±0.15b	71.11±0.00a	71.70±0.32a	62.96±0.74a
Powder 4 เก็บที่ 4 °C	85.93±0.37a	87.41±0.37a	84.07±0.98a	95.56±1.28a	71.70±0.32a	71.11±0.00a	63.70±0.70a
Powder 1 เก็บที่อุณหภูมิห้อง	81.63±0.82c	84.44±0.64c	78.89±0.64a	61.48±0.74g	60.37±0.37d	51.85±0.74d	17.41±6.30c
Powder 2 เก็บที่อุณหภูมิห้อง	84.07±0.37b	85.93±0.74b	78.89±0.64a	65.93±0.74f	65.56±0.64bc	57.78±1.28c	40.00±2.56b
Powder 3 เก็บที่อุณหภูมิห้อง	83.33±0.00b	82.59±0.37d	80.37±0.98a	78.52±0.74e	59.63±0.37d	58.89±0.64c	37.04±0.74b
Powder 4 เก็บที่อุณหภูมิห้อง	85.93±0.37a	85.93±0.37b	81.11±0.64a	79.26±0.74e	63.70±1.96c	48.15±3.71d	37.04±3.70b
ชุดควบคุม	00.00±0.00d	00.00±0.00e	00.00±0.00c	00.00±0.00h	00.00±0.00e	00.00±0.00e	00.00±0.00d
C.V. (%)	1.07	1.02	5.67	1.72	2.36	4.36	10.93

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* หลังจากการทดสอบ 5 วัน เฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

9. การประเมินประสิทธิภาพสูตรสำเร็จของ เชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ต่อการยับยั้งโรครากขาวของยางพาราในเรือนกระจก

การทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ชนิดแกรนูลสูตรที่ 3 และชนิดผงสูตรที่ 4 ต่อการยับยั้งโรครากขาวของยางพาราในเรือนกระจก เปรียบเทียบกับการใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน และเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* เมื่อประเมินระดับความรุนแรงการเกิดโรค พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรครากขาวในสภาพเรือนทดลองได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีค่าดัชนีการเกิดโรคที่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 14) (ตารางที่ 15) และเมื่อนำดินที่ใช้ในการทดลอง (ทั้งก่อนและหลังการทดลอง) มาทดสอบคุณสมบัติบางประการ พบว่า ดินหลังการทดลองมีปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) เพิ่มมากขึ้นจากดินก่อนการทดสอบและมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีความเป็นกลางมากขึ้น (ตารางที่ 15) ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีการตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยจุลินทรีย์ดิน และการเกิดกิจกรรมการย่อยสลายระหว่างจุลินทรีย์ดิน (เชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีส) และแกลบที่ใช้ผสมในดินปลูก โดยจุลินทรีย์ดินจะขับเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลาย (ธงชัย มาลา, 2546) ทำให้แร่ธาตุองค์ประกอบถูกปลดปล่อยออกมา ซึ่งในแกลบมีปริมาณไนโตรเจน(N) ฟอสฟอรัส(P_2O_5) โพแทสเซียม(K_2O) และมีอินทรีย์คาร์บอน(Org. C) ร้อยละ 0.36, 0.09, 1.08 และ 54.72 ตามลำดับ (ปรัชญา ธัญญาดี และคณะ, 2540)

ภาพที่ 14 พุ่มใบและรากของกล้ายางพารา หลังการทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ต่อการยับยั้งโรครากขาวของยางพาราในเรือนกระจก เป็นเวลา 3 เดือน

ก. กรรมวิธีที่ใช้สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 3 ควบคุมเชื้อ *R. microporus*

ข. กรรมวิธีที่ใช้สูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 4 ควบคุมเชื้อ *R. microporus*

ค. กรรมวิธีที่ใช้เซลล์แขวนลอย *S. griseus* subsp. *formicus* ควบคุมเชื้อ *R. microporus*

ง. กรรมวิธีที่ใช้คาร์บอกซิน ควบคุมเชื้อ *R. microporus*

จ. กรรมวิธีที่ปลูกเชื้อรากขาวเพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม : พบอาการใบเหลืองและเหี่ยวมากที่สุด)

ฉ. กรรมวิธีที่ปลูกพืชตามปกติ

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการควบคุมโรครากขาวของกล้ายางพาราในเรือนกระจก และคุณสมบัติของดินก่อนและหลังการทดสอบ 3 เดือน

กรรมวิธี	ดัชนีการเกิดโรค[1/]	เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค[2/]	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของรากต้นกล้ายาง	คุณสมบัติของดิน			
				Total N (g/kg)	Available P (mg/kg)	Available K (mg/kg)	pH
ดินก่อนการทดลอง	-	-	-	0.40	21.02	29.53	4.88
ดิน + Granule 3+ ต้นกล้ายาง + *R. microporus*	20.83±4.17a[3/]	73.73	50.11±1.17a	0.67	29.72	69.90	5.87
ดิน + Powder 4+ ต้นกล้ายาง + *R. microporus*	20.83±4.17a	73.73	48.76±0.61a	0.45	22.27	61.09	5.27
ดิน + แบคทีเรียแขวนลอยของ *S. griseus* subsp. *formicus* +ต้นกล้ายาง + *R. microporus*	25.00±7.22a	68.35	49.84±0.68a	0.55	23.09	85.90	5.36
ดิน + คาร์บอกซิน + ต้นกล้ายาง + *R. microporus*	16.67±7.77a	84.18	50.64±0.93a	0.46	22.97	77.88	5.19
ดิน + ต้นกล้ายาง + *R. microporus*	72.50±4.17b	0.00	33.69±3.76b	0.45	27.37	74.10	5.36
ดิน + ต้นกล้ายาง	-	-	49.87±1.63a	0.40	20.18	46.54	5.27
C.V. (%)	30.57	-	6.68	-	-	-	-

[1/] ดัชนีการเกิดโรค = $\left(\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ} \times 100}{\text{จำนวนต้นยาง x ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right)$ [2/] เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค = $100 - \left(\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right)$

[3/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

นำตัวอย่างดินจากสวนยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 60 ตัวอย่างมาแยกแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ได้เชื้อจำนวน 258 ไอโซเลท และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 0.00 - 83.57 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียง 61 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลท106 รองลงมาคือ 110 และ 25 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 83.57, 74.29 และ 70.36 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp.ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในดินในหลอดทดลอง พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท 106 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรารากขาวได้ดีกว่าไอโซเลท 110 ทั้งในชุดทดสอบที่วางเลี้ยงในสภาพปกติและการวางเลี้ยงในที่มืด โดย *Streptomyces* sp. ไอโซเลท 106 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดทดสอบที่วางเลี้ยงในสภาพปกติและการวางเลี้ยงในที่มืดเท่ากับ 96.34 และ 95.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท 110 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดทดสอบที่วางเลี้ยงในสภาพปกติและการวางเลี้ยงในที่มืดเท่ากับ 71.58 และ 69.10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี และจำแนกชนิดโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis พบว่า *Streptomyces* sp. ไอโซเลท 106 ตรงกับ accession number AB184627 ซึ่งจำแนกชนิดได้เป็น *S. griseus* subsp. *formicus* strain : NBRC 14886 โดยมีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ต่อการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* สามารถทำให้เส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* มีอาการเหี่ยวย่นและบิดเบี้ยวอย่างเห็นได้ชัด

การทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์จากเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* พบว่า สารสกัดหยาบจากเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้ดี โดยมีค่า MIC เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MFC เท่ากับ 125.0 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร และเมื่อนำมาตรวจหาตำแหน่งของสารต้านเชื้อราด้วยวิธี Bioautography พบว่า ตำแหน่งของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ชัดเจน (เกิดบริเวณยับยั้ง) คือ ตำแหน่งที่มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (R_f) เท่ากับ 0.06 ซึ่งเป็นสารชนิดที่มีขั้วสูง เนื่องจากละลายได้น้อยในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ

การผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* พบว่า สามารถผลิตสูตรสำเร็จแกรนูลได้ 4 สูตร และสูตรสำเร็จชนิดผง 4 สูตร เมื่อประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ พบว่า ชนิดแกรนูลสูตรที่ 3 และชนิดผงสูตรที่ 4 มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ทดสอบการยับยั้งโรครากขาวในเรือนกระจก

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ต่อการยับยั้งโรครากขาวของยางพาราในเรือนทดลอง พบว่าทั้งสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 3 และชนิดผงสูตรที่ 4 สามารถลดการเกิดโรครากขาวได้ดี ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2536. การพัฒนา *Chaetomium cupreum* เป็นยาเชื้อป้องกันกำจัดเชื้อราในดินเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศโดยชีววิธี. *ใน* รายงานการประชุมอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่1. 20-22 ตุลาคม 2536. โรงแรมรามาการ์เด็น กรุงเทพฯ. หน้า 375-387.

จิระเดช แจ่มสว่าง กณิษฐา สังคะหะ และ วรรณวิไล เกษนรา. 2536. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาร่วมกับปุ๋ยหมักเพื่อควบคุมเชื้อ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคโคนเน่าของมะเขือเทศ. *ใน* รายงานการประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 1. 20-22 ตุลาคม 2536. โรงแรมรามาการ์เด็น กรุงเทพฯ. หน้า 323-336.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2551. การใช้เชื้อไตรโคเดอร์มาควบคุมโรครากเน่าของผักที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์. ว.แก่นเกษตร 21: 29 - 44.

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

ธงชัย มาลา. 2546. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ : เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นรินทร์ ศรีปาน. ม.ป.ป. สวนยาง. วารสารสำหรับครอบครัวเจ้าของสวนสงเคราะห์ 42 : 37-41.

ปรัชญา ธัญญาดี เมธี มณีวรรณ และพิรัชฌา วาสนานุกูล. 2540. ความรู้เรื่องอินทรียวัตถุในดิน. หน้า 1-13. *ใน* กลุ่มอินทรียวัตถุและวัสดุเหลือใช้. คู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐเรื่องการปรับปรุงดินด้วยอินทรียวัตถุ. กองอนุรักษ์ดินและน้ำ กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2522.โรคและศัตรูยางพารา. ศูนย์วิจัยการยาง หาดใหญ่ สงขลา.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2523. โรคและศัตรูยางพาราในประเทศไทยปี 2522. ว.ยางพารา10 : 12-19.

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ อัศนี ปาจีนบูรวรรณ์. 2548. การคัดเลือกและการทดสอบประสิทธิภาพ ของ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ-พริก. *ใน* รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่7. อารักขาพืช : เพื่อคุณภาพชีวิตและสิ่งแวดล้อม. 7-9 พฤศจิกายน 2548. โรงแรมโลตัส กาดสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่. หน้า 383 - 394.

มนต์ชุลี นิติพน. 2534. ยาเม็ด. กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์.

ยศวดี อุดมพิทักษ์เดชา. 2552. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของปทุมมา. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

วานิด รอดเนียม.2552.การคัดเลือกและการพัฒนาสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. เพื่อควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Alternaria* spp. ในผักสลัด (*Lactuca sativa* L.) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

สถาบันวิจัยยาง. 2555. ข้อมูลวิชาการยางพารา 2553. เอกสารวิชาการ. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

สายัณห์ สดุดี และนเรศ จิโสะ. 2551. การประเมินการเจริญเติบโตของรากยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.)โดยใช้เทคนิคมินิไรโซตรอน.ว. เกษตรพระจอมเกล้า 26 : 50-60.

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และ สมบัติ ศรีชูวงศ์. 2546. การคัดเลือกเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดถั่วเหลืองเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง. ว. เกษตร 19 : 176-188.

เสมอใจ ชื่นจิตต์. 2555. โรครากขาวของยางพารา. เอกสารเผยแพร่. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

อนันต์ วงเจริญ. 2547. การจำแนกชนิดเชื้อ *Streptromyces* spp.ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยใช้คุณลักษณะผสมผสาน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

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

อารมณ์ โรจน์สุจิตร. 2541. โรครากขาว (*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki) ของยางพาราและแนวทางการควบคุมโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

อารมณ์ โรจน์สุจิตร. 2551. โรครากขาวและการควบคุม. ว. ยางพารา 29 : 1-15.

อารมณ์ โรจน์สุจิตร สายใจ สุชาติกูล วสันณ์ เพชรรัตน์ และเสมอใจ ชื่นจิตต์. 2552. ลักษณะทางสรีรวิทยาและแนวทางควบคุมเชื้อราโรครากขาวยางพารา. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

อารมณ์ โรจน์สุจิตร อุไร จันทรประทิน พเยาว์ ร่มรื่นสุขารมย์ นริสา จันทร์เรือง สโรชา กรีธาพล วันเพ็ญ พฤกษ์วิวัฒน์ สุเมธ พฤกษวรุณ วลัยพร ศศิประภา ปราโมทย์ คาพุทธ และประภา พงษ์อุธา. 2553. ประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจของยางพาราสาเหตุจากโรครากขาวในพื้นที่ปลูกยางของประเทศไทย. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

อุไร จันทรประทิน. 2540. ประสิทธิภาพของสารเคมีต่อโรครากขาว. (Online) Available from: http://lib.doa.go.th/elib/cgibin/opacexe.exe?op=dsp&cat=sub&lang=0&db=Main&pat =&cat=sub&skin=u&lpp=16&catop=&scid=zzz&bid=4455). (25/2/2011).

อัจฉรา อุทิศวรรณกุล. 2536. รูปแบบเภสัชภัณฑ์. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Anitha, A. and Rabeeth, M. 2009. Control of Fusarium wilt of tomato by bioformulation of *Streptomyces griseus* in green house condition. African Journal of Basic & Applied Sciences 1: 9-14.

Baharlouei, A., Sharifi-Sirchi, G.R. and Bonjar, G. H. 2011. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (oilseed rape isolate) by an effective antagonist *Streptomyces*. African Journal of Biotechnology 10 : 5785-5794.

Bordoloi, G.N., Kumari, B., Guha, A., Thakur, D., Bordoloi, M., Roy, M.K. and Bora,T.C. 2002. Potential of a novel antibiotic, 2-methylheptyl isonicotinate, as a biocontrol agent against Fusarial wilt of crucifers. Pest Management Science 58 : 297-302.

Boukaew, S.,Chuenchit, S. and Petcharat, V.2011.Evalution *of Streptomyces* spp. for biological control of Sclerotium root and stem rot and Ralstonia wilt of chili pepper. Biocontrol 56 : 365-374.

Bressan, W. and Figueiredo, J.E.F. 2005. Biological control of *Stenocarpella maydis* in maize seed with antagonistic *Streptomyces* sp. isolates. Journal of Phytopathology 153 : 623-626.

Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou,S. 2004. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Letters in Applied Microbiology 39 : 425-430.

Cheah, L.H., Veerakone, S. and Kent, G. 2000. Biological control of clubroot on cauliflower with *Trichoderma* and *Streptomyces* spp. . New Zealand Plant Protection 53 : 18-21.

D' Souza, A., Roy, K.J., Bibekananda, M. and Dasgupta, B. 2001. Screening of *Trichoderma harzianum* against major fungal pathogens of betelvine. Indian Phytopathology 54 : 340-345.

Dubey, C.S., Bhavani, R. and Birendra, S. 2009. Development of Pusa 5SD for seed dressing and Pusa Biopellet 10G for soil application formulations of *Trichoderma harzianum* and their evaluation for integrated management of dry root rot of mungbean (*Vigna radiata*). Biological Control 50 : 231-242.

El-Abyad, M. S., El-Sayed, M. A., El-Shanshoury, A. R. and El-Sabbagh S. M. 1993. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. Plant and Soil 149 : 185-195.

El-Sayed, H. Z., Eman, S. F., El-Mohamedya, R. S. and Allaa, M. A. A. 2010. *Streptomyces alni* as a biocontrol agent to root-rot of grapevine and increasing their efficiency by biofertilisers inocula. Phytopathology and Plant Protection 43 : 634-646.

Errakhi, R., Bouteau, F. Lebrihi, A. and Barakate, M.2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Microbiology and Biotechnology 23 :1503-1509.

Etebarian, H.R. 2006. Evaluation of *Streptomyces* strain for biological control of charcoal stem rot of melon caused by *Macrophomina phaseolina*. Plant Pathology 5: 83-87.

Ezziyyani, M., Requena, E.M., Egea-Gilabert, C. and Candela, E. 2007. Biological control of *Phytophthora* root rot of peper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. Journal of Phytopathology 155 : 342-349.

Getha, K., Vikineswary, S., Wong, W. Seki, H. T., Ward, A. and Goodfellow, M. 2005. Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of Fusarium wilt and

rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 32 : 24–32.

Gnanamangai, B. M. and Ponmurugan, P. 2012. Evaluation of various fungicides and microbial based biocontrol agents against bird's eye spot disease of tea plants. Crop Protection 32 : 111-118.

Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B. K., Sandeep, D., Vidya, M.S., Deepthi, K. and Rupela, O. 2011. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of Fusarium wilt of chickpea. Crop Protection 30 : 1070-1078.

Guyot, A. and Flori, A. 2002. Comparative study for detecting *Rigidoporus lignosus* on rubber tree. Crop Protection 21: 461-466.

Haggag, W. M. and Abdall, A. M. 2011. Foliar application of *Streptomyces aureofaciens* improve protection in mango against post-harvest anthracnose andenhances fruit yield. European Journal of Scientific Research 63 : 139-149.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Stalay, J. T. and Williams, S. T. 1994. Genus *Streptomyces. In:* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltmore : Williams and Wilkins.

Jayasuriya, E.K. and Thennakoon, I.B. 2007. Biological control of *Rigidoporus microporus*, the cause of white root disease in rubber. Biological Sciences 36 : 9 -16.

Joo, G.J. 2005. Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*. Biotechnology Letters 27: 201–205.

Kaewchai, S. 2010. Biological Control of White Root Disease of Rubber Trees. Thesis Ph.D. Dissertation. King Mongkut' s Instute of Technology Ladkrabang. Thailand.

Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J.F. and Lumyong, S. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. EurAsian Journal of BioSciences 4 : 23-32.

Kirsop, B. E., and A. Doyle (eds) 1991. Maintenance of microorganisms and cultured cells. London : Academic Press.

Li, Q., Jiang, Y., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G., Jiang, D. and Hsiang, T. 2011. Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. Biological Control 58 : 139-148.

Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G. and Hsiang, T. 2012.Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. Biological Control 61: 113-120.

Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. and Gullino, M. L. 2006. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. Crop Protection 25 : 468-475.

Nandris, D., Nicole, M. and Geiger, J. P. 1987. Root rot disease of rubber tree. Plant Disease 71 : 298-306.

Neeno, E.C., Kinkel, L.L. and Schottel, J.L. 2001. Competition and antibiosis in the control of potato scab. Canadian Journal of Microbiology 47 : 332-340.

Nicole, R.M. and Benhamou, N. 1991. Cytochemical aspect of cellulose breakdown during the infection process of rubber tree roots by *Rigidoporus lignosus*. Cytology and Histology 81: 1410-1412.

Nourozian, J., Etebarian, R. H. and Khodakaramian, G. 2006. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. Songklanakarin Journal Sciences Technology 28 : 29-38.

Pang, X., Zhou, X., Sun, Y. and Deng, Z. 2002. Physical map of *Streptomyces hygroscopicus* 10-22 deduced by analysis of overlapping large chromosomal deletion. Journal of Bacteriology 184 : 1958-1965.

Patil, H. J., Srivastava, A. K., Singh, D. P.,Chaudhari, B. L. and Arora, D. K. 2011. Actinomycetes mediated biochemical responses in tomato *(Solanum lycopersicum)* enhances bioprotection against *Rhizoctonia solani*. Crop Protection 30 : 1269-1273.

Prabavathy, R.V., Mathivanan, N. and Murugesan, K. 2006. Biological control of blast and sheath blight disease of rice using antifungal metabolite produced by *Streptomyces* sp. PM5. Biological Control 39 : 313-319.

Prapagdee, B., Kuekulvong, C. and Mongkolsuk, S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. Journal of Biological Sciences 4 : 330-337.

Pridham, T.G. and Tresner, H.D. 1974. Family Streptomycetacae. *In*: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltmore : Williams and Wilkins Co.

Quecine, M.C., Araujo, W.L., Marcon, J., Gai, C.S., Azevedo, J.L. and Pizzirani-Kleiner, A.A. 2008. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. Applied Microbiology 47 : 486-491.

Ristaino, B.J., Lewiz, J.A. and Lumsden, D.R. 1994. Influence of isolate of *Gliocladium virens* and delivery system on biological control of southern blight on carrot and tomato in the field. Plant Disease 78 : 153-156.

Ryvarden, L.1991. Genera of Polypores Nomenclature and Taxonomy. Oslo: Gronlands Grafiske.

Sabaratman, S. and Traquair, T.A. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of Rhizoctonia damping-off in tomato transplants. Biological Control 23 : 245-253.

Shahrokhi, S., Bonjar, H.S.G. and Saadoun, T. 2005. Biological control of potato isolate of *Rhizoctonia solani* by *Streptomyces olivaceus* strain 115.Biotechnology 4 : 132-138.

Shekhar, N., Bhattacharya, D., Kumar, D. and Gupta, R. K. 2006. Biocontrol of wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2.Canadian Journal of Microbiology 52 : 805 -808.

Shih, H.D., Hsu, F.L., Mulabagai, V., Dodda, R. and Huang, J.V.2003. Fungichromin : A substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 95-99.

Singh, A. K. and Chhatpar, H.S. 2011. Combined use of *Streptomyces* sp. A6 and chemical fungicides against fusarium wilt of *Cajanus cajan* may reduce the dosage of fungicides required in the field. Crop Protection 30 : 770-775.

Srinivasan, K. and Mathivanan, N. 2009. Biological control of sunflower necrosis virus disease with powder and liquid formulations of plant growth promoting microbial consortia under field conditions. Biological Control 51: 395-402.

Swan, D.G., Rodriguez, A.M., Vilches, C., Mendez, C. and Salas, J.A. 1994. Characterisation of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence. Molecular and General Genetics 242 : 358-362.

Taddei, A., Rodrıiguez, M.J., Marquez-Vilchez, E. and Castelli, C. 2006. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils : Morphological and biochemical studies I. Microbiological Research 161: 222-231.

Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. and Lumyong, S. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. Microbiology 151 : 1691-1695.

Tahtamouni , M.E., Hameed, K.M. and Saadoun, I.M. 2009. Biological control of white cottony stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary) by chitinolytic actinomycetes under laboratory and greenhouse conditions in Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences 5 : 306-313.

Tarabily, K.A., Soliman, M.H., Nassar, A.H., Hassani, H.A., Kenna, F. and Hardy, G.E. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. Plant Pathology 49 : 573-581.

Tresner, H.D., Davies, M.C. and Backus, E.J. 1961. Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. Journal of Bacteriology 81 : 70-80.

Valanarasu, M., Kannan, P., Ezhilvendan, S., Ganesan, G., Ignacimuthu, S. and Agastian, P. 2010. Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of

Streptomyces spp. ERI-04 isolated from western Ghats of Tamil Nadu. Journal of Medical Mycology 20 : 290-297.

Wana, M., Li, G., Zhang, J., Jiang, D. and Huang, H.C. 2008. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. Biological Control 46 : 552-559.

Wattanasilakorn, S., Sdoodee, S., Nualsri, C. and Chuenchit , S. 2012. Screening of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) rootstocks for the white root disease resistance . Journal of Agricultural Technology 8 : 2385-2395.

Wijesinghe, C.J., Wijeratnam, R. S. W., Samarasekara, J. K. R. R. and Wijesundera, R. L. C. 2011. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*).Crop Protection 30 : 300-306.

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

Xiao, K., Kinkel, L.L. and Samac, D. A. 2002. Biological control of Phytophthora root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. Biological Control 23 : 285-295.

Xue, L., Xue, Q., Chen, Q., Lin, C. , Shen, G. and Zhao, J. 2013. Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of Verticillium wilt of cotton. Crop Protection 43 : 231-240.

Youssef, Y. A., El-Tarabily, K. A. and Hussein, A. M. 2001. *Plectosporium tabacinum* root rot disease of white lupine (*Lupinus termis* Forsk.) and its biological control by *Streptomyces* species. Phytopathology 149 : 29-33.

Zarandi, M.E., Bojar, H.G.S., Dehkaei, P.T., Moosavi, A. A.S., Farokhi, P.R. and Aghighi, A.2009. Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. Journal of Biological Sciences 6 : 194-199.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวเคมี

1. Yeast extract malt extract broth

Bacto yeast extract	4 กรัม
Bacto malt extract	10 กรัม
Glucose	4 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

2. M9 medium agar

Mannitol	10 กรัม
Peptone	2 กรัม
Beef extract	1 กรัม
Yeast extract	1 กรัม
Agar	15 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

3. M9 medium agar ผสม 2.4% colloidal chitin

ละลาย colloidal chitin 24 กรัม และส่วนประกอบทั้งหมดของ M9 ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

4. Starch hydrolysis agar

Nutrient agar	23 กรัม
Potato starch	10 กรัม

ละลายวุ้นในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ต้มให้ละลาย ละลายแป้งในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ต้มให้ละลาย ผสมสารละลายวุ้นและแป้งเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5. Casein agar

Solution A : Skim milk	10 กรัม
Distilled water	90 มิลลิลิตร

เติมนมลงในน้ำพร้อมกับคนตลอดเวลาเพื่อไม่ให้นมจับตัวกันเป็นก้อน

Solution B : Agar	3 กรัม
Distilled water	97 มิลลิลิตร

นำ สารละลายทั้งสองชนิดแยกกันไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิ 45 – 50 องศาเซลเซียส ผสมสารละลายทั้งสองชนิดให้เข้ากัน เทใส่จานอาหารแล้วทิ้งไว้ให้แข็งตัว

6. Basal mineral salts medium

$(NH_4)_2SO_4$	2.64 กรัม
KH_2PO_4	2.38 กรัม
$K_2HPO_4.3H_2O$	5.65 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1 กรัม
Trace salts solution	1 มิลลิลิตร
agar	15 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

Trace salts solution

$CuSO_4.5H_2O$	0.64 กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.11 กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.79 กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.15 กรัม
Distilled water	100 มิลลิลิตร

7. Carboxyl methyl cellulose (CMC) agar

$C_4H_{12}N_2O_6$	5	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.001	กรัม
Carboxyl methyl cellulose	20	กรัม
Agar	16	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายวุ้นในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ต้มให้ละลาย ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ต้มให้ละลาย ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp.

ลำดับที่	ไอโซเลทเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ *R. microporus*
1	106	83.57
2	110	74.29
3	25	70.36
4	98	69.29
5	82	68.95
6	100	67.14
7	86	67.14
8	196	64.64
9	104	63.33
10	87	62.86
11	17	62.5
12	145	62.5
13	111	62.14
14	46	61.79
15	71	57.14
16	152	56.79
17	95	56.19
18	12	56.19
19	114	54.76
20	11	54.76

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลทเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ *R. microporus*
21	205	52.86
22	246	52.86
23	184	49.52
24	247	49.29
25	129	49.05
26	166	48.57
27	109	45.71
28	28	44.64
29	26	43.93
30	64	43.93
31	27	41.43
32	150	38.1
33	53	37.14
34	4	37.14
35	55	34.29
36	31	33.93
37	199	29.29
38	251	28.57
39	231	28.57
40	192	28.57
41	146	28.57
42	139	28.57

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลทเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ *R. microporus*
43	124	28.57
44	93	28.57
45	69	28.57
46	62	28.57
47	61	28.57
48	48	28.57
49	9	28.57
50	24	27.14
51	10	23.14
52	90	18.57
53	206	14.29
54	197	14.29
55	191	9.29
56	224	8.21
57	21	5.36
58	19	5.36
59	253	10.31
60	252	10.12
61	251	9.64

ตารางภาคผนวกที่ 2 การเจริญของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* และ *Rigidoporus microporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารประกอบในการทำสูตรสำเร็จแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชนิดของสารประกอบในการทำสูตรสำเร็จ	การเจริญของเชื้อ	
	S. griseus subsp. *formicus* x10^5cfu./ml	*R. microporus* (มิลลิเมตร)
Lactose monohydrate	4.93±0.03a	3.50±0.06a
PVP (k-30)	4.97±0.12a	3.33±0.09a
Sodium alginate	5.00±0.12a	3.23±0.15a
ชุดควบคุม	4.97±0.88a	3.37±0.20a
C.V.	3.78	6.98

[3/] ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

ตารางภาคผนวกที่ 3 วิเคราะห์ความแปรปรวนการเจริญของเชื้อ *Rigidoporus microporus* ในดินที่ผสมเชื้อ *Streptomyces* spp. ในหลอดทดลองหลังการทดสอบ 5 วัน

Source	df	SS	MS	F
Treatment	5	49.900	9.980	674.195*
Error	18	0.266	0.015	
Total	23	50.166		

C.V. 6.78%

* แตกต่างทางสถิติที่ p<0.05

ตารางภาคผนวกที่ 4 วิเคราะห์ความแปรปรวนการเจริญของเชื้อ *Rigidoporus microporus* ในดินที่ผสมเชื้อ *Streptomyces* spp. ในหลอดทดลองหลังการทดสอบ 10 วัน

Source	df	SS	MS	F
Treatment	5	374.544	74.909	2720.795*
Error	18	.496	0.028	
Total	23	375.039		

C.V. 3.84%

* แตกต่างทางสถิติที่ p<0.05

ตารางภาคผนวกที่ 5 วิเคราะห์ความแปรปรวนการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rigidoporus microporus* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ในดินในหลอดทดลอง หลังการทดสอบ 10 วัน

Source	df	SS	MS	F
Treatment	5	39343.637	7868.727	2679.543*
Error	18	52.859	2.937	
Total	23	39396.495		

C.V. 3.10%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p<0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 6 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 1

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	0.811	0.203	3.341^{ns}
Error	10	0.607	0.061	
Total	14	1.417		

C.V. 18.34%

^{ns} ไม่แตกต่างทางสถิติที่ $p<0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 7 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 2

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	0.204	0.051	8.500**
Error	10	0.060	0.006	
Total	14	0.264		

C.V. 4.78%

** แตกต่างทางสถิติที่ $p<0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 8 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 3

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	0.023	0.006	0.773^{ns}
Error	10	0.073	0.007	
Total	14	0.096		

C.V. 4.27%

^{ns} ไม่แตกต่างทางสถิติที่ p<0.05

ตารางภาคผนวกที่ 9 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 4

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	0.029	0.007	0.306^{ns}
Error	10	0.240	0.024	
Total	14	0.269		

C.V. 9.26%

^{ns} ไม่แตกต่างทางสถิติที่ p<0.05

ตารางภาคผนวกที่ 10 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 1

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	0.589	0.147	7.367*
Error	10	0.200	0.020	
Total	14	0.789		

C.V. 10.15%

* แตกต่างทางสถิติที่ p<0.05

ตารางภาคผนวกที่ 11 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 2

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	0.083	0.021	1.240^{ns}
Error	10	0.167	0.017	
Total	14	0.249		

C.V. 7.54%

^{ns} ไม่แตกต่างทางสถิติที่ p<0.05

ตารางภาคผนวกที่ 12 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 3

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	0.017	0.004	0.361^{ns}
Error	10	0.120	0.012	
Total	14	0.137		

C.V. 8.54%

^{ns} ไม่แตกต่างทางสถิติที่ p<0.05

ตารางภาคผนวกที่ 13 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดผงสูตรที่ 4

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	0.236	0.059	3.848^{ns}
Error	10	0.153	0.015	
Total	14	0.389		

C.V. 7.32%

^{ns} ไม่แตกต่างทางสถิติที่ p<0.05

ตารางภาคผนวกที่ 14 วิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถในการละลายน้ำของสูตรสำเร็จทั้งชนิดแกรนูลและชนิดผง (8 สูตร)

Source	df	SS	MS	F
Treatment	7	21859.96	3122.85	182.356*
Error	16	274.00	17.13	
Total	23	22133.96		

C.V. 6.68 %

* แตกต่างทางสถิติที่ $p<0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 15 วิเคราะห์ความแปรปรวนการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rigidoporus microporus* โดยสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	24282.709	6070.677	16423.659
Error	15	5.544	0.370	
Total	19	24288.253		

C.V. 0.87%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p<0.05$

ตารางภาคผนวกที่ 16 วิเคราะห์ความแปรปรวนการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rigidoporus microporus* โดยสูตรสำเร็จชนิดผง

Source	df	SS	MS	F
Treatment	4	16858.306	4214.576	7356.052*
Error	10	5.729	0.573	
Total	14	16864.035		

C.V. 1.12%

* แตกต่างทางสถิติที่ $p<0.05$

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ 17 จำนวนประชากรของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล ในการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง จากการทดสอบ 6 เดือน

	จำนวนประชากร x10^6 cfu/g							
	สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส				สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลอุณหภูมิห้อง			
	1	2	3	4	1	2	3	4
เริ่มต้น	1.35±0.02ab	1.62±0.01a	1.96±0.01b	1.67±0.02b	1.34±0.02a	1.62±0.01a	1.96±0.01a	1.67±0.02a
เดือนที่ 1	1.33±0.09ab	1.30±0.06b	1.90±0.06b	1.73±0.09b	1.26±0.07a	1.23±0.03b	1.83±0.09a	1.70±0.06a
เดือนที่ 2	1.24±0.11b	1.17±0.03b	1.48±0.11c	1.22±0.04c	0.68±0.02b	0.72±0.04c	0.96±0.04b	0.81±0.03b
เดือนที่ 3	1.54±0.18a	1.63±0.22a	2.27±0.09a	2.10±0.12a	0.53±0.07c	0.60±0.00d	0.70±0.06c	0.60±0.12c
เดือนที่ 4	0.57±0.07c	0.50±0.01c	1.09±0.06d	0.83±0.08d	0.30±0.00d	0.31±0.02e	0.50±0.05d	0.31±0.02d
เดือนที่5	0.44±0.01c	0.49±0.01c	0.60±0.04e	0.53±0.01e	0.17±0.01e	0.13±0.03f	0.17±0.01e	0.15±0.01e
เดือนที่ 6	0.36±0.01c	0.35±0.01c	0.39±0.00f	0.39±e	0.04±0.01f	0.04±0.01g	0.05±0.01e	0.06±0.01e

ตารางภาคผนวกที่ 18 จำนวนประชากรของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในสูตรสำเร็จชนิดผง ในการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง จากการทดสอบ 6 เดือน

	จำนวนประชากร x10^6 cfu/g							
	สูตรสำเร็จชนิดผงเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส				สูตรสำเร็จชนิดผงอุณหภูมิห้อง			
	1	2	3	4	1	2	3	4
เริ่มต้น	1.39±0.05b	1.52±0.02a	1.45±0.05b	1.67±0.03c	1.39±0.05a	1.52±0.02a	1.45±0.05b	1.67±0.03b
เดือนที่ 1	1.53±0.09ab	1.60±0.12a	1.43±0.09b	1.83±0.03b	1.46±0.09a	1.63±0.12a	1.66±0.09a	1.90±0.06a
เดือนที่ 2	1.02±0.07c	1.50±0.08a	1.41±0.10b	1.39±0.04d	0.69±0.03b	0.69±0.06b	0.74±0.04c	0.87±0.02d
เดือนที่ 3	1.63±0.09a	1.50±0.15a	1.96±0.07a	2.14±0.03a	0.40±0.00c	0.50±0.12b	0.67±0.12c	1.03±0.09c
เดือนที่ 4	0.39±0.03d	0.52±0.01b	0.79±0.10c	0.86±0.03e	0.32±0.02c	0.47±0.06b	0.33±0.04d	0.39±0.05e
เดือนที่5	0.41±0.03d	0.50±0.01b	0.57±0.02c	0.56±0.02f	0.16±0.01d	0.21±0.01c	0.31±0.02d	0.11±0.01f
เดือนที่ 6	0.35±0.02d	0.35±0.01b	0.42±0.01c	0.46±0.06g	0.02±0.01d	0.05±0.01c	0.05±0.02e	0.06±0.01f

ภาคผนวก ง

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis

Sample Name : streptomyces

971 bp Identification
Homology Search with BLASTn program from NCBI database

Sequences producing significant alignments:		SCORE	E VALUE
AB184627	Streptomyces griseus subsp. formicus strain: NBRC 14886	1752	0.0
DQ026653	Streptomyces varsoviensis strain NRRL B-3589	1719	0.0
AB184306	Streptomyces varsoviensis strain: NBRC 13093	1716	0.0
HQ537078	Streptomyces sp. FXJ23	1712	0.0
AY314785	Streptomyces sp. FXJ23	1712	0.0

BLASTN 2.2.25+
Reference:
Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: ZKNBFKUG01S

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
14,118,894 sequences; 36,397,425,001 total letters

Query= step contig Length=971
>step contig
AATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACCTC
CGACCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCA
GCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGA
CCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGT
TGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCC
GGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT
AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCG
ATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTA
ACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAAGGCTTGACATACACCGGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACA
GGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCTTG

Alignment and Phylogenic tree by MEGA 4
Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA)

>gi|90960448|dbj|AB184627.1| Streptomyces griseus subsp. formicus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14886
Length=1473

Score = 1752 bits (1942), Expect = 0.0
Identities = 971/971 (100%), Gaps = 0/971 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    AATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACCTC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  90   AATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACCTC 149

Query  61   CGACCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCA 120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  150  CGACCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCA 209

Query  121  GCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGA  18
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  210  GCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGA 269

Query  181  CCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA 240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  270  CCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA 329

Query  241  TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGT 300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  330  TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGT 389

Query  301  TGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGG 360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  390  TGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGG 449

Query  361  CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTG 420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  450  CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTG 509

Query  421  GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCC 480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  510  GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCC 569

Query  481  GGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT 540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  570  GGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT 629

Query  541  AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCG 600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  630  AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCG 689
```

```
Query  601  ATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC 660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  690  ATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC 749

Query  661  ACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTA 720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  750  ACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTA 809

Query  721  ACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGAC 780
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  810  ACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGAC 869

Query  781  GGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTAC 840
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  870  GGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTAC 929

Query  841  CAAGGCTTGACATACACCGGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACA 900
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  930  CAAGGCTTGACATACACCGGAAACGGCCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACA 989

Query  901  GGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG 960
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  990  GGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG1049

Query  961  CGCAACCCTTG  971
            ||||||||||
Sbjct  1050 CGCAACCCTTG  1060
```