



ชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สำหรับควบคุม *Rigidoporus microporus*  
เชื้อสาเหตุโรครากขาว และส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางพารา  
*Bacillus subtilis* Bio-agent for Controlling White Root Rot Disease  
(*Rigidoporus microporus*) and Growth Promotion of Para Rubber

พันธ์ทิพย์ จุลวรรณโณ  
Puntip Jullawanno

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สำหรับควบคุม *Rigidoporus microporus*  
เชื้อสาเหตุโรครากขาว และส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางพารา  
*Bacillus subtilis* Bio-agent for Controlling White Root Rot Disease  
(*Rigidoporus microporus*) and Growth Promotion of Para Rubber

พันธ์ทิพย์ จุลวรรณโณ  
Puntip Jullawanno

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์                      ชื่อภักดิ์ *Bacillus subtilis* สำหรับควบคุม *Rigidoporus microporus*  
เชื้อสาเหตุโรครากขาว และส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางพารา  
ผู้เขียน                                      นางสาวพันธ์ทิพย์ จุลวรรณโณ  
สาขาวิชา                                      การจัดการทรัพยากรดิน

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อัจฉรา เพ็งหนู)

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขวัญตา ขาวมี)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อัจฉรา เพ็งหนู)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวนุช ถาวรพุกษ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการ  
ทรัพยากรดิน

.....  
(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อัจฉรา เพ็งหนู)  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ .....  
(นางสาวพันธ์ทิพย์ จุลวรรณโณ)  
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....

(นางสาวพันธ์ทิพย์ จุลวรรณโณ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ชีวภัณฑ์ <i>Bacillus subtilis</i> สำหรับควบคุม <i>Rigidoporus microporus</i> เชื้อสาเหตุโรครากขาว และส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางพารา
ผู้เขียน	นางสาวพันธ์ทิพย์ จุลวรรณโณ
สาขาวิชา	การจัดการทรัพยากรดิน
ปีการศึกษา	2564

### บทคัดย่อ

การจัดการดินและธาตุอาหารอย่างไม่เหมาะสม ทำให้ต้นยางพาราอ่อนแอต่อการเกิดโรคโดยเฉพาะโรครากขาว บางครั้งการใช้สารเคมีควบคุมโรคไม่ได้ผลและทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในดินและสภาพแวดล้อม การศึกษาจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา *Bacillus subtilis* เป็นชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำและสูตรไม่ละลายน้ำ และศึกษาการใช้ชีวภัณฑ์ร่วมกับการจัดการธาตุอาหาร ต่อการเจริญเติบโตของยางพารา รวมทั้งการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* โรครากขาวของยางพารา โดยนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธีการ pour-plate กับอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ทดสอบผลของสารประกอบชีวภัณฑ์ ต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรค รวมถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคโดยใช้อาหาร PDA ผสมสารพาที่เป็นองค์ประกอบของชีวภัณฑ์ เพื่อพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ รูปแบบแกรนูล (granulation) จากนั้นจึงประเมินสมบัติทางกายภาพ ชีวภาพของชีวภัณฑ์ และทดสอบผลของชีวภัณฑ์ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นยางพารา รวมถึงการใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ร่วมกับการจัดการธาตุอาหารเพื่อควบคุมการเกิดโรครากขาว โดยวางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCBD) 4 กรรมวิธี 4 ซ้ำๆ ละ 8 ต้น ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีที่สุด (97.76 เปอร์เซ็นต์) และในอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สูตรละลายน้ำ 1 สามารถเจริญได้ดีมีปริมาณเชื้อ  $1.5 \pm 1.8 \times 10^{11}$  cfu/ml รวมทั้งสามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* (97.78 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (PDA) เมื่อเตรียมเป็นชีวภัณฑ์ปรากฏว่า ปริมาณ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 มีปริมาณเชื้อในสูตรสูงกว่า *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 โดยมีปริมาณเชื้อสูงสุดสำหรับชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 ( $8.5 \pm 1.3 \times 10^{11}$  cfu/g) และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ( $9.0 \pm 0.8 \times 10^{11}$  cfu/g) และชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 ละลายน้ำได้เร็วอยู่ในช่วง 1.2-1.4 นาที การกระจายตัวของ *B. subtilis* ในชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 มีความสม่ำเสมอ และสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ 96-99 เปอร์เซ็นต์ การเก็บรักษาชีวภัณฑ์ภายใต้อุณหภูมิ 10, 28 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน ทำให้สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 มีปริมาณเชื้อมากกว่า  $10^9$  cfu/g และสามารถควบคุมเชื้อโรครากขาวได้ 84-94 เปอร์เซ็นต์ สำหรับภายใต้สภาวะที่มีรังสี ultraviolet C (UVC)

ที่ความเข้มแสง  $0.1 \text{ W/m}^2$  ปริมาณของ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $8.1 \times 10^{11} \text{ cfu/g}$  และ  $7.1 \times 10^{11} \text{ cfu/g}$  ตามลำดับ และลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 3 กระทั่งที่เวลา 96 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $9.6 \times 10^4$  และ  $5.9 \times 10^6 \text{ cfu/g}$  ตามลำดับ สำหรับประสิทธิภาพการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* ของชีวภัณฑ์ที่เก็บภายใต้รังสี UVC ที่เวลา 96 ชั่วโมง ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ 34-40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์

ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ทำให้การเจริญเติบโตของยางพาราเพิ่มขึ้น ทั้งการเจริญของรากแก้ว และปริมาณของรากฝอย รวมถึงความสูงของต้น จำนวนใบ น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นยางพาราเพิ่มขึ้น และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใช้ชีวภัณฑ์ อีกทั้งชีวภัณฑ์ทั้ง 2 สูตร ยังทำให้ความเป็นประโยชน์ของธาตุฟอสฟอรัสในดินหลังการทดลองเพิ่มขึ้นจากเดิม 33 เปอร์เซ็นต์

การจัดการธาตุอาหารร่วมกับการใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ทำให้การเกิดโรครากขาวลดลงและการเจริญเติบโตของยางพาราเพิ่มขึ้น โดยการใช้ปุ๋ยสูตร 20-8-20 ทำให้การเกิดโรคทั้งส่วนเหนือดินและรากต่ำกว่าปุ๋ยสูตร 15-15-15 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) ขณะที่การเจริญของยางพาราส่วนเหนือดิน และราก รวมทั้งความเข้มข้นของธาตุอาหาร และการดูที่ใช้ธาตุอาหารของยางพาราสูงกว่าการใช้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ )

ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ในรูปแบบที่เหมาะสมทำให้ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ร่วมกับปุ๋ยที่เหมาะสมไม่เพียงแต่ลดการเกิดโรครากขาวแต่ยังทำให้การเจริญเติบโตของยางพาราเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการจัดการสวนยางพารา จึงควรใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ร่วมกับการจัดการธาตุอาหาร เพื่อให้ต้นยางพาราปลอดโรครากขาว และสามารถเจริญเติบโตตามศักยภาพพันธุ์

<b>Thesis Title</b>	<i>Bacillus subtilis</i> Bio-agent for Controlling White Root Rot Disease ( <i>Rigidoporus microporus</i> ) and Growth Promotion of Para Rubber
<b>Author</b>	Ms. Puntip Jullawanno
<b>Major Program</b>	Soil Resources Management
<b>Academic Year</b>	2021

### ABSTRACT

Unsuitable soil and nutrient management resulted in rubber trees susceptible to disease, especially white root rot disease. The use of chemicals is ineffective in controlling the disease and affects soil organisms and the environment. The study aims were to develop *Bacillus subtilis* bio-agent as soluble formula and insoluble formula, the use of biological products in combination with nutrient management on the growth of para rubber, and to control *Rigidoporus microporus*, caused by white root rot disease of rubber tree. Bacterial antagonists, *B. subtilis* isolate SM1 and LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* isolate PT7 were tested against *R. microporus* fungal mycelium by pour-plate method with potato dextrose agar (PDA). Carriers of bio-agent were tested on the growth of antagonistic bacteria and pathogenic fungi including the effectiveness of inhibiting the pathogenic fungi using PDA containing carriers of bio-agent. *B. subtilis* bio-agent in granulation form was developed as soluble formula and insoluble formula, and then the physical and biological properties were evaluated. Finally, the effect of bio-agents on germination and growth of rubber trees, including the use of *B. subtilis* bio-agent together with nutrient management for controlling white root rot disease, was conducted by a randomized complete block design (RCBD) 4 treatments, 4 repetitions, and 8 plants per replication. The results showed that the antagonistic bacteria *B. subtilis*, SM1 isolate, was the best inhibitor of *R. microporus* mycelium (97.76 percent). In PDA medium containing carriers of bio-agent, *B. subtilis* SM1 isolate, soluble formula 1 SM1 was highly in cultured ( $1.5 \pm 1.8 \times 10^{11}$  cfu/ml) and suppressed *R. microporus* mycelium (97.78 percent). Preparation of *B. subtilis* bio-agent appeared that the viable number of *B. subtilis* isolate SM1 was higher than that of *B. subtilis* isolate LPDD3-2. Comparison of bio-agent form, it was found that the soluble formula 1 SM1 and insoluble formula 3 SM1 provided the highest viable bacteria of  $8.5 \pm 1.3 \times 10^{11}$  cfu/g and  $9.0 \pm 0.8 \times 10^{11}$  cfu/g respectively.



Soluble formula 1 SM1 showed high solubility in water in the range of 1.2-1.4 minutes. *B. subtilis* in the soluble formula 1 SM1 and insoluble formula 3 SM1 showed uniform distribution and 96-99 percent inhibition of *R. microporus* mycelium. The bio-agent under 10, 28 and 37°C for 12 months storage resulted in the soluble formula 1 SM1, and the insoluble formula 3 SM1 obtained a bacterial viability of more than  $10^9$  cfu/g and controlling white root rot pathogens 84-94 percent. Under ultraviolet C (UVC) conditions at a light intensity of  $0.1 \text{ W/m}^2$ , the *B. subtilis* survival of soluble formula 1 SM1 and insoluble formula 3 SM1 were based on the initial viability of  $8.1 \times 10^{11}$  cfu/g and  $7.1 \times 10^{11}$  cfu/g, respectively. The viability of *B. subtilis* decreased rapidly at 3 h until 96 h. There were  $9.6 \times 10^4$  and  $5.9 \times 10^6$  cfu/g, respectively. For the efficacy of the bio-agent under UVC condition at 96 h on inhibition of *R. microporus* mycelium, it was found that the soluble formula 1 SM1 and the insoluble formula 3 SM1 showed 34-40 percent inhibition of the fungal mycelium, consistent with the surviving number of *B. subtilis* in bio-agent.

The soluble formula 1 SM1 and the insoluble formula 3 SM1 resulted in the rubber growth improvement especially in taproot germination, the amount of fibrous root, plant height, leaves number, fresh weight and dry weight of rubber tree. There was a statistically significant difference ( $P \leq 0.05$ ) compared to the non-biological control. In addition, both formulations of *Bacillus subtilis* also increased the availability of phosphorus in the soil after the experiment by 33 percent. The combination of nutrients with water soluble formulation 1 SM1 and insoluble formulation 3 SM1 resulted in a reduction of white root rot disease. Fertilizer application of 20-8-20 formula obtained in a lower incidence of both above-soil and root of the rubber tree than formula 15-15-15, but there was no statistically significant difference ( $P \leq 0.01$ ).

*B. subtilis* bio-agent in the appropriate formulation can increase the *B. subtilis* efficacy. Bio-agent of *B. subtilis* in combination with fertilizers can not only reduce disease incidence but also enhance rubber growth. In order to the rubber tree free from white root rot disease and able to grow according to the potential of variety. Therefore, in the management of rubber plantations, *Bacillus subtilis* bio-agent should be used with appropriate nutrient management.

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา เฟื่องหนู อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง ที่กรุณาเสียสละเวลา ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำปรึกษาในด้านต่างๆ ตลอดจนถึงแนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ขวัญตา ขาวมี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร.เสาวนุช ถาวรพฤษ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และคำแนะนำ ในการแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาสัตวกรรมการเกษตรและการจัดการ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และคำปรึกษาในด้านต่างๆ และขอบคุณศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ และบุคลากรของศูนย์ ที่เอื้ออำนวยความสะดวก ทั้งด้านวัสดุ อุปกรณ์ ตลอดจนถึงสถานที่ในการทำวิทยานิพนธ์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ภายใต้โครงการ การควบคุมโรครากขาวของยางพาราโดยชีววิธีร่วมกับการจัดการดิน และทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และคุณแม่ คอยสนับสนุนส่งเสริมทางการศึกษา และเป็นแรงผลักดันในการทำวิทยานิพนธ์ ให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้กันตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ ส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พันธ์ทิพย์ จุฬวรรณโณ

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(13)
รายการตารางภาคผนวก	(17)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	19
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	20
วัสดุ	20
อุปกรณ์	21
วิธีการทดลอง	22
3. ผลการทดลอง	34
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	87
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	96
เอกสารอ้างอิง	98
ภาคผนวก	111
ประวัติผู้เขียน	119

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. สารประกอบสูตรละลายน้ำ.....	24
2. สารประกอบสูตรไม่ละลายน้ำ.....	24
3. พารามิเตอร์และวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติของดิน.....	29
4. พารามิเตอร์และวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติของพืช.....	30
5. เพอร์เซ็นต์ยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์.....	36
6. การเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบสูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ.....	37
7. เพอร์เซ็นต์ยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนอาหาร PDA ผสมสารประกอบสูตรละลายน้ำ.....	40
8. เพอร์เซ็นต์ยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนอาหาร PDA ผสมสารประกอบสูตรไม่ละลายน้ำ.....	41
9. ความสามารถในการละลายน้ำของชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เพอร์เซ็นต์.....	43
10. ความเป็นกรดเป็นด่างของชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เพอร์เซ็นต์.....	44
11. ปริมาณแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ในชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ.....	45
12. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรละลายน้ำ ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เพอร์เซ็นต์.....	46
13. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เพอร์เซ็นต์.....	47
14. การงอกของรากและการเจริญเติบโตของยางพาราเมื่อใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1.....	68
15. การงอกของรากและการเจริญเติบโตของยางพาราเมื่อใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1.....	69
16. ผลของชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 ต่อการเจริญเติบโตของยางพาราในโรงเรือนทดลอง.....	72
17. ผลวิเคราะห์ดินก่อนการทดลอง.....	74
18. ปริมาณธาตุอาหารและสมบัติทางเคมีของดินหลังการใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 ต่อการเจริญเติบโตของยางพาราในโรงเรือนทดลอง.....	75
19. ความเข้มข้นของธาตุอาหารในต้นยางพาราส่วนเหนือดิน หลังการใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 ต่อการเจริญเติบโตของยางพาราในเรือนทดลอง.....	76
20. การดูดใช้ธาตุอาหารของต้นยางพาราหลังการใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 ต่อการเจริญเติบโตของยางพาราในเรือนทดลอง.....	77

## รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
21. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 ร่วมกับการใช้ปุ๋ยในการควบคุม <i>R. microporus</i> ในโรงเรือนทดลอง.....	82
22. ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 ร่วมกับการใช้ปุ๋ยในการควบคุม <i>R. microporus</i> ในโรงเรือนทดลอง.....	83
23. สมบัติทางเคมีและปริมาณธาตุอาหารพืชในดิน หลังการใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 และละลายน้ำ 1 SM1 ร่วมกับการใช้ปุ๋ย.....	84
24. ความเข้มข้นของธาตุอาหารพืชในใบยางพารา หลังการใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 และละลายน้ำ 1 SM1 ร่วมกับการใช้ปุ๋ย.....	85
25. การดูดใช้ธาตุอาหารในใบยางพารา หลังการใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 และละลายน้ำ 1 SM1 ร่วมกับการใช้ปุ๋ย.....	86

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ลักษณะของโรครากขาว (A) เส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> (B) เส้นใยที่ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 100 เท่า (C) การเข้าทำลายระบบราก (D) การสร้างดอกเห็ดบริเวณโคนต้นยางพารา.....	7
2. วงจรการเกิดโรครากขาวของยางพารา.....	9
3. ระดับความรุนแรงการเกิดโรคส่วนเหนือดินของต้นยางพารา.....	32
4. ระดับความรุนแรงการเกิดโรคส่วนรากของต้นยางพารา.....	33
5. แบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 (B) <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท LPDD3-2 (C) <i>B. amyloliquefaciens</i> ไอโซเลท PT7.....	34
6. ปฏิกริยาแกรมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 (B) <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท LPDD3-2 (C) <i>B. amyloliquefaciens</i> ไอโซเลท PT7.....	34
7. ลักษณะเซลล์และเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 (B) <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท LPDD3-2 (C) <i>B. amyloliquefaciens</i> ไอโซเลท PT7.....	35
8. ลักษณะการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) ชุดควบคุม (B) <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 (C) <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท LPDD3-2 (D) <i>B. amyloliquefaciens</i> ไอโซเลท PT7.....	35
9. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดากำลังขยาย 100 เท่า (A) ชุดควบคุม (B) <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 (C) <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท LPDD3-2 (D) <i>B. amyloliquefaciens</i> ไอโซเลท PT7.....	36
10. ผลของอาหาร PDA ผสมสารประกอบสูตรละลายน้ำ 1 ต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) ชุดควบคุม <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 (B) ชุดควบคุม <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท LPDD3-2 (C) ชุดควบคุม <i>B. amyloliquefaciens</i> ไอโซเลท PT7 (D) ชุดทดสอบ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 (E) ชุดทดสอบ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท LPDD3-2 (F) ชุดทดสอบ <i>B. amyloliquefaciens</i> ไอโซเลท PT7.....	38
11. การเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> บนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบที่ระยะเวลา 7 วัน (A) ชุดควบคุม (B) สูตรละลายน้ำ 1 (C) สูตรไม่ละลายน้ำ 3 .....	38
12. การเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> บนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบที่ระยะเวลา 7 วัน.....	39

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
13. การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> บนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบสูตรละลายน้ำ 1 โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) ชุดควบคุม (PDA) (B) <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 (C) <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท LPDD3-2 (D) <i>B. amyloliquefaciens</i> ไอโซเลท PT7.....	40
14. ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> รูปแบบแกรนูล (A) สูตรละลายน้ำ 1 SM1 (B) สูตรละลายน้ำ 2 SM1 (C) สูตรละลายน้ำ 3 SM1.....	42
15. ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> รูปแบบแกรนูล (A) สูตรไม่ละลายน้ำ 1 SM1 (B) สูตรไม่ละลายน้ำ 2 SM1 (C) สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1.....	42
16. การกระจายตัวของเอนโดสปอร์แบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ในชีวภัณฑ์ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย (10 $\mu$ m) 5000 เท่า (A) สูตรละลายน้ำ 1 SM1 (B) สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1.....	45
17. ลักษณะการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> ไอโซเลท NK 6 โดยชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 เมื่อทดสอบโดยวิธีการ pour plate ด้วยอาหาร PDA และวางไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน (A) ชุดควบคุม (B) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (C) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์.....	47
18. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> เมื่อทดสอบกับชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา (A) ชุดควบคุมกำลังขยาย 40 เท่า และ 100 เท่า (B) เส้นใยเชื้อราชุดทดสอบกำลังขยาย 40 เท่า และ 100 เท่า.....	48
19. การใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และ LPDD 3-2 สูตรละลายน้ำ ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> ในดินผสม (A) การทดลองที่ 1 ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 5 และ 11 เซนติเมตร (B) การทดลองที่ 2 ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 11 เซนติเมตร.....	50
20. การใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรละลายน้ำ เพื่อยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> ในดินผสมที่ระยะเวลา 11 วัน (A) การทดลองที่ 1 ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 5 และ 11 เซนติเมตร (B) การทดลองที่ 2 ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 11 เซนติเมตร.....	51
21. การใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> ในดินผสมที่ระยะเวลา 9 วัน (A) การทดลองที่ 1 ใช้ชีวภัณฑ์ผสมคลุกเคล้ากับดิน (B) การทดลองที่ 2 ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 2, 5 และ 8 เซนติเมตร.....	52

## รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
22. ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> ในดินผสม (A) การทดลองที่ 1 ใช้ชีวภัณฑ์ผสมคลุกเคล้ากับดิน (B) การทดลองที่ 2 ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 2, 5 และ 8 เซนติเมตร.....	53
23. การมีชีวิตรอดของ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 ในชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 10, 28 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน.....	55
24. การมีชีวิตรอดของ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 ในชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 10, 28 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน.....	56
25. ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรละลายน้ำ ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 10 และ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน.....	59
26. ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 28 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน.....	61
27. การมีชีวิตรอดของ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 ภายใต้สภาพที่มีรังสี UVC เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (A) สูตรละลายน้ำ (B) สูตรไม่ละลายน้ำ.....	63
28. ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 ภายใต้สภาพที่มีรังสี UVC เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> (A) สูตรละลายน้ำ (B) สูตรไม่ละลายน้ำ.....	64
29. การมีชีวิตรอดของแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 ในดินปลูกยางพาราเป็นระยะเวลา 7 เดือน.....	65
30. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของยางพาราที่ระยะเวลา 10 และ 40 วัน และภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ (A) ชุดควบคุม (B) สูตรละลายน้ำ 1 SM1 (C) สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 (D) การเจริญของรากแก้ว และรากฝอยชุดควบคุม (E) การเจริญของรากแก้วและรากฝอยชุดทดสอบสูตรละลายน้ำ 1 SM1.....	67
31. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในเซลล์รากแก้วของยางพารา ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 100 เท่า (A) ชุดควบคุม (B) สูตรละลายน้ำ 1 SM1 (C) สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1.....	67



รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
32. การเจริญเติบโตของต้นยางพาราเมื่อใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ร่วมกับสูตรละลายน้ำ 1 SM1 (A) ต้นยางพาราชุดควบคุม อายุ 1, 2 และ 3 เดือน (B) ต้นยางพาราชุดทดสอบ อายุ 1, 2 และ 3 เดือน.....	71
33. ลักษณะรากของยางพาราเมื่อใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ร่วมกับสูตรละลายน้ำ 1 SM1 (A) รากของชุดควบคุม อายุ 1, 2 และ 3 เดือน (B) รากของชุดทดสอบอายุ 1, 2 และ 3 เดือน.....	71
34. ลักษณะรากของยางพาราเมื่อใช้ชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ร่วมกับละลายน้ำ 1 SM1 ที่ระยะเวลา 3 เดือน ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง แบบสเตอริโอ (A) รากแก้วชุดควบคุม (B) รากฝอยชุดควบคุม (C) รากแก้วชุดทดสอบ (D) รากฝอยของชุดทดสอบ.....	72
35. ลักษณะการเปลี่ยนแปลงส่วนเหนือดิน และรากของต้นยางพารา ที่ระยะเวลา 3 เดือน เมื่อเชื้อรา <i>R. microporus</i> เข้าทำลาย ในชุดควบคุม (A) ต้นยางพาราที่มีการปลูกเชื้อในระยะเริ่มต้น (B) เชื้อรา <i>R. microporus</i> เริ่มเข้าทำลายจนถึงระดับรุนแรง.....	79
36. ลักษณะส่วนเหนือดินและรากของต้นยางพาราเมื่อเชื้อรา <i>R. microporus</i> เข้าทำลายจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรค (A) ชุดควบคุม+ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค (B) ใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 และสูตรละลายน้ำ 1 SM1+ปุ๋ยสูตร 15-15-15+ปลูกเชื้อ <i>R. microporus</i> (C) ใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 และสูตรละลายน้ำ 1 SM1+ปุ๋ยสูตร 20-8-20+ปลูกเชื้อ <i>R. microporus</i> .....	81

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
1. การเจริญของแบคทีเรียปฏิชีวนะบนอาหาร PDA ที่ผสมสารพา.....	113
2. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 สูตรละลายน้ำ ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> ในดินผสม.....	114
3. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> ในดินผสม.....	115
4. ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน.....	116
5. ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน.....	116
6. ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน.....	117
7. ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน.....	117
8. ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน.....	118
9. ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ <i>B. subtilis</i> ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน.....	118

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*, Muell. Arg.) เป็นพืชยืนต้นที่มีความสำคัญในระบบเศรษฐกิจ ซึ่งเห็นได้จากประเทศไทยมีเนื้อที่เพาะปลูกยางพารามากกว่า 25 ล้านไร่ และได้ผลผลิต 4 ล้านตัน ในปี พ.ศ. 2563 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) ขณะที่การส่งออกยางพาราปี พ.ศ. 2564 มีมูลค่า 11,754.80 ล้านบาท ปรับตัวเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.09 จากปี พ.ศ. 2563 (การยางแห่งประเทศไทย, 2564) ก่อให้เกิดกิจกรรมต่อเนื่องทั้งภาคการผลิต ภาคอุตสาหกรรม และภาคการตลาด แม้ว่าประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกยางพาราที่สำคัญของโลก แต่การจัดการสวนยางพาราให้สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการดูแลรักษาต้นยางพาราให้มีอายุอย่างน้อย 25-30 ปี ซึ่งมักประสบปัญหาเรื่องโรคระบาด โดยเฉพาะโรครากขาว (White root rot disease) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* เข้าทำลายระบบราก ในประเทศไนจีเรียโรครากขาวสร้างความเสียหายให้กับต้นยางพาราถึง 94 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ปลูกยาง (Omorusi *et al.*, 2014) ประเทศอินโดนีเซีย พบพื้นที่ได้รับผลกระทบจากโรครากขาวมากกว่า 80,000 เฮกตาร์ (Jayasinghe, 2010) ส่วนภาคใต้ของประเทศไทยเป็นพื้นที่เสี่ยงเกิดการแพร่ระบาดของโรครากขาวได้ง่าย เนื่องจากมีสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้น อีกทั้งพื้นที่มีการปลูกยางพาราต่อเนื่อง ยาวนาน และไม่ได้กำจัดตออย่างเก่าจะพบเร็วขึ้น จึงมักพบโรครากขาวในยางพาราอายุ 1-5 ปี และพบในยางพาราอายุ 15 ปี ขึ้นไป สำหรับพื้นที่ปลูกยางใหม่ (สายทอง, 2556) เมื่อพื้นที่ที่มีการสะสมของโรค ส่งเสริมให้การระบาดของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็วและรุนแรง มีผลให้ต้นยางตายก่อนกำหนด นอกจากนี้เชื้อรา *R. microporus* ยังสร้างความเสียหายให้กับระบบรากพืชชนิดอื่นๆ ได้แก่ ทุเรียน สะตอ ส้ม ปาล์ม น้ำมัน ลองกอง พริกไทย พริกชี้หู กาแฟ มะเขือ มันสำปะหลัง เป็นต้น

การเกิดโรครากขาวโดยทั่วไปเกษตรกรส่วนใหญ่ไม่ได้มีการควบคุมโรคในระยะแรก ส่งผลให้โรครากขาวแพร่กระจายเป็นวงกว้าง จึงมีการนำสารเคมีกำจัดเชื้อรามาใช้ในภายหลังซึ่งสามารถควบคุมโรครากขาวได้ในระดับหนึ่ง แต่ผลกระทบที่เกิดขึ้นทำให้สารเคมีตกค้างในแหล่งน้ำและดิน ดินเสื่อมโทรม และยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม การศึกษาเพื่อหาวิธีการใหม่ๆ จึงเป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* แทนการใช้สารเคมี และมีส่วนช่วยเหลือเกษตรกรไทยผู้ปลูกยางพาราให้ได้ผลผลิตต่อเนื่องและยาวนาน ทั้งนี้การควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธีเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในกลุ่มของบาซิลลัส ที่ได้จากดินปลูกยางพารา (ศุภรัตน์, 2564) เป็นเชื้อที่นิยมใช้เนื่องจากควบคุมโรคพืชได้ และมีคุณสมบัติเด่น เช่น เจริญเติบโตเร็วภายใน 24-48 ชั่วโมง สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารหลายชนิด สร้างสารปฏิชีวนะสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนร้อน ทนสารเคมี ทนรังสียูวี และสามารถสร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์เมื่อ

อาหารมีจำกัด (ดวงพร, 2537) สร้างเอมไซม์ที่ช่วยย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรค แข่งขันการใช้อาหารบนผิวราก ใบ ดอกหรือผลของพืชได้ดี (วานิด, 2552) อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่ใช้จุลินทรีย์ในรูปเซลล์สด (fresh cell) ที่เตรียมขึ้นใหม่ เป็นสภาพที่มีข้อจำกัดหลายประการ เนื่องจากจุลินทรีย์ในรูปเซลล์สดมีระยะเวลาในการเก็บรักษาสั้น ไม่สะดวกต่อการใช้งาน และยังเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย จึงได้มีการพัฒนาจุลินทรีย์ให้อยู่ในรูปแบบของชีวภัณฑ์ที่หลากหลาย เช่น รูปแบบน้ำ (liquid formulation) รูปแบบผง (powder formulation) และรูปแบบเม็ด (pellet formulation) แต่ก็ยังพบข้อจำกัดมากมาย เช่น ชีวภัณฑ์รูปแบบน้ำมีความทนทานต่ออุณหภูมิ และสารเคมีต่ำ ต้องเก็บรักษาในภาชนะบรรจุที่พิเศษ มีระบบการแลกเปลี่ยนก๊าซและความชื้นที่เหมาะสม ปนเปื้อนง่าย ไม่สะดวกต่อการขนส่ง อายุการเก็บรักษาสั้น และผลิตภัณฑ์มีความคงตัวต่ำ เช่นเดียวกับชีวภัณฑ์รูปแบบผง พังกระจายได้ง่าย จับตัวกันเป็นก้อน อายุการเก็บรักษาสั้น ละลายน้ำไม่ดี และเป็นตะกอนได้ง่าย ในขณะที่ชีวภัณฑ์รูปแบบอิมัลชัน (emulsions formulation) ขนาดของเม็ดเจลที่ได้ไม่มีความสม่ำเสมอ และเสี่ยงต่อการแยกชั้นน้ำและน้ำมันออกจากกัน ส่วนชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ด การละลายน้ำของชีวภัณฑ์ค่อนข้างช้า ค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากเครื่องมือที่มีราคาแพงสำหรับอัดเม็ด เมื่อเปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์รูปแบบแกรนูล (granular formulation) มีข้อดี คือ มีความคงตัวดีกว่าเพราะมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอากาศน้อยกว่า ไม่จับเกาะกันเป็นก้อนแข็ง เปียกน้ำง่ายกว่าแบบผง ไม่พังกระจาย สะดวกต่อการใช้งาน นอกจากนี้ขั้นตอนผลิตไม่ยุ่งยาก และต้นทุนในการผลิตต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์รูปแบบอื่นๆ (Shanmugam, 2015)

การควบคุมโรครากขาวให้มีประสิทธิภาพสูงนั้น การพัฒนาชีวภัณฑ์ให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสม และวิธีการใช้เป็นปัจจัยที่สำคัญในการกำหนดความสำเร็จของการควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธี ด้วยเหตุนี้การศึกษาแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จึงเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำเพื่อใช้ในการเทราดลงดินสำหรับควบคุมเชื้อรา *R. microporus* ได้ทันที ในขณะที่ชีวภัณฑ์รูปแบบแกรนูลไม่ละลายน้ำสามารถใช้รองกันหลุมปลูก หรือใส่ลงในดินเพื่อให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ค่อยๆ ถูกปลดปล่อยออกมา เพื่อป้องกันและควบคุมเชื้อรา *R. microporus* เข้าทำลายได้ในระยะแรก ซึ่งรูปแบบและวิธีการใช้สามารถควบคุมโรครากขาวได้ นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืช และเพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการควบคุมโรครากขาวในอนาคต

## 2. การตรวจเอกสาร

### 2.1 ยางพารา

#### 2.1.1 ความสำคัญของยางพารา

ยางพาราเป็นพืชยืนต้น ใบเลี้ยงคู่ ให้น้ำไม้และน้ำยาง ในทางพฤกษศาสตร์จึงได้จัดอนุกรมวิธานของต้นยางพาราดังนี้

Kingdom Plantae

Kingdom Tracheobionta

Division Magnoliophyta

Class Magnoliopsida

Subclass Rosidae

Order Euphorbiales

Family Euphorbiaceae

Genus *Hevea*

Species *Hevea brasiliensis*

ยางพารามีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน มีฝนตกชุก บริเวณลุ่มแม่น้ำอเมซอน ประเทศบราซิล และเปรูในทวีปอเมริกาใต้ ซึ่งมีสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้น การนำยางพาราจากแหล่งกำเนิดมาปลูกในประเทศแถบทวีปเอเชีย เริ่มขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 1860 และประสบผลสำเร็จในปี พ.ศ. 1876 โดย Sir Henry Wickham จากการรวบรวมเมล็ดยางจำนวน 70,000 เมล็ด และได้ค้นพบพันธุ์ยาง *Hevea brasiliensis* ที่มีคุณภาพดีกว่าพันธุ์ยางชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ Sirclements Markham ได้นำพันธุ์ยางพาราบริเวณลุ่มแม่น้ำอเมซอนไปทดลองปลูกบริเวณแหลมมลายู พบว่าพันธุ์ยางที่ดีที่สุดคือพันธุ์ *Hevea brasiliensis* จึงเป็นที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายในแหลมมลายู ส่วนประเทศไทยในปี พ.ศ. 2442 พระยารัษฎานุประดิษฐ์มหิศรภักดี ซึ่งเป็น "บิดาแห่งยาง" ได้นำพันธุ์ยางพารา *Hevea brasiliensis* มาปลูกเป็นครั้งแรกที่อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง ต่อมาได้มีการขยายพื้นที่ปลูกยางไปใน 14 จังหวัดภาคใต้ และในปี พ.ศ. 2451 หลวงราชไมตรีได้นำยางพาราไปปลูกที่จังหวัดจันทบุรี และได้มีการขยายพื้นที่ปลูกอย่างต่อเนื่องใน 3 จังหวัดของภาคตะวันออก คือ จันทบุรี ระยอง และตราด จนถึงปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางทั้งประเทศประมาณ 12 ล้านไร่ กระจายกันอยู่ในภาคใต้ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งเป็นแหล่งปลูกยางใหม่ ทำให้ประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตและส่งออกยางพาราลำดับต้นๆ ของโลก

## 2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

**2.1.2.1 ราก (root)** ยางพารามีระบบราก 2 ชนิด คือ รากแก้ว (primary root) ที่มีขนาดใหญ่ สามารถหยั่งลึกลงดินได้ไกลประมาณ 1.5-2.5 เมตร ทำหน้าที่พุงลำต้นไม่ให้โคนล้ม ส่วนรากแขนง (secondary root หรือ lateral root) แตกออกจากรากแก้วทางด้านข้างรอบทรงพุ่ม เมื่อต้นยางมีอายุ 1-3 ปี สามารถแผ่กระจายไปได้ไกล 7-10 เมตร ที่ระดับความลึก 0-10 เซนติเมตร ทำหน้าที่ช่วยยึดลำต้นและหาอาหาร เพื่อไปเลี้ยงส่วนต่างๆ เนื้อผิวดิน (ศักดิ์อนันต์, 2553)

**2.1.2.2 ลำต้น (stem)** ยางพาราเป็นไม้เนื้ออ่อน ถ้าปลุกจากเมล็ดลักษณะต้นยางเป็นรูปกรวย (cone) โดยโคนเหนือพื้นดินมีขนาดโตกว่าแล้วค่อยๆ เรียวไปสู่ส่วนปลาย แต่ถ้าปลุกโดยใช้ต้นติดตา การเจริญมีลักษณะเป็นทรงกระบอก ความสูง 30-40 เมตร ส่วนในระยะต้นอ่อนของยางพาราเจริญเร็วมาก ทำให้เกิดช่วงปล้องยาว เมื่ออายุน้อยเปลือกลำต้นสีเขียว แต่เมื่ออายุมากขึ้นสีของเปลือกเปลี่ยนเป็นสีเทาอ่อน เทาดำ หรือน้ำตาล

**2.1.2.3 ใบ (leaf)** ลักษณะการเกิดของใบเวียนเป็นเกลี๋ยรอบต้น เป็นชั้นหรือฉัตร ใบ (leaf storey) จัดเป็นใบประกอบ (compound leaf) แบบ palmate ที่มีก้านยาว แต่ละก้านมีใบย่อย 3 ใบ (บางพันธุ์อาจมีถึง 5 ใบ) แต่ละใบยาวประมาณ 10-20 เซนติเมตร ซึ่งใบถือเป็นส่วนสำคัญในการสังเคราะห์แสงของพืช และกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์

**2.1.2.4 ดอก (flower)** ดอกยางพาราเกิดจากตาตรงซอกใบยาง (axillary bud) มีลักษณะเป็นช่อสั้นๆ ตรฐานของกลุ่มใบใหม่ ลักษณะช่อดอกเป็นแบบ compound raceme หรือ panicle ในช่อดอกหนึ่งๆ ประกอบด้วยแกนใหญ่ของช่อเรียกว่า main axis แล้วมีการแตกแขนงของช่อดอกเป็นแขนงย่อยอีกมากมาย ซึ่งต้นยางออกดอกเมื่อมีอายุประมาณ 5-6 ปีๆ ละ 2 ครั้ง ลักษณะดอกมีขนาดเล็กสีเหลือง โดยดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่บนช่อเดียวกัน

**2.1.2.5 ผลและเมล็ด (fruit and Seed)** ผลมีลักษณะเป็นพู่ 3 พู่ เมื่อโตเต็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4.5-5.0 เซนติเมตร (ศักดิ์อนันต์, 2553) ยาวประมาณ 4.5 เซนติเมตร แต่ละผลมีเมล็ด 3-5 เมล็ด เมล็ดเป็นแบบ capsule เมื่อแก่เมล็ดมีสีน้ำตาลคล้ายเมล็ดละหุ่ง ขนาดยาวประมาณ 2.0-3.5 เซนติเมตร กว้าง 1.5-3 เซนติเมตร น้ำหนักของเมล็ดโดยเฉลี่ย 2-4 กรัม ต่อเมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) แข็ง มีลาย เมล็ดมีทั้งส่วนของเอนโดสเปิร์มและใบเลี้ยง โดยในใบเลี้ยงมีโปรตีนประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำมันสูงถึง 40 เปอร์เซ็นต์

## 2.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของยางพารา

การเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของต้นยางพารานั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ การเลือกใช้พันธุ์ยางที่ดี ลักษณะของดิน สภาพพื้นที่ สภาพภูมิอากาศ การใช้ปุ๋ย และการจัดการสวนยางพารา โดยแต่ละปัจจัยมีความสำคัญดังนี้

**2.1.3.1 พันธุ์ยางพารา** การเลือกใช้พันธุ์ยางที่ดี ต้องเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุดทั้งปริมาณของน้ำยางและเนื้อไม้ มีความต้านทานต่อโรคระบาดในท้องถิ่น ต้นยางสามารถต้านทานแรงลมได้ดี พันธุ์ยางต้องเหมาะสมกับสภาพความอุดมสมบูรณ์ของดิน ความลึกของหน้าดิน และสภาพความลาดชันของพื้นที่ โดยพันธุ์ยางที่แนะนำในพื้นที่ปลูกยางเดิม เช่น พันธุ์ยางที่ให้น้ำยางสูง ได้แก่ RRIM 600 และ RRIT 251 พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตเนื้อไม้สูง ได้แก่ BPM และ ฉะเชิงเทรา 50 พันธุ์ยาง

เพื่อผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้สูง เช่น PB 255, PB 260 และ PB 235 ซึ่งพันธุ์ยาง RRIM 600 และ RRIT 251 เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกมากกว่าร้อยละ 80 เนื่องจากสามารถปลูกได้ในพื้นที่ทั่วไปสามารถปรับตัวและให้ผลผลิตได้ดีในเกือบทุกพื้นที่ แสดงอาการเปลือกยางแห้งน้อย และทนทานต่อการกรีดได้ดีมากกว่าพันธุ์อื่นๆ (Saelim *et al.*, 2015)

**2.1.3.2 ลักษณะของดิน** ดินที่เหมาะสมสำหรับการปลูกยางพาราควรมีหน้าดินลึกไม่น้อยกว่า 1 เมตร โดยไม่มีชั้นของหินดินดานหรือหินแข็ง และกรวดอัดแน่น ที่ไปขัดขวางการเจริญเติบโตของรากยางพารา พื้นที่ปลูกยางต้องไม่มีน้ำขัง การระบายน้ำและอากาศดี ระดับน้ำใต้ดินควรลึกกว่า 1 เมตร และลักษณะเนื้อดินควรมีความร่วนเหนียวพอเหมาะ หรือเป็นดินร่วน ดินร่วนเหนียว หรือร่วนปนทราย โดยต้องมีอนุภาคดินเหนียวอย่างน้อยประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ดินชั้นธาตุอาหารได้ดี เพื่อให้ดินสามารถเก็บความชื้น และมีอนุภาคดินทรายประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ดินมีการระบายอากาศดี ดินที่มีเนื้อดินเหมาะสมต่อการปลูกยาง ได้แก่ ชุดดินภูเก็ตเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย ชุดดินคองส์ เป็นดินร่วนปนทราย และชุดดินอ่าวลึก เนื้อดินเป็นดินเหนียว เป็นต้น ส่วนดินทรายไม่เหมาะสมต่อการปลูกยางพารา เนื่องจากอนุภาคของดินทราย ดินชั้นน้ำและธาตุอาหารได้น้อย ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ขาดความชื้นในฤดูแล้ง และดินควรมีธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรองเพียงพอและเหมาะสม ความเป็นกรดเป็นด่างควรอยู่ในช่วง 4.5-5.5

**2.1.3.3 สภาพพื้นที่ปลูกยางพารา** พื้นที่ที่เหมาะสมสำหรับการปลูกยางพาราควรสูงจากระดับน้ำทะเลไม่เกิน 200 เมตร ยางพาราจึงเจริญเติบโตเป็นปกติ คือ สามารถกรีดยางได้เมื่ออายุประมาณ 6 ปี เมื่อความสูงเพิ่มขึ้นทุกๆ 100 เมตร ทำให้ต้นยางเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ แต่ในปัจจุบันพบว่าสามารถปลูกยางได้ที่ความสูงจากระดับน้ำทะเลไม่เกิน 600 เมตร และควรเป็นพื้นที่ราบหรือมีความลาดเทเล็กน้อยไม่ควรเกิน 35 องศา

**2.1.3.4 สภาพภูมิอากาศ** การปลูกยางในอดีตได้ถูกกำหนดให้ปลูกในแถบเส้นศูนย์สูตรระหว่าง 10 องศาเหนือและ 10 องศาใต้ เพราะเป็นพื้นที่ที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการปลูกยางพารามากที่สุด คือ มีปริมาณน้ำฝน 2,000-4,000 มิลลิเมตร ต่อปี มีวันฝนตกไม่น้อยกว่า 100 วันต่อปี ส่วนแหล่งปลูกยางพาราของประเทศไทยทางภาคใต้ และภาคตะวันออก ส่วนใหญ่มีปริมาณน้ำฝนมากกว่า 1,400 มิลลิเมตร ต่อปี เนื่องจากสภาพภูมิประเทศได้รับมรสุมจากทะเลอ่าวไทยทางด้านทิศตะวันออก และทะเลอันดามันทางด้านทิศตะวันตก ทำให้ฝนตกหนัก มีปริมาณน้ำฝนและการกระจายของฝนสูง มีช่วงแล้งหรือช่วงที่ดินแห้งเป็นเวลาดสั้น จึงเป็นเขตที่มีสภาพภูมิอากาศและสิ่งแวดล้อมเหมาะสมสำหรับปลูกยางพารา อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการปลูกยางพารา อยู่ระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส ส่วนแหล่งปลูกยางพาราที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส มีผลให้การเจริญของต้นยางหยุดชะงัก ดังนั้นการปลูกยางบนพื้นที่สูงมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นยางพาราเนื่องจากที่ระดับความสูงเพิ่มขึ้นทุกๆ 100 เมตร ทำให้อุณหภูมิลดลง 0.5 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่ออัตราการสังเคราะห์แสงอยู่ที่ 28 องศาเซลเซียส (Kositsup *et al.*, 2009) อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และสูงเกิน 40 องศาเซลเซียส ไม่เหมาะสมต่อการปลูกยางพารา (นิวัตร และเบญจรงค์ 2549) เมื่ออุณหภูมิเฉลี่ยสูงเกินกว่า 28 องศาเซลเซียส ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของยางพารามีแนวโน้มลดลง (สุภัทร์ และคณะ, 2550) ส่วนความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสม

ต่อการเจริญเติบโตของยางพาราอยู่ระหว่าง 65-90 เปอร์เซ็นต์ และการที่ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำเป็นเวลานานทำให้ต้นยางพาราปลูกใหม่มีอัตราการตายสูง (นิวัตร์ และเบญจรงค์ 2549)

**2.1.3.5 การใช้ปุ๋ยและการจัดการสวนยางพารา** ปุ๋ยเป็นปัจจัยที่จำเป็นอย่างหนึ่งที่จะช่วยรักษาสสมดุลของธาตุอาหารในดิน ส่งเสริมการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิตของยางพารา ในการทำสวนยางพาราต้องมีการใช้ปุ๋ยให้แก่ต้นยางพาราอย่างมีประสิทธิภาพ ในสัดส่วนของธาตุอาหารที่ยางพาราต้องการ เพื่อชดเชยปริมาณธาตุอาหารที่สูญเสียไปกับผลผลิต เพราะในน้ำยาง 1 ตัน ดินสูญเสียธาตุไนโตรเจน 20 กิโลกรัม ฟอสฟอรัส 5 กิโลกรัม และโพแทสเซียม 25 กิโลกรัม (หทัยกานต์, 2557) เกษตรกรส่วนใหญ่มีการใช้ปุ๋ยในสวนยางพาราโดยไม่ได้นำมาคำนึงถึงความต้องการของยางพารา อาจทำให้ยางพาราได้รับธาตุอาหารไม่เพียงพอ เนื่องจากต้นยางพาราต้องการปริมาณธาตุอาหารในปริมาณที่แตกต่างกันตามอายุของต้นยาง ปัจจุบันจึงมีการแนะนำให้ใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยเฉพาะการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินเปรียบเทียบกับการใช้ปุ๋ยสูตร 20-8-20 ในแปลงยางพารา พันธุ์ RRIM 600 ก่อนเปิดกรีต ในชุดดินคลองท่อม ชุดดินรือเสาะ และชุดดินท่าแซะ ที่มีธาตุอาหารหลักในดินอยู่ในระดับต่ำ แปลงที่ใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินต้องใช้ไนโตรเจนทั้งหมด (N) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ( $P_2O_5$ ) และโพแทสเซียมที่ละลายน้ำ ( $K_2O$ ) ต่อต้นสูงกว่าวิธีการใช้ปุ๋ยสูตร 20-8-20 เท่ากับ 2.0, 1.6 และ 1.5 เท่า ตามลำดับ และธาตุอาหารในดินส่วนใหญ่สูงกว่าก่อนทดลองเล็กน้อย แต่ยังต่ำกว่าระดับที่เพียงพอต่อความต้องการของยางพารา และการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน ช่วยให้คาร์โบไฮเดรตในใบสูง ปริมาณของคลอโรฟิลล์ มีเส้นรอบวงที่ ความสูง 150 เซนติเมตร จากพื้นดิน น้ำหนักของไม้ยาง ความหนาของเปลือกสูงกว่าการใช้ปุ๋ยสูตร 20-8-20 ทำให้ยางพาราสามารถเปิดกรีตได้เร็วกว่าประมาณ 3-5 เดือน (สิทธิชัย, 2556) นอกจากนี้การจัดการดินและน้ำให้เหมาะสมถือเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ยางพาราเจริญเติบโตดี

## 2.2 โรครากขาว

โรครากขาวของยางพาราเกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem [Syn : *Rigidoporus lignosus* (Klozsch) Imazeki] สามารถจัดจำแนกอนุกรมวิธาน (Kirk et al., 2008) ดังนี้

Kingdom Fungi

Phylum Basidiomycota

Class Agaricomycetes

Subclass Agaricomycetidae

Order Polyporales

Family Meripilaceae

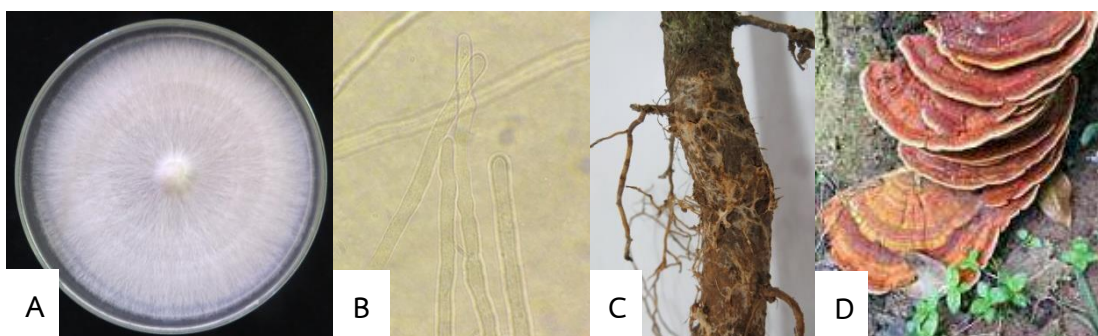
Genus *Rigidoporus*

Species *Rigidoporus microporus*



### 2.2.1 ลักษณะอาการของโรครากขาว

โรครากขาวเกิดจากเชื้อสาเหตุ *R. microporus* เป็นประเภทเห็ดรา เข้าทำลายต้นยางพารา สร้างเส้นใยสีขาวมีความหนา 1-2 มิลลิเมตร (สายทอง, 2556) ลักษณะผิวเรียบปลายแบน เจริญเข้าทำลายบริเวณเปลือกกราก และแผ่ปกคลุมเกาะติดกับผิวรากจับกันแน่นเป็นร่างแห โดยเส้นใยของเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และเจริญได้หลายเมตรในดิน เมื่อเส้นใยอายุมากขึ้นมีลักษณะหนุกกลม และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลแห้งซีด ระยะแรกของการเข้าทำลายเนื้อไม้ บริเวณรากที่เป็นโรครามีความแข็งแรงต่าง มีสีน้ำตาลซีด หลังจากนั้นในระยะรุนแรงรากเปลี่ยนเป็นสีครีมขุ่นและเบา ถ้าอยู่ในพื้นที่ชื้นแฉะจะอ่อนนิ่ม (สุจินต์, 2553) ส่วนใบยางพาราเปลี่ยนเป็นสีเหลืองผิดปกติที่กิ่งใดกิ่งหนึ่งในระยะแรก และแสดงอาการใบเหลืองทั้งต้นในระยะรุนแรงใช้เวลาประมาณ 8-9 เดือน (จรัสศรี และคณะ, 2556) ขณะที่ยางพาราต้นเล็กลักษณะใบเหี่ยวเฉา ขอบใบม้วนงอลงด้านล่าง ใบร่วง การเจริญเติบโตของยางพาราหยุดชะงัก (สุภาภรณ์ และมารีนา, 2557) ส่วนใบใหม่ของต้นยางพาราที่เป็นโรครากขาวหลังจากการผลัดใบในแต่ละรุ่น ใบมีขนาดเล็ก และทรงพุ่มเล็กลง (อยุทธิ์ และเสมอใจ, 2554) เมื่อพืชแสดงอาการโรคระยะหนึ่งก่อนหรือหลังพืชตาย จึงสังเกตเห็นดอกเห็ดขึ้นบริเวณโคนต้นยางพาราหรือส่วนรากที่โผล่พ้นดิน ดอกเห็ดมีลักษณะแบนกว้าง อาจกว้างถึง 20 เซนติเมตร (สายทอง, 2556) เห็นเป็นแผ่นครึ่งวงกลม ไม่มีก้านดอกแผ่นเดียวหรือซ้อนกันเป็นชั้นๆ ดอกเห็ดที่ยังอ่อนอยู่มีผิวด้านบนมีสีเหลืองแกมส้มบนน้ำตาล โดยมีสีเข้มอ่อนเรียงสลับกันเป็นวง ผิวเรียบจับดูรู้สึกลื่นมือ เมื่อดอกเห็ดแก่มีลักษณะกระด้าง สีน้ำตาลแดงหรือน้ำตาลเหลืองสลับกัน ขอบดอกขาว แต่สีจางลง และเหี่ยว ผิวด้านล่างมีสีส้มแดงหรือน้ำตาลสด (อยุทธิ์ และเสมอใจ, 2554) มีรูขนาดเล็กไว้สำหรับผลิตสปอร์ ประมาณ 6-9 รู ต่อมิลลิเมตร โดยสปอร์มีรูปร่างกึ่งกลมจนถึงกลม (sub-globose to globose) ผิวเรียบ ขนาด 3.5-4.5 x 3.5-4 ไมโครเมตร เส้นใยเป็นแบบ monomitic ผนังบางมีเส้นกั้น (septa) (สายทอง, 2556) ซึ่งเมื่อสปอร์ปลิวไปตกในที่ที่เหมาะสมก็เจริญเติบโตเป็นเส้นใยและสร้างดอกเห็ดใหม่ได้



ภาพที่ 1 ลักษณะของโรครากขาว (A) เส้นใยเชื้อรา *R. microporus* (B) เส้นใยที่ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดากำลังขยาย 100 เท่า (C) การเข้าทำลายระบบราก (D) การสร้างดอกเห็ดบริเวณโคนต้นยางพารา

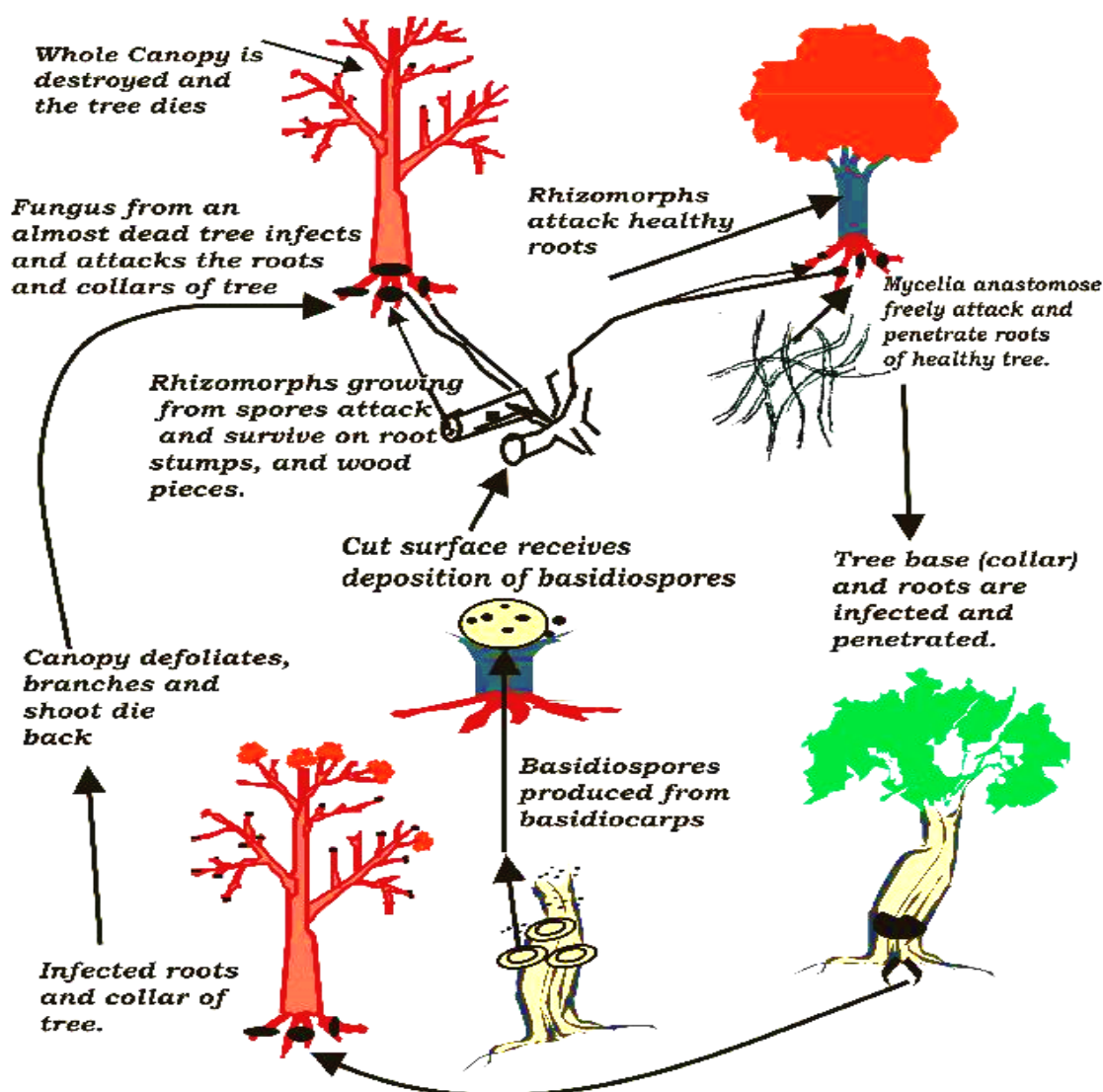
## 2.2.2 การแพร่ระบาดและการเข้าทำลายของโรครากขาว

เชื้อรา *R. microporus* สามารถเข้าทำลายระบบรากของยางพาราได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ซึ่งการเข้าทำลายเริ่มจากการเจาะ การแพร่กระจาย และการย่อยสลาย โดยมีกลไกการสร้างเส้นใยสองประเภทที่มีความแตกต่างกันทางรูปร่าง และเมตาบอลิซึม (metabolism) รวมถึงการผลิตน้ำย่อย เส้นใยชนิดแรก คือ ไรโซมอร์ฟ (rhizomorph) ทำหน้าที่แพร่กระจายโรค เจริญอยู่บนผิวรากภายนอก เมื่อไม่มีอาหารจากภายนอก เชื้อราเข้าทำลายเซลล์รากพืช โดยไรโซมอร์ฟเปลี่ยนรูปร่างเป็นเส้นใยที่มีผนังเซลล์บางขึ้นเพื่อการเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช (infectious hyphae) อีกชนิดหนึ่งคือการสร้างเส้นใยเข้าทำลาย และแทงเส้นใยเข้าไปในเนื้อเยื่อเพื่อเข้าไปเจริญอยู่ที่ cork cell และแพร่กระจายสู่เซลล์อื่น โดยการแทงผ่านทางช่องว่าง และท่อต่างๆ ของเซลล์ จึงสามารถพบเส้นใยเชื้อราได้ทั้งระหว่างเซลล์ ในเซลล์ และในผนังเซลล์ ทำให้การทำงานของเซลล์รากเสียหาย ปริมาณน้ำภายในต้นยางลดลง (ปวีณา และคณะ, 2555) นอกจากนี้เชื้อรา *R. microporus* ยังสามารถผลิตเอนไซม์ที่สำคัญคือ glycosidase (glucosidase, galactosidase และ galactosidase), polysaccharidases (xylanase, pectinase, CM-cellulase) และ phenol oxidase (laccase และ peroxidase) (สายทอง, 2556) เพื่อย่อย cellulose, hemicelluloses และ lignin ของเนื้อไม้ยางพาราในเนื้อเยื่อที่เป็นโรคพบเอนไซม์ laccase ปริมาณมาก (Nandris *et al.*, 1987) ซึ่งเมื่อเซลล์ของเนื้อไม้ถูกทำลาย ส่งผลให้ต้นยางพาราดูดน้ำและธาตุอาหารในดินไม่เต็มที่ การสังเคราะห์แสงจึงค่อยๆ ลดลงทำให้ยางยืนต้นตาย

โรครากขาวเกิดรุนแรงในพื้นที่ที่มีการปลูกยางชำที่เดิมมากกว่าพื้นที่บุกเบิกใหม่ ในแปลงที่ปลูกครั้งแรกมักพบโรครากขาวในต้นยางที่มีอายุ 15 ปี ขึ้นไป ส่วนในต้นยางที่ปลูกเป็นรอบที่ 2 หรือ 3 และไม่ได้กำจัดต่อเก่า มักพบในต้นยางพาราอายุ 1 ถึง 5 ปี แล้วแต่การสะสมของเชื้อราในดินของแปลงยางพารานั้นๆ (อยุทธิ์ และเสมอใจ, 2554) นอกจากนี้ความรุนแรงของโรคยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น ในดินทรายหรือดินร่วนทราย pH ของดินที่ 5-7 ปริมาณน้ำฝนมากกว่า 4,000 มิลลิเมตร ต่อปี เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการแพร่ระบาดของโรครากขาวมากที่สุด (อารมณ และคณะ, 2552) และการแพร่ระบาดของโรคเกิดขึ้นได้ 2 ทาง คือ

**2.2.2.1 การสัมผัสระหว่างรากที่เป็นโรครากขาวกับรากปกติ** โรครากขาวเกิดจากรากยางพาราต้นหนึ่ง ซึ่งเป็น secondary inoculums แพร่กระจายเชื้อไปยังรากของยางพาราที่เป็นต้นปกติ และการแพร่กระจายเกิดขึ้นภายในแถวเดียวกันมากกว่าระหว่างแถว เนื่องจากมีระยะปลูก 3 x 6 เมตร และยังสามารถแพร่กระจายจากรากไปยังชิ้นส่วนของต้นยางพาราส่วนเหนือดิน (สายทอง, 2556) โดยเชื้อสาเหตุผลิต fruiting bodies หรือดอกเห็ดที่โคนของต้นที่ตาย และผลิตสปอร์เข้าทำลายต้นยางพารา

**2.2.2.2 สปอร์ของเชื้อราปลิวไปตามลม** แล้วไปตกลงบนแผลของตอยางใหม่ เมื่อมีความชื้นเพียงพอ เชื้อเจริญไปยังระบบราก จึงกลายเป็นแหล่งเพาะเชื้อโรคแหล่งใหม่ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วงจรการเกิดโรครากขาวของยางพารา  
ที่มา : Omorusi (2012)

### 2.2.3 การป้องกันกำจัดโรครากขาวโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) มาใช้สำหรับการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืช (pathogens microorganism) ซึ่งจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อาจเป็นเชื้อราหรือแบคทีเรีย รวมถึงการใช้สารที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผลิตขึ้นในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค ในการป้องกันกำจัดโรครากขาวของยางพารา ได้มีการศึกษากันอย่างต่อเนื่อง เช่น การใช้เชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้เท่ากับ 88.61 เปอร์เซ็นต์ และในโรงเรือนทดลองยังได้ผลดีเช่นเดียวกัน (ปวีณา และคณะ, 2555) ขณะเดียวกันการใช้ *S. griseus* ผสมร่วมกับ ปุ๋ยอินทรีย์ และมูลวัว สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* เมื่อเปรียบเทียบกับสารฆ่าเชื้อรา (วคินี และปฎิมาพร, 2559) นอกจากนี้ *Streptomyces* sp. S10 และ *Trichoderma asperellum*

สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วงระหว่าง 87-93 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในหลอดทดลองเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* เจริญเติบโต 1.85 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อปฏิปักษ์ *T. asperellum* สามารถยับยั้งการเกิดโรครากขาวในกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ดั้งเดิมได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซินในโรงเรือนทดลอง (ปวีณา และคณะ, 2555)

การใช้เชื้อปฏิปักษ์ในกลุ่ม *Chaetomium bostrychodes* และ *Chaetomium cupreum* นอกจากเจริญเติบโตเร็ว ยังเข้าครอบครองพื้นที่เป้าหมายของเชื้อรารภายใน 30 วัน และสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย hexane และ ethyl acetate จากเชื้อปฏิปักษ์ *Ch. cupreum* สามารถควบคุมเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* เท่ากับ 82.0 และ 78.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์รูปแบบผง และ emulsion ประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ *Ch. cupreum* สามารถลดการเกิดโรครากขาวของยางพาราได้ 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้การใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma hamatum* และ *Trichoderma harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Kaewchai และ Soyton, 2010) และการใช้เชื้อปฏิปักษ์ *T. asperellum* และ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท BMU07, BMU89 และ SBC07 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* เท่ากับ 91.25, 92.28 และ 86.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการทดสอบในกระถางโดยใช้เซลล์สดเพื่อควบคุมเชื้อรา *R. microporus* โดยที่ *Trichoderma* sp. สามารถยับยั้งการเกิดโรครากขาวได้สูงสุดเมื่อทดลองใช้ชีวภัณฑ์ *Trichoderma* sp. รูปแบบผงในกระถางประมาณ 20 กรัมต่อต้น สามารถลดการเกิดโรครากขาวได้ 23 เปอร์เซ็นต์ (สายทอง, 2556)

## 2.3 แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

### 2.3.1 ลักษณะทั่วไปและความสำคัญของ *Bacillus* spp.

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. จัดอยู่ใน Family Bacillaceae พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ อากาศ อาหาร และเศษซากพืช หลายชนิดสามารถผลิตสาร bacteriocin (ผาสุก, 2548) มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อนทรงกระบอก (rod-shaped) อาจเป็นท่อนเดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย มีขนาด 0.5-2.5 x 1.2-10 ไมโครเมตร หรือ 0.3-2.2 x 0.7-1.2 ไมโครเมตร (ดวงพร, 2537) ไม่สร้างเส้นใย ติดสีแกรมบวก (gram-positive) เมื่ออายุน้อย แต่เมื่ออายุมากขึ้นเชื้อติดสีแกรมลบ (gram-negative) สร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ (endospore forming) 1 เซลล์ ต่อ 1 เอนโดสปอร์ ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ทนร้อน สารเคมี และรังสียูวี เจริญเติบโตเร็วภายใน 24-48 ชั่วโมง และเจริญได้ในอาหารหลายชนิด การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารแข็ง โคโลนี มักมีรูปร่างกลม ผิวด้านหน้าทึบแสง มีสีครีมถึงสีน้ำตาล การเลี้ยงในอาหารเหลวทำให้อาหารมีสีคล้ำขึ้น (วานิด, 2552) เติบโตดีที่พีเอชเป็นกลางหรือกรดเล็กน้อย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต จะอยู่ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* และ *B. acidocaldarius* เจริญได้ในที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอมไซม์โปรตีเอส (protease), อะไมเลส (amylase), ลิเปส (lipase) (พรพรรณ, 2550) บางชนิดต้องการออกซิเจนในการหายใจ บางชนิดสามารถเจริญได้ในที่ไม

มีออกซิเจน (facultative anaerobe) การเคลื่อนที่อาศัยการใช้แฟลกเจลลาแบบรอบตัว (lateral flagella)

### 2.3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Bacillus* spp.

*Bacillus* spp. มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยา ซึ่งในสภาพแวดล้อมเดียวกันลักษณะโคโลนีสามารถใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อได้ แต่เมื่อมีความแปรปรวนด้านสภาพแวดล้อม คุณภาพ และอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นปัจจัยกำหนดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง และการเกิดสีของโคโลนี เช่น แบคทีเรีย *B. megaterium* ให้โคโลนีสีเหลือง *B. licheniformis* ให้โคโลนีสีแดงถึงน้ำตาล *B. sphaericus* ให้โคโลนีสีชมพู *B. subtilis* ให้โคโลนีสีชมพู เหลือง ส้ม หรือน้ำตาล *B. pumilus* ให้โคโลนีสีเหลืองอ่อน และ *B. firmus* ให้โคโลนีสีชมพู เมื่อเจริญเติบโตในอาหาร casein agar ส่วนในอาหาร tyrosine agar เชื้อ *B. megaterium* และ *B. subtilis* var. *niger* ให้โคโลนีสีดำ และในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต *B. subtilis* var. *aterrimus* ให้โคโลนีสีน้ำตาลถึงดำ จึงเป็นไปได้ยากสำหรับการแยกเชื้อด้วยลักษณะโคโลนี (Rosovitz et al., 1998) นอกจากนี้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* สร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์เมื่ออาหารมีจำกัด จึงทนทานในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ บางเซลล์อาจมีแวกิวโอล บางชนิดอาจพบผลึกโปรตีน โดยรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอนโดสปอร์ และตำแหน่งการสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถจำแนก ได้เป็น 3 กลุ่ม (สุรงค์, 2538) คือ

กลุ่มที่ 1 เซลล์ไม่โป่งพอง ลักษณะเซลล์ขนาดใหญ่ กว้างมากกว่า 1 ไมโครเมตร ภายใน protoplasm ไม่ติดสีแกรม เอนโดสปอร์เป็นรูปวงรีหรือรูปทรงกระบอก ตำแหน่งของเอนโดสปอร์อยู่ตรงกลาง หรือค่อนข้างไปทางปลายเซลล์ ได้แก่ *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. cereus* var. *mycoides*, *B. thuringiensis* และ *B. anthracis* แต่แบคทีเรีย *Bacillus* บางกลุ่มมีขนาดของเซลล์กว้างน้อยกว่า 1 ไมโครเมตร เช่น *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus*, *B. licheniformis* และ *B. coagulans*

กลุ่มที่ 2 เซลล์โป่งพอง เอนโดสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ ตำแหน่งอยู่กลางหรือปลายเซลล์ ได้แก่ *B. circulans*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. laterosporus*, *B. popilliae*, *B. brevis*, *B. larvae*, *B. alvei*, *B. stearothermophilus* และ *B. lentimorbus*

กลุ่มที่ 3 เอนโดสปอร์ทำให้เซลล์มีลักษณะโป่งออกหรือไม่โป่ง เอนโดสปอร์รูปร่างกลม ตำแหน่งอยู่ปลายหรือค่อนข้างไปทางปลายเซลล์ เป็นลักษณะของ *B. sphaericus*

### 2.3.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* spp.

*Bacillus* spp. สามารถสร้างเอนไซม์ catalase ทำให้สามารถแยกความแตกต่างได้จากแบคทีเรียสกุล *Clostridium* และ *Sporolactobacillus* มีบางชนิดที่สร้างเอนไซม์ catalase ได้ น้อยหรือไม่สร้างเลย เช่น *B. lentimorbus*, *B. stearothermophilus*, *B. popilliae* และ *B. larvae* ซึ่งแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ต้องการสารอาหารและสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ต้องการอาหารธรรมดาทั่วไปที่มีส่วนประกอบไม่ซับซ้อน กลุ่มที่ 2 ต้องการอาหารที่มีส่วนประกอบซับซ้อน และกลุ่มที่ 3 ต้องการอาหารเฉพาะสำหรับการเจริญเติบโต

ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ที่มีส่วนประกอบเป็นแหล่งพลังงาน *Bacillus* spp. มีการสร้างกรดและแก๊ส เช่น ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส แบคทีเรีย *B. cereus*, *B. licheniformis* และ *B. subtilis* สามารถผลิต 2,3-butanediol และ glycerol และแบคทีเรีย *B. polymyxa* สามารถผลิต 2,3-butanediol ethanol และ hydrogen ส่วนแบคทีเรีย *B. macerans* ผลิต ethanol, acetone, acetic, formic acid และ lactic acid นอกจากนี้บางชนิดสามารถสร้าง proteolytic enzyme สำหรับย่อย casein และ gelatin

#### 2.3.4 ความสำคัญของ *Bacillus* spp. ด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยการนำแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มาใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เนื่องจาก *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพสูงในการเจริญเติบโตแม้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน สร้างเอนโดสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ และสามารถแข่งขันการใช้อาหารบนผิวใบ ดอก หรือผลของพืชได้ดี โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อพืช ซึ่งเชื้อ *Bacillus* spp. มีกลไกในการควบคุมโรคพืชได้หลายวิธี ได้แก่ การแข่งขันกับเชื้อโรคพืช ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ขัดขวางการสร้างพลังงานของเซลล์ กรดนิวคลีอิก และผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายชีวิตเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทียบเท่ากับการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น การใช้แบคทีเรีย *B. megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เพื่อลดการเกิดโรคแอนแทรกคโนสของพริกชี้ฟ้า จากการแช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าในเซลล์เชื้อปฏิปักษ์ สามารถลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคได้ 41.90 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ Rifampicin ทำให้ลดการเกิดโรคแอนแทรกคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา โรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้า โดยเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ยังคงมีชีวิตอยู่รอดบนผิวพืช และในดินรอบรากต้นพริกชี้ฟ้า (ปฏิมาพร และคณะ, 2551) เช่นเดียวกันการใช้แบคทีเรีย *B. licheniformis* BFP011 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสของพริกได้ดีที่สุด และสารสกัดหยาบของแบคทีเรีย *B. licheniformis* BFP011 ทำให้เส้นใยเชื้อรา มีลักษณะบวมพอง และลดเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราลงได้ 57.8 และ 71.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ปัทมวรรณ และพิศาล, 2556)

บาซิลลัสใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคลูกอื่น ๆ เช่น แบคทีเรีย *Bacillus* spp. B2-5 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium incarnatum* สาเหตุโรครากเน่าในโสม และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ช่วยยับยั้งการสร้างเอนไซม์เพคตินเนสที่เกี่ยวข้องกับการเน่าของราก ทำให้การเน่าเสียของรากโสมลดลง (Song et al., 2014) ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. cereus* และ *B. amyloliquefaciens* สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. solani* โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ โดยแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. solani* 95.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *B. cereus* สามารถควบคุมโรคได้ 81.2 เปอร์เซ็นต์ และยังช่วยส่งเสริมให้ความยาวของยอดและรากของต้นมะเขือเทศเพิ่มขึ้น (Ajilogba et al., 2013) ขณะที่ *B. subtilis* ควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* และ *Rosellinia necatrix* สาเหตุโรคมะเขือเทศและอาโวคาโด โดยการสร้างเอนไซม์ glucanase หรือ proteases เป็นสารในกลุ่ม lipopeptides surfactin, fengycin หรือ iturin พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท PCL1608

และ PCL1612 สามารถผลิตเอมไซม์ iturin ในการควบคุมโรคพืช และสามารถเข้าครอบครองพื้นที่ได้ดีที่สุด (Cazorla *et al.*, 2007) เช่นเดียวกัน *B. subtilis* ลดการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* และ *F. graminearum* โรครากเน่าของถั่วเหลืองได้ 17-48 และ 10-32 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการงอกของสปอร์ *F. oxysporum* และ *F. graminearum* ได้ 20-48 และ 14-32 เปอร์เซ็นต์ ยังช่วยลดความรุนแรงของโรครากเน่าได้ 63 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการงอกของรากเพิ่มขึ้น 17 เปอร์เซ็นต์ ความสูงของต้น และน้ำหนักแห้งของรากเพิ่มขึ้น 18 เปอร์เซ็นต์ และ 19 เปอร์เซ็นต์ (Zhang *et al.*, 2009)

### 2.3.5 ชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. กับการควบคุมโรคพืช

มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนา *Bacillus* spp. ในรูปแบบของชีวภัณฑ์ที่หลากหลาย เช่น รูปแบบน้ำ รูปแบบผง รูปแบบแกรนูล และรูปแบบเม็ด เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความสะดวกต่อการนำไปใช้ สามารถควบคุมโรคพืชทางการเกษตรได้ดีแบบชีววิธี ลดปัญหาการใช้สารเคมี เช่น การควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวจากเชื้อราสาเหตุ *Rhizoctonia solani* โดยใช้ชีวภัณฑ์ *B. megaterium* แบบเม็ดชนิดพ่น และชนิดหว่านในนาข้าว ที่มีส่วนประกอบของ carboxymethyl cellulose sodium (SCMC) 13.59 เปอร์เซ็นต์, sodium starch glycolate 3.7 เปอร์เซ็นต์, lactose 78.7 เปอร์เซ็นต์, talc 2.8 เปอร์เซ็นต์, magnesium stearate 0.9 เปอร์เซ็นต์ และเอนโดสปอร์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ความเข้มข้น  $3.48 \times 10^{14}$  โคโลนี ต่อมิลลิลิตร สำหรับแบบเม็ดชนิดพ่น และการใช้ชีวภัณฑ์ชนิดหว่าน จากส่วนประกอบของ alginate 2 เปอร์เซ็นต์ lactose 49 เปอร์เซ็นต์ และเอนโดสปอร์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ความเข้มข้น  $3.75 \times 10^{14}$  โคโลนี ต่อมิลลิลิตร ซึ่งชีวภัณฑ์ทั้ง 2 สูตร สามารถควบคุมและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุ *Rhizoctonia solani* ได้ดี เช่นเดียวกับการใช้สารฆ่าเชื้อรา iprodione (อัจฉรา และคณะ, 2550) และชีวภัณฑ์ *B. megaterium* รูปแบบผงแบบชนิดพ่น ประกอบด้วยเอนโดสปอร์แขวนลอย *B. megaterium* ปริมาณ 20 มิลลิลิตร, นมผง 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ polyvinyl pyrrolidone k-90 1.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีปริมาณแบคทีเรียในชีวภัณฑ์ คือ  $3.5 \times 10^{11}$  โคโลนี ต่อกรัม และเมื่อทดสอบการมีชีวิตรอดในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 เดือน การมีชีวิตรอดของเชื้อปฏิปักษ์ลดลงเล็กน้อย คือ  $2.2 \times 10^{10}$  โคโลนี ต่อกรัม ส่วนชีวภัณฑ์รูปสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* (98.5 เปอร์เซ็นต์) และการพ่นสารละลาย 1 วัน ก่อนปลูกเชื้อ *R. solani* หรือชนิดพ่น 1, 7 และ 15 วัน หลังจากปลูกข้าว ที่มีเชื้อรา *R. solani* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรครากเน่าของข้าวได้มากกว่าการใช้เซลล์สด แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อรา (Chumthong *et al.*, 2016) เช่นเดียวกันชีวภัณฑ์ *B. megaterium* รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ โดยสูตรประกอบด้วยเอนโดสปอร์แขวนลอยแบคทีเรีย 18 มิลลิลิตร lactose monohydrate 85 กรัม PVP K-30 5 กรัม และ sodium alginate 10 กรัม ชีวภัณฑ์มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* เท่ากับ 99.64 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อผ่านไป 7 วัน หลังจากฉีดพ่น เชื้อยังมีอยู่ประมาณ  $10^6$  โคโลนี ต่อกรัม และการพ่นชีวภัณฑ์ 3 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 1, 5 และ 10 แบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรครากเน่าของข้าวมากกว่าการใช้สารฆ่าเชื้อรา (Iprodione) (Wiwattanapataptee *et al.*, 2007)

นอกจากนี้การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* B076 รูปแบบผงแห้งที่มีส่วนประกอบของนมผงพร่องมันเนย (skim milk) ที่ได้จากการระเหิดแห้ง เพื่อให้ได้ผงแห้งของแบคทีเรียปฏิชีวนะ โดยเตรียมเป็นชีวภัณฑ์รูปแบบน้ำ ใช้ผงชีวภัณฑ์ผสมกับน้ำ อาหาร nutrient broth (NB) และสารจับใบ (poly oxyethylene alkyl aryl ether ผสม organic sulfonate sodium salt 62 เปอร์เซ็นต์) สำหรับใช้ควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae subsp. citrulli* ไอโซเลท KK9 สาเหตุโรคมลเน่าในแตงโม และแคนตาลูป ซึ่งชีวภัณฑ์สามารถควบคุมได้เท่ากับ 61 เปอร์เซ็นต์ (กุศล และพิศาล, 2556) เช่นเดียวกันชีวภัณฑ์ *B. subtilis* CPA-8 ใช้ควบคุม *Monilinia* spp. เชื้อสาเหตุโรคมลเน่าในพีช จากการใช้ชีวภัณฑ์พ่นที่ 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง สามารถควบคุมโรคมลเน่า ทำให้ผลผลิตมีอัตราการเกิดโรคลดลง 90-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูตรชีวภัณฑ์ประกอบด้วยนมพร่องมันเนย 10 เปอร์เซ็นต์,  $MgSO_4$  10 เปอร์เซ็นต์ และ lactose ปริมาณอัตราการใช้ 28-38 เปอร์เซ็นต์ สามารถยืดอายุของชีวภัณฑ์ 6 เดือน (Viviana et al., 2012) และการควบคุมโรครากเน่าในข้าวโพด จากเชื้อสาเหตุ *Fusarium verticillioides* โดยใช้ชีวภัณฑ์ *B. cereus* B25 รูปแบบผง ซึ่งการเตรียมสูตรประกอบด้วย carboxymethyl cellulose (CMC; 1 เปอร์เซ็นต์ (w/w)),  $CaCO_3$  (15 เปอร์เซ็นต์ (w/w)) และน้ำตาลกลูโคส (0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/w)) ผสมกับเอนโดสปอร์เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* B25 ชีวภัณฑ์ทำให้การมีชีวิตรอดของเอนโดสปอร์แบคทีเรียที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน ลดลงอยู่ระหว่าง  $1.0$  ถึง  $1.41 \times 10^7$  โคโลนี ต่อกรัม คิดเป็นอัตราการมีชีวิตรอดเท่ากับ 53 เปอร์เซ็นต์ และชีวภัณฑ์ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ด เนื่องจากการงอกของเมล็ดยังคงอยู่ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ (Juan et al., 2016) ขณะเดียวกันชีวภัณฑ์ *B. velezensis* BS87 และ RK1 สำหรับควบคุม *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* สาเหตุโรคเหี่ยวของสตรอเบอร์รี่ โดยการใช้ดินขาว (kaolin) 1 กิโลกรัม ปรับพีเอชให้เป็นกลางโดยใช้  $CaCO_3$  15 กรัม ต่อกิโลกรัม carboxymethyl cellulose (CMC) 10 กรัม ผสมกับเอนโดสปอร์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะความเข้มข้น  $9 \times 10^8$  โคโลนี ต่อมิลลิลิตร ซึ่งชีวภัณฑ์สามารถลดดัชนีการเกิดโรคจาก *F. oxysporum* และชีวภัณฑ์ RK1 และ BS87 สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ นอกจากนี้ยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของพีช (Nam et al., 2009)

### 2.3.6 ชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. กับความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบันได้มีความตื่นตัวในการใช้ชีวภัณฑ์จากจุลินทรีย์ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เนื่องด้วยชีวภัณฑ์มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมน้อย แต่สามารถควบคุมโรคพืชได้ดีในระดับหนึ่ง เกษตรกรจึงเลือกใช้ชีวภัณฑ์อย่างแพร่หลายในพื้นที่เกษตรกรรม ในขณะเดียวกันชีวภัณฑ์ได้ถูกผลิตขึ้นในท้องตลาดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (มณจันทร์, 2552) นอกจากนี้มีการนำจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคพืช ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ และผลิตภัณฑ์อาหารที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพ จากการทดสอบความปลอดภัยของแบคทีเรีย *B. subtilis* AP-01 และ *B. subtilis* AP-04 ในชีวภัณฑ์ชนิดผง 2 ชนิด ซึ่งใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืช โดยใช้ความเข้มข้นเชื้อเฉลี่ย  $1 \times 10^9$  โคโลนี ต่อกรัม ผสมกับอาหารในอัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นอัตราที่แนะนำให้ทาแผลบนต้นพืช ทำการทดสอบกับหนูถีบจักร โดยให้อาหารทางปากในอัตรา 10 กรัม ต่อวัน ต่อตัว โดยเฉลี่ยเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ซึ่งหนู



ที่ได้รับชีวภัณฑ์แบคทีเรียผสมอาหารทั้ง 2 ชนิด มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากหนูกุ่มที่ได้รับอาหารปกติ และจากการตรวจสอบทางพยาธิวิทยาไม่พบลักษณะรอยโรคที่อวัยวะภายใน และไม่มี การเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติใดๆ ทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ กระเพาะอาหาร และลำไส้เกิดขึ้น (มณจันท์ และอมรรรัตน์, 2539) เช่นเดียวกันชีวภัณฑ์ Biobest, Larminar และ Trisan ซึ่งผลิตจาก *B. subtilis* NSRS 89-24, MK-007, AP-01 และ *Trichoderma harzianum* AP-001 ตามลำดับ โดยทดสอบความปลอดภัยต่อไก่เนื้อ พันธุ์ Broiler อายุ 2 สัปดาห์ โดยผสมชีวภัณฑ์แต่ละชนิดลงในอาหารไก่เนื้อ จากนั้นประเมินประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (FCR และ ADG) อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์) ค่าเคมีของเลือด (AST, ALT, ALP, Albumin และ Total Protein) และเนื้อเยื่อตับ (ลักษณะโครงสร้างและน้ำหนักตับ) พบว่าชีวภัณฑ์ ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ( $P \leq 0.05$ ) ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อัตราการตาย ค่าเคมีของเลือด และเนื้อเยื่อตับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม จึงสรุปได้ว่าชีวภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดไม่เป็นพิษต่อไก่เนื้ออายุ 2 สัปดาห์ (วิภาวรรณ, 2556)

ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของไก่เนื้ออายุ 1 วัน จำนวน 200 ตัว ให้ได้รับอาหารควบคุมที่ใช้ข้าวโพด และกากถั่วเหลืองเป็นหลัก และร่วมกับการใช้ชีวภัณฑ์เสริมในอัตรา 0 และ  $1 \times 10^8$  โคโลนี ต่อกิโลกรัมอาหาร ตามลำดับเป็นเวลา 42 วัน เพื่อเก็บของเหลวจากไส้ติ่งสำหรับการตรวจนับจุลินทรีย์ มีผลให้ *B. subtilis* สามารถเจริญในระบบทางเดินอาหารของไก่เนื้อ โดยพบจำนวนเชื้อ *B. subtilis* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) ทำให้จำนวนเชื้อ *Escherichia coli* และของเหลวจากไส้ติ่งลดลง ยังช่วยให้จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเพิ่มขึ้น จากนั้นทำการศึกษาผลต่อสมรรถภาพการผลิตของไก่เนื้อโดยใช้ลูกไก่เนื้ออายุ 1 วัน จำนวน 810 ตัว ให้ได้รับอาหารควบคุม และอาหารควบคุมที่ผสมชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ความเข้มข้น  $1 \times 10^8$  โคโลนี ต่อกิโลกรัมอาหาร ปริมาณ 5 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัมอาหาร ทำการเลี้ยงไก่เป็นเวลา 42 วัน พบว่าการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อ *B. subtilis* ช่วยให้สมรรถภาพการผลิตทั้งการเจริญเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวของไก่เนื้อดีขึ้น เทียบเท่ากับการใช้สารปฏิชีวนะในระดับเร่งการเจริญเติบโต และช่วยให้การผลิตไก่เนื้อมีความปลอดภัยมากขึ้น (สุชาติ และคณะ, 2560)

## 2.4 ชีวภัณฑ์รูปแบบแกรนูล

ชีวภัณฑ์แกรนูล เป็นชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นผงขนาดใหญ่ หรือผงที่เกาะกันเป็นเม็ดเล็กๆ ซึ่งมีการกำหนดขนาดของแกรนูลไว้ประมาณ 2-4 มิลลิเมตร หรือเทียบเท่ากับแรงขนาดเบอร์ 4-12 ทำให้แกรนูลที่ตอกออกมานั้น มีน้ำหนักต่อเม็ดที่สม่ำเสมอ เท่ากันทุกเม็ด ตัวสารผสมมีปริมาณเท่ากัน และเข้ากันได้ดี ชีวภัณฑ์รูปแบบแกรนูลจึงมีข้อดีกว่ารูปแบบผง เพราะไม่จับตัว เกาะกันเป็นก้อนแข็ง เปียกน้ำง่าย มีความคงตัวดีกว่าเพราะมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอากาศน้อยกว่า และไม่ฟุ้งกระจาย สะดวกต่อการนำไปใช้ (อัจฉรา, 2536) นอกจากนี้ขั้นตอนในการผลิตไม่ยุ่งยาก และต้นทุนในการผลิตน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์รูปแบบเม็ด ปัจจุบันมีการนำชีวภัณฑ์รูปแบบแกรนูลไปใช้ควบคุมโรคพืชอย่างแพร่หลาย เช่น การใช้ชีวภัณฑ์แกรนูล จากสปอร์เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* NL2.2 สำหรับควบคุมโรครากขาวของยางพารา โดยการใช้ชีวภัณฑ์

รูปแบบแกรนูล 1 เปอร์เซ็นต์ มาเพิ่มปริมาณในมูลไก่ มูลวัว และปุ๋ยอินทรีย์ (ซีพีหมอดิน) เมื่อนับจำนวนโคโลนีต่อกรัม เป็นเวลา 15 วัน เชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 เจริญเติบโตดีในปุ๋ยอินทรีย์ และทุกกรรมวิธีมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาวในโรงเรือนกระจก (พรทิพย์, 2557) เช่นเดียวกับการใช้ชีวภัณฑ์ *Trichoderma viride* รูปแบบแกรนูล ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาจุลินทรีย์ในสูตรต่างๆ โดยสูตรชีวภัณฑ์ประกอบด้วย ยิปซัม, ทัลคัม, de-oiled castor cake, ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (vermicompost) และปุ๋ยคอก ซึ่งชีวภัณฑ์สูตรปุ๋ยคอกมีผลให้ *Trichoderma viride* มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด (220 วัน) รองลงมาคือ de-oiled castor cake (190 วัน) และปุ๋ยหมักมูลไส้เดือนดิน (180 วัน) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยิปซัมและทัลคัม การมีชีวิตรอดน้อย ลดลงเท่ากับ 80 วัน หลังจากเก็บรักษา นอกจากนี้ชีวภัณฑ์ทุกสูตรเมื่อนำไปทดสอบในสภาพไร่นามีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma viride* ได้ดี (Khan et al., 2011)

การใช้ชีวภัณฑ์อื่นๆ เช่น ชีวภัณฑ์ *B. velezensis* รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ เพื่อควบคุมโรคพืชในระบบไฮโดรโปนิคส์ ชีวภัณฑ์ประกอบด้วยเอนโดสปอร์แบคทีเรียปฏิปักษ์ lactose monohydrate และ polyvinyl pyrrolidone K-30 โดยสูตรชีวภัณฑ์ F8 ละลายน้ำได้ดี มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรชีวภัณฑ์  $10^{10}$  โคโลนี ต่อกรัม และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Aphanomyces* sp. เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามการเก็บชีวภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 เดือน ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์มีแนวโน้มลดลง (มานะ และคณะ, 2556) และชีวภัณฑ์ *B. subtilis* รูปแบบแกรนูลละลายน้ำ สำหรับควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจาก *Alternaria longipes* ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ โดยสารปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* LPDD 3-1 ที่หนึ่งฆ่าเชื้อและไม่หนึ่งฆ่าเชื้อ สามารถยับยั้งเชื้อราสูงถึง 97.6 และ 95.6 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา 91.6 และ 86.3 เปอร์เซ็นต์ จึงใช้ในการควบคุมโรคพืช เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการพ่นเพื่อควบคุมโรค (วานิด, 2552) ทำนองเดียวกันการใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. firmus* ในรูปแบบผงคลุกเมล็ดร่วมกับแกรนูลละลายน้ำ สำหรับฉีดพ่น สามารถควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งได้ดี เช่นเดียวกับการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา iprodione และส่งเสริมการเจริญของถั่วหรั่งได้ (อมรรัตน์, 2547) ขณะที่ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. megaterium* ในรูปแบบแกรนูลสำหรับหว่านหรือฉีดพ่น ซึ่งมีส่วนประกอบของ citric acid, tartaric acid และ sodium bicarbonate สามารถควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ที่เป็นสาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวในสภาพโรงเรือนทดลองได้ดี มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่รอดบนใบ และกาบใบข้าวสูง และมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสูตรชีวภัณฑ์สูงถึง  $10^9$  โคโลนี ต่อกรัม หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 12 เดือน (Wiwattanapatapee et al., 2007) การเตรียมชีวภัณฑ์ *Streptomyces* sp. รูปแบบแกรนูล สำหรับควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem สาเหตุโรครากขาวของยางพารา ซึ่งเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท S106 และ ไอโซเลท S110 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด 83.57 และ 74.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อใช้ *Streptomyces* sp. S106 ทดสอบกับดินผสมในหลอดทดลอง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ปวีณา, 2556)

## 2.5 สารประกอบสำหรับเตรียมสูตรชีวภัณฑ์

สารที่ใช้ในการผลิตสูตรสำเร็จมีด้วยกันหลายชนิด หลายรูปแบบ และหลายบทบาท บางชนิดทำหน้าที่เพิ่มปริมาณ เพื่อให้เกิดความสะดวกในการใช้ บางชนิดทำหน้าที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการผลิต ขณะที่บางชนิดทำหน้าที่ช่วยในการแตกกระจายตัว โดยทั่วไปสารไม่สามารถเก็บได้นาน ซึ่งตัวสารเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะหรือโครงสร้าง การกลายสภาพมาอยู่ในรูปของการเกาะตัวอยู่ข้างภาชนะหรือกลายเป็นของเหลว เป็นต้น

### 2.5.1 สารเพิ่มปริมาณ (dilutents) หรือสารพา (carrier)

เป็นสารที่เติมลงไปในสูตรชีวภัณฑ์ เพื่อเพิ่มขนาดหรือน้ำหนักของแกรนูล โดยสารต้องมีคุณสมบัติสามารถเข้ากันได้กับสารประกอบอื่นในสูตรชีวภัณฑ์ ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาใดๆ มีความคงตัว ไม่ดูดความชื้น มีการไหลที่ดี จึงช่วยในการกระจายเชื้อจุลินทรีย์ ราคาไม่สูง และทำให้แกรนูลมีความแข็งที่เหมาะสม มีการแตกตัวดี ได้แก่ lactose monohydrate, directly compressible, magnesium stearate, calcium carbonate, cellulose, dextrose, mannitol, sorbitol, microcrystalline cellulose, phosphate, starch, tribasic, sucrose, vermiculite clay, calcium sulphate, gum guar, glucose, honey, kaolin clay, talcum powder, corn starch, lignin, blasting sand, organic powder, botanical, cellulose, coal, filter mud, mineral soils, polyacrylamide, vegetable oils, calcium alginate, sucrose, bran, flour, filler, additives, pads และ milk เป็นต้น

โดยเฉพาะ lactose เป็นสารเพิ่มปริมาณที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากสามารถละลายน้ำได้ดี มีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลตัวอื่น และราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับสารเพิ่มปริมาณชนิดอื่น lactose เป็นน้ำตาลที่ได้จากน้ำนม ผลิตได้จากการตกผลึกของน้ำนม ซึ่งเหลือจากการทำเนยแข็ง การใช้ lactose ในสูตรสำเร็จโดยส่วนใหญ่จะช่วยให้มีการปลดปล่อยตัวสารได้เร็ว และทำให้แกรนูลแห้งง่าย ซึ่งแกรนูลที่ได้มีความชื้นระหว่าง 4-5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมากให้การแตกตัวเร็ว มีความกร่อนน้อย (มนต์ชูลี, 2534) ยังทำหน้าที่เป็นสารพา ในการกระจายเชื้อจุลินทรีย์ให้ทั่วถึงเมื่อนำสูตรสำเร็จไปใช้งาน และสารพาบางชนิดมีปริมาณลิกนินเป็นส่วนประกอบอยู่สูงและเป็นสารเพิ่มปริมาณช่วยยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิด ทั้งนี้สารเพิ่มปริมาณยังคงเป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน การใช้ซังข้าวโพด กากถั่วเหลือง และข้าวสาลี มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกันเท่ากับ 96.6, 25.4 และ 21.1 ตามลำดับ มีผลต่อการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์หลังการทำแห้ง และในการผลิตสูตรสำเร็จเชื้อ *Talaromyces flavus* เมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นสารเพิ่มปริมาณ ปริมาณจุลินทรีย์รอดชีวิตสูงกว่าการใช้กากถั่วเหลืองหรือข้าวสาลี Tjamos and Fravel (1995) การใช้ kerosene, neem-oil และ ซิลิกาเจล ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ ทำให้ปริมาณเชื้อ *Metarhizium flavoviride* เท่ากับ  $5 \times 10^{10}$  โคลนี ต่อมิลลิลิตร และปริมาณสปอร์ เท่ากับ  $4 \times 10^9$  สปอร์ ต่อมิลลิลิตร Lomer และคณะ (1993) และการใช้สาร kerosene ต่อ peanut oil อัตราส่วน 1 : 1 เติมในสูตรชีวภัณฑ์เชื้อ *Metarhizium flavoviride* ที่มีปริมาณเชื้อ  $2 \times 10^9$  โคลนี ต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Zonocerus variegatus* kpindou และคณะ (1995) นอกจากนี้สารพา diatomaceous earth ในสูตรชีวภัณฑ์เชื้อ *Colletotrichum truncatum* ที่มี

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $2 \times 10^6$  โคโลนี ต่อลิตร นำไปผ่านการทำให้แห้งโดยวิธี airdired เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 เดือน เชื้อมีปริมาณการมีชีวิตรอด 93 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ได้มีการเติมแป้ง เจลลาตินในซอสในสูตรชีวภัณฑ์ ที่ระยะเวลา 18 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง เชื้อมีปริมาณการมีชีวิตรอด 80 เปอร์เซ็นต์ (Mark *et al.*, 1996)

### 2.5.2 สารยึดเกาะ (binders)

เป็นสารที่ช่วยในการยึดเกาะส่วนผสมต่างๆ เข้าด้วยกัน โดยเพิ่มแรงเกาะกันของสารที่เป็นฝุ่นผง เพื่อให้ชีวภัณฑ์มีสมบัติทางกล เกิดการเกาะกันเป็นแกรนูล ภายใต้แรงกดทับทำให้อัดกันเป็นเม็ดได้ และทำให้ได้แกรนูลสม่ำเสมอ มีความแข็งเพียงพอ และเหมาะสมในการกดทับเพื่อขึ้นรูป โดยคุณสมบัติของสารยึดเกาะที่ดีต้องสามารถเข้ากันได้กับสารตัวอื่นในสูตรชีวภัณฑ์ ให้แรงยึดเกาะเพียงพอในการทำให้จุลินทรีย์ผ่านกระบวนการต่างๆ ในการผลิตได้ สารยึดเกาะที่ใช้มีหลายชนิด ทั้งที่เป็นพวกน้ำตาล และสารประกอบเชิงซ้อนประเภทที่ได้จากธรรมชาติ เช่น gelatin, gum, starch, acacia, sucrose, glucose และ tragacanth ส่วนสารที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น carboxymethyl cellulose, methyl cellulose, polyvinylpyrrolidone (PVP) และ povidone เป็นต้น แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบันคือ polyvinylpyrrolidone สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและแอลกอฮอล์ โดยทั่วไป การทำแกรนูลสูตรละลายน้ำ เพื่อให้ได้แกรนูลที่ดี ง่ายต่อการใช้ จึงควรใช้ PVP รูปสารละลายในแอลกอฮอล์ โดยใช้ในความเข้มข้น 3-15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแกรนูลสูตรไม่ละลายน้ำ ควรใช้ PVP รูปสารละลายในน้ำหรือแอลกอฮอล์ (มนต์ชูลี, 2534)

### 2.5.3 สารช่วยแตกกระจายตัว (disintegrants)

มีบทบาทสำคัญในการผลิตชีวภัณฑ์ เมื่อสารกลุ่มนี้เปียกน้ำ เกิดการขยายตัวและละลาย ทำให้ชีวภัณฑ์แตกตัวออก หากปราศจากสารกลุ่มนี้ทำให้ชีวภัณฑ์เกาะกลุ่ม และไม่ละลายประสิทธิภาพในการนำไปใช้ลดลง สารช่วยแตกกระจายตัว เช่น alginate, gum, starch, clays, cellulose, cross linked polymer และ cross povidone เป็นต้น

starch นิยมใช้กันมาก เนื่องจากช่วยทำให้การแตกตัวเร็วขึ้น แต่การใช้ปริมาณของ starch ในสูตรที่มากเกินไป ก่อให้เกิดปัญหาที่ตามมา คือ การเกาะตัวกันและความแข็งของแกรนูลจะลดน้อยลง

alginate เป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม hydrophilic colloid substances ช่วยในการแตกตัว มีจำหน่ายในรูปของ alginic acid หรือเกลือของ alginic acid โดยเฉพาะในรูปของเกลือ สามารถดูดซับน้ำหรือชอบน้ำมากกว่ากลุ่มของแป้ง ปริมาณการใช้ alginate ในสูตรชีวภัณฑ์ นิยมใช้ในปริมาณ 1-5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ alginic acid ส่วน sodium alginate อยู่ที่ 2.5-10 เปอร์เซ็นต์

gum เป็นสารที่ช่วยในการพองตัวในน้ำได้ดี และเป็นตัวยึดเกาะที่ดี ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ ได้แก่ agar, gum, pectin และ tragacanth เป็นต้น ปริมาณการใช้ในสูตรอยู่ในช่วง 1-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชีวภัณฑ์ (จักรพันธ์, 2538)

### 2.5.4 สารช่วยไหล (glidants)

เป็นสารสำคัญที่ใส่ลงไปในสูตรชีวภัณฑ์ เพื่อเพิ่มการไหลของสูตรชีวภัณฑ์ในรูปผงหรือเม็ด (granules) สามารถช่วยลดแรงเสียดทานระหว่างอนุภาค สารช่วยไหลใช้เพื่อให้สูตรชีวภัณฑ์มีสมบัติการไหลตัวดี ทำให้สูตรชีวภัณฑ์ที่ได้มีน้ำหนักสม่ำเสมอ ซึ่งสารที่ช่วยในการไหลต้องไม่ทำให้ความคงตัวทั้งทางด้านกายภาพ และทางเคมีของแกรนูลเปลี่ยนแปลงไป สารที่ใช้ในการช่วยไหล เช่น silicate, starch, calcium phosphate, colloidal silicon dioxide, asbestos free starch และ talc

### 2.5.5 สารป้องกันการปนเปื้อน (contaminant suppressants)

สารป้องกันการปนเปื้อน ช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น นิยมใช้สารปฏิชีวนะ เช่น การเติมสารปฏิชีวนะ penicillin G และ streptomycin ปริมาณ 0.04 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในอาหาร PDA ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Beauveria bassiana* เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรียอื่น นอกจากนี้การเติมสารปฏิชีวนะ cycloheximide ปริมาณ 75-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วยยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อราในอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียได้ ในการผลิตสูตรชีวภัณฑ์ จุลินทรีย์จะถูกทำให้อยู่ในสภาวะคงตัวหรือจะเจริญเมื่อถูกกระตุ้นโดยสารต่างๆ เช่น การผลิตชีวภัณฑ์สูตรน้ำ โดยการเติม sorbic acid และเกลือเพื่อกระตุ้นการงอกของสปอร์เชื้อรา (Inglis และคณะ, 2010)

### 2.5.7 สารป้องกันเซลล์ (protectant)

ในกระบวนการทำแห้งมีการเติมสารป้องกันเซลล์ เช่น การใช้ alpha, alpha-trehalose-borate เพื่อป้องกันปฏิกิริยาของโปรตีน และเซลล์ที่มีชีวิต เช่นการใช้ trehalose เพื่อป้องกัน *Lactobacillus acidophilus* ในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง และมีประสิทธิภาพเป็นสารป้องกันเซลล์ที่ดี นิยมใช้ในอุตสาหกรรม นอกจากนี้ borate ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่ trehalos สำหรับป้องกันเอนไซม์จากการถูกทำลาย นอกจากนี้สารป้องกันเซลล์ที่ใช้ผสมในกระบวนการทำแห้งชีวภัณฑ์มีหลายชนิด ได้แก่ โซเดียมอัลจิเนต, แลคโตส, อัลจิเนต-โคโคซาน และกรดอะซิติก-โคโคซาน สารเหล่านี้มีส่วนช่วยชีวภัณฑ์สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น นอกจากนี้ยังมีสารป้องกันเซลล์ เช่น กลูโคส, ฟรุคโตสหรือซูโครส ปริมาณที่นิยมใช้ 5 - 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมในสูตรชีวภัณฑ์ ทำให้เซลล์เพิ่มการมีชีวิตรอดจากเดิม 0.2 เป็น 30-40 เปอร์เซ็นต์ และโดยทั่วไปนิยมใช้กับเซลล์โพรคาริโอต (Takeuchi, 2000)

## 3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

3.1 เพื่อพัฒนา *Bacillus subtilis* เป็นชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา

3.2 เพื่อศึกษาผลการใช้ชีวภัณฑ์ร่วมกับการจัดการธาตุอาหาร ต่อการเจริญเติบโตของยางพารา และควบคุมโรครากขาว

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

#### 1. วัสดุและสารเคมี

- 2.1.1 เมล็ดพันธุ์ยางพารา
- 2.1.2 ฟองน้ำเพาะต้นกล้า
- 2.1.3 ถูดำพลาสติก
- 2.1.4 แป้งข้าวโพด
- 2.1.5 ดินเหนียวเบนโทไนต์ (bentonite clay)
- 2.1.6 เคโอลิน (kaolin)
- 2.1.7 ทalcum (talcum powder)
- 2.1.8 น้ำตาลแลคโตส (lactose monohydrate)
- 2.1.9 โซเดียมอัลจีเนต (sodium alginate)
- 2.1.10 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide)
- 2.1.11 คริสตัลไวโอเล็ต (crystal violet)
- 2.1.12 ซาฟรานิน (safranin)
- 2.1.13 มาลาไคต์กรีน (malachite green)
- 2.1.14 เอทานอล (ethanol: 95% (w/w)  $C_2H_5OH$ )
- 2.1.15 กรดซัลฟูริก (sulphuric acid: 98% (w/w)  $H_2SO_4$ )
- 2.1.16 กรดไนตริก (nitric acid: 65% (w/w)  $HNO_3$ )
- 2.1.17 กรดเพอร์คลอริก (perchloric: 70% (w/w)  $HClO_4$ )
- 2.1.18 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric: 37% (w/w)  $HCl$ )
- 2.1.19 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide: 30% w/w ( $H_2O_2$ ))
- 2.1.20 กรดบอริก (boric acid:  $H_3BO_3$ )
- 2.1.21 กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid:  $C_6H_8O_6$ )
- 2.1.22 แอมโมเนียมฟลูออไรด์ (ammonium fluoride:  $NH_4F$ )
- 2.1.23 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide:  $NaOH$ )
- 2.1.24 โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride:  $KCl$ )
- 2.1.25 โพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate:  $K_2Cr_2O_7$ )
- 2.1.26 เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซาไฮเดรต (ferrous ammonium sulphate hexahydrate:  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ )
- 2.1.27 แมกนีเซียมออกไซด์ (magnesium oxide:  $MgO$ )

- 2.1.28 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต (magnesium sulphate heptahydrate:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 2.1.29 แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide: 25% (w/w)  $\text{NH}_4\text{OH}$ )
- 2.1.30 แอมโมเนียมโมลิบเดต (ammonium molybdate:  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
- 2.1.31 แอมโมเนียมอะซิเตต (ammonium acetate:  $\text{NH}_4\text{OAc}$ )
- 2.1.32 แอมโมเนียมเมทาวานาเดต (ammonium metavanadate:  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ )
- 2.1.33 สทรอนเทียมคลอไรด์ (strontium chloride:  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- 2.1.34 แอมโมเนียมไนเตรต (ammonium nitrate:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )
- 2.1.35 แคลเซียมเททราไฮโดรเจนฟอสเฟตไดออร์โทฟอสเฟตโมโนไฮเดรต ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- 2.1.36 แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate:  $\text{CaCO}_3$ )
- 2.1.37 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (sodium chloride dihydrate:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 2.1.38 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride:  $\text{NaCl}$ )
- 2.1.39 ไดเอธิลีนไตรเอมีนเพนทาอะซิติกแอซิด (diethylenetriaminepentaacetic acid :  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}$ )
- 2.1.40 ไตรเอทานอลามีน (triethanolamine:  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$ )
- 2.1.41 ปุ๋ยเคมีผสมสูตร 15-15-15
- 2.1.42 ปุ๋ยเคมีผสมสูตร 20-8-20
- 2.1.43 อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)
- 2.1.44 อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA)

## 2. อุปกรณ์

- 2.2.1 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
- 2.2.2 ตะแกรงแรงแกรนูลชนิดเปียกและแห้ง (wet and dry granulator)
- 2.2.3 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
- 2.2.4 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 2.2.5 ตู้อบเครื่องแก้ว อบตัวอย่างพืช (hot air oven)
- 2.2.6 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
- 2.2.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 2.2.8 กล้องจุลทรรศน์แบบชนิดแสงธรรมดา (light microscope)
- 2.2.9 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ (stereoscopic microscope)
- 2.2.10 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM)
- 2.2.11 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- 2.2.12 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

- 2.2.13 เครื่องผสม (planetary mixer)
- 2.2.14 เครื่องย่อยตัวอย่าง (digestion block)
- 2.2.15 เครื่องเขย่าผสม (vortex mixture)
- 2.2.16 เครื่องบดตัวอย่างพืช
- 2.2.17 เครื่องกลั่นไนโตรเจน (nitrogen distillation apparatus)
- 2.2.18 เครื่องเฟลมโฟโตมิเตอร์ (flame photometer)
- 2.2.19 เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (atomic absorption spectrophotometer)
- 2.2.20 เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 และ 0.0001 กรัม
- 2.2.21 โกร่งบดดิน
- 2.2.22 เครื่องมือสำหรับเตรียมสารเคมีวิเคราะห์ดินและพืช

### 3. วิธีการทดลอง

แบคทีเรียปฏิบัักษณ์ จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาวจากเชื้อราสาเหตุ *R. microporus* (ศุภรัตน์, 2564) และเชื้อรา *R. microporus* ได้พิสูจน์การเกิดโรคเชื้อทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของดิน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติภาคใต้

#### 3.1 การตรวจสอบปฏิภักิรยาทางเคมีและการสร้างเอนโดสปอร์ของ *Bacillus*

##### 3.1.1 การตรวจสอบปฏิภักิรยาแกรม

นำแบคทีเรียปฏิบัักษณ์ทั้ง 3 ไอโซเลท เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบกับ potassium hydroxide (KOH) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 หยด บนแผ่นสไลด์ เกลี่ยเชื้อให้เข้ากับ KOH เป็นเวลา 1 นาที ยกดูขึ้นสังเกตแบคทีเรียปฏิบัักษณ์มีลักษณะเหนียวและหนืดติดดูป แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบแตกออกและปลดปล่อย chromosomal material ออกมา สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกไม่มีลักษณะดังกล่าว

##### 3.1.2 การตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์

นำแบคทีเรียปฏิบัักษณ์ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ข้อ 3.1.1 เกลี่ยบนแผ่นสไลด์ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้แห้ง และนำไปผ่านเปลวไฟเพื่อตรึงเซลล์ หยดมาลาโคลิกรีน (malachite green) ความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จนท่วมเชื้อแบคทีเรีย ลงไฟใต้แผ่นสไลด์เป็นเวลา 5 นาที ใช้เปลวไฟอ่อนๆ ระวังอย่าให้สีย้อมแห้ง และล้างออกด้วยน้ำ ซับให้แห้ง ย้อมทับด้วยซาฟรานิน (safranin) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ค่อยๆหยดลงไป และทิ้งไว้ประมาณ



30-60 วินาที ล้างผ่านน้ำแล้วซับให้แห้ง ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา เลนส์กำลังขยาย 100 เท่า สังเกตการติดสีเขียวของเอนโดสปอร์ ในขณะที่ตัวเซลล์ติดสีแดง

### 3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

นำแบคทีเรียปฏิชีวนะเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และล้างเซลล์ที่เจริญบนผิวอาหารด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสและส่วนที่ตกตะกอนออกจากกัน โดยใช้ส่วนที่ตกตะกอนเขย่ากับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้เข้ากัน และนำไปหมუნเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บส่วนที่ตกตะกอนผสมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เพื่อเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิชีวนะ แขนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำลาย vegetative cell ตรวจสอบความเข้มข้นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิชีวนะ ด้วยวิธีการ dilution drop plate บนอาหาร PDA สำหรับเชื้อรา *R. microporus* เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส)

เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละไอโซเลท ปิเปิดปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร ใส่จานเพาะเชื้อ ทดสอบด้วยการ pour plate technique กับอาหาร PDA ทิ้งไว้ให้เย็น และใช้เครื่องเจาะรู (cork borer) เบอร์ 3 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขึ้นรูที่มีเชื้อรา *R. microporus* วางตรงกลางจานเพาะเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ตามวิธีของ Morton and Stroube (1955) จากสูตร

$$\text{Percentage inhibition (\%)} = 100 \times \frac{R1 - R2}{R1}$$

เมื่อ R1 = ความยาวของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคชุดควบคุม  
R2 = ความยาวของเส้นใยเชื้อราชุดควบคุม

ทำการทดลอง 6 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย และตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยที่ผิดปกติ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 100 เท่า เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

### 3.3 การเตรียมสารประกอบสูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ

#### 3.3.1 การทดสอบสารประกอบต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus*

นำสารแต่ละชนิด เช่น สารยีสต์เกาะ สารพากลุ่มน้ำตาล สารพากลุ่มแร่ และสารพากลุ่มแป้ง ในอัตราส่วนต่างๆ มาเตรียมเป็นสารประกอบสูตรละลายน้ำ (ตารางที่ 1) และสูตรไม่ละลายน้ำ (ตารางที่ 2) จากนั้นนำสารแต่ละสูตร ผสมกับอาหาร PDA ให้มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารแต่ละชนิดใส่จานเพาะเชื้อ นำมาทดสอบด้วยการ dilution spread plate บนอาหาร PDA โดยการปิเปตแบคทีเรียที่เตรียมไว้ ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ตรวจนับจำนวนโคโลนีและวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (PDA)

ตารางที่ 1 สารประกอบสูตรละลายน้ำ

ชนิดสารประกอบ	สูตรสารประกอบ		
	1	2	3
สารยีสต์เกาะ 1 (%)	1	3	6
สารยีสต์เกาะ 2 (%)	2	4	6
สารพากลุ่มน้ำตาลที่ละลายน้ำ (%)	97	93	88

ตารางที่ 2 สารประกอบสูตรไม่ละลายน้ำ

ชนิดสารประกอบ	สูตรสารประกอบ		
	1	2	3
สารยีสต์เกาะ (%)	1	1	1
สารพากลุ่มแร่ดิน 1 (%)	14	-	10
สารพากลุ่มแร่ดิน 2 (%)	-	50	15
สารพากลุ่มแร่ดิน 3 (%)	25	-	-
สารพากลุ่มแป้ง (%)	-	19	-
สารพากลุ่มน้ำตาลที่ละลายน้ำ (%)	60	30	74

#### 3.3.2 การทดสอบสารประกอบต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

นำอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบแต่ละสูตร (3.3.1) เทใส่จานเพาะเชื้อ ที่จี้ไว้ให้เย็น และนำเชื้อรา *R. microporus* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นวุ้น 0.5 เซนติเมตร วางตรงกลางจานเพาะเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (PDA)

### 3.3.3 การทดสอบสารประกอบร่วมกับ *Bacillus* ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา

#### *R. microporus*

นำเซลล์แขวนลอยแบบคที่เรียปฏิบัติแต่ละไอโซเลท ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปเจือจาง แล้วเปิดแต่ละความเข้มข้น ( $10^{-7}$ - $10^{-9}$ ) ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร นำมา spread plate บนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบแต่ละสูตร นำขึ้นวุ้นเชื้อรา *R. microporus* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางตรงกลางจานเพาะเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ทำการทดลอง 6 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

### 3.4 การพัฒนาชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการควบคุมเชื้อรา *R. microporus*

#### 3.4.1 การเพาะเลี้ยง *Bacillus*

แบบคที่เรีย *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณค่อนข้างยุ่งยาก ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ค่อนข้างต่ำ เจริญเติบโตช้า และปนเปื้อนเชื้ออื่นได้ง่าย จึงไม่นำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณสำหรับเตรียมชีวภัณฑ์

นำแบบคที่เรียที่มีประสิทธิภาพทั้ง 2 ไอโซเลท คือ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 เลี้ยงเพิ่มปริมาณตามหัวข้อที่ 3.2 และตรวจสอบความเข้มข้นด้วยวิธีการ dilution drop plate บนอาหาร PDA ซึ่งได้ปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 เท่ากับ  $9.5 \times 10^{15}$  โคโลนี ต่อ มิลลิลิตร และ LPDD3-2 เท่ากับ  $8.3 \times 10^{15}$  โคโลนี ต่อ มิลลิลิตร เก็บเซลล์แขวนลอยไว้ในตู้เย็น เพื่อนำไปเตรียมเป็นชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ

#### 3.4.2 การเตรียมชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ

นำสูตรชีวภัณฑ์ในตารางที่ 1 และ 2 แต่ละสูตรผสมกับเซลล์แขวนลอย *B. subtilis* ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมจนมีลักษณะเป็นก้อนหมาด นำส่วนผสมที่ได้กวดผ่านแร้งเบอร์ 16 ได้แกรนูลเปียกออกมา และอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำออกมากวดผ่านแร้งเบอร์ 14 เพื่อคัดขนาดแกรนูลให้มีความสม่ำเสมอเพื่อเตรียมสำหรับทดสอบในขั้นต่อไป

### 3.5 คุณสมบัติของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* ในห้องปฏิบัติการ

#### 3.5.1 การละลายของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ

ละลายชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ใช้แท่งแม่เหล็กคนที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความเร็ว 500 รอบ ต่อนาที จนกระทั่งชีวภัณฑ์ละลายน้ำหมด บันทึกระยะเวลาในการละลายน้ำ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

#### 3.5.2 การวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างของชีวภัณฑ์ *B. subtilis*

นำชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

### 3.5.3 ความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของ *B. subtilis* ในสูตรชีวภัณฑ์

นำชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ ทดสอบความสม่ำเสมอโดยการสุ่มตัวอย่างละ 5 จุดๆ ละ 4 ซ้ำ ทดสอบด้วยวิธีการ dilution drop plate บนอาหาร PDA ทำ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี และคำนวณค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียในชีวภัณฑ์ (โคโลนี ต่อกรัม) และนำชีวภัณฑ์ไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อศึกษาลักษณะการกระจายตัวของ *B. subtilis*

### 3.5.4 ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus*

นำชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วปิเปตปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร นำมา pour plate กับอาหาร PDA จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *R. microsporus* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางตรงกลางจานเพาะเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) สำหรับคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา และตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา *R. microsporus* เพื่อตรวจสอบลักษณะของเส้นใยที่ผิดปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 40 และ 100 เท่า เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

### 3.5.5 ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus*

#### ในดินผสม

เตรียมอาหาร PDA ใส่หลอดทดลอง ปริมาณ 2 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำชิ้นวุ้นเชื้อรา *R. microsporus* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางตรงกลางหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน มี 4 วิธีการทดลอง แบ่งเป็นชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 2 วิธีการทดลอง และชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 2 วิธีการทดลอง ดังนี้ การทดลองที่ 1 การใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำที่ระดับความสูง 5 และ 11 เซนติเมตร นำดิน ขี้เลื่อย และน้ำที่ทำให้ปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากัน ใช้อัตราส่วน 9 : 1 : 1.5 กรอกส่วนผสมใส่หลอดทดลองที่เตรียมเชื้อราไว้ ให้ได้ระดับความสูง 5 เซนติเมตร แล้วหยดชีวภัณฑ์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร กรอกส่วนผสมต่อให้ได้ระดับความสูง 11 เซนติเมตร และหยดชีวภัณฑ์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

การทดลองที่ 2 การใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำที่ระดับความสูง 11 เซนติเมตร ผสมดิน ขี้เลื่อย และน้ำ อัตราส่วนผสมตามการทดลองที่ 1 กรอกส่วนผสมใส่หลอดทดลองที่เตรียมเชื้อราไว้ให้ได้ระดับความสูง 11 เซนติเมตร หยดชีวภัณฑ์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร

สำหรับชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำทั้ง 2 ไอโซเลท ทดลอง 4 ซ้ำ วัดการเจริญเส้นใยเชื้อราของชุดทดสอบที่เวลา 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus*

การทดลองที่ 3 การใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำผสมคลุกเคล้ากับดิน ผสมดิน ขี้เลื่อย น้ำที่ทำให้ปราศจากเชื้อ และชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ ใช้อัตราส่วน 9 : 1 : 1.5 : 3 ผสมให้เข้ากัน กรอกส่วนผสมใส่หลอดทดลองที่เตรียมเชื้อราไว้ ให้ได้ระดับความสูง 11 เซนติเมตร

การทดลองที่ 4 การใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำที่ระดับความสูง 2, 5 และ 8 เซนติเมตร ผสมดิน ชี้เลื่อย และน้ำที่ทำให้ปราศจากเชื้อ ใช้อัตราส่วน 9 : 1 : 1.5 ผสมให้เข้ากัน กรอกส่วนผสมใส่หลอดทดลองที่เตรียมเชื้อราไว้ข้างต้น ให้ได้ระดับความสูง 2, 5 และ 8 เซนติเมตร (ระดับความสูงที่กำหนดใส่ชีวภัณฑ์ไม่ละลายน้ำ จำนวน 1 กรัม) จากนั้นกรอกส่วนผสมใส่หลอดทดลองต่อไปให้ได้ระดับความสูง 11 เซนติเมตร

สำหรับชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำทั้ง 2 ไอโซเลท ทดลอง 4 ซ้ำ วัดการเจริญเส้นใย เชื้อราของชุดทดสอบที่ 3, 5, 7, 9 และ 11 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

### 3.6 การมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ที่สถานะต่างๆ

#### 3.6.1 ทดสอบภายใต้อุณหภูมิ 10, 28 และ 37 องศาเซลเซียส

เก็บรักษาชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ ในภาชนะที่ปิดสนิท วางไว้ที่ อุณหภูมิ 10, 28 และ 37 องศาเซลเซียส ตรวจนับปริมาณเชื้อในชีวภัณฑ์เป็นระยะเวลา 12 เดือน ด้วยวิธีการ dilution drop plate บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี คำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดในชีวภัณฑ์แต่ละสูตร

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* โดยนำชีวภัณฑ์แต่ละ สูตรละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และปิเปตปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร ใส่จานเพาะเชื้อ ด้วยการ pour plate กับอาหาร PDA ทิ้งไว้ให้เย็น และใช้ชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *R. microporus* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางตรงกลางจานเพาะเชื้อ บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุด ควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ชีวภัณฑ์แต่ละ สูตรทำการทดลอง 4 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

#### 3.6.2 การทดสอบภายใต้รังสี ultraviolet C (UVC)

เก็บรักษาชีวภัณฑ์ในภาชนะที่ปิดสนิท ไม่กรองแสง วัดความเข้มรังสี UVC เริ่มต้น จากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ระยะเวลา 0, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีการ dilution drop plate บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี คำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์แต่ละสูตร

การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ตามหัวข้อที่ 3.6.1 วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ชีวภัณฑ์แต่ละสูตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

เมื่อทดสอบและประเมินประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ข้อ 3.1 ถึง 3.6 ได้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพ จำนวน 2 สูตร คือ สูตรละลายน้ำ 1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 จึงคัดเลือก ชีวภัณฑ์ทั้ง 2 สูตร เพื่อทดสอบการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในดิน และการเจริญเติบโตของ ต้นยางพารา

### 3.7 การมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ในดินปลูกยางพารา

นำดินที่ใช้ปลูกยางพาราผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ชั่งดิน 400 กรัม แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพสูง จำนวน 2 สูตร คือ ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 และเติมน้ำกลั่นในกรรมวิธีที่รักษาความชื้นของดิน 50 เปอร์เซ็นต์ ตรวจนับปริมาณเชื้อครั้งแรก และตรวจนับปริมาณเชื้อที่ระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 เดือน วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ทำการทดลอง 4 กรรมวิธีๆ ละ 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ดินน้ำหนัก 100 กรัม + ใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 2 ดินน้ำหนัก 100 กรัม + ใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร (เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อรักษาความชื้นในดิน 50 เปอร์เซ็นต์)

กรรมวิธีที่ 3 ดินน้ำหนัก 100 กรัม + ใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ปริมาณ 3 กรัม ผสมคลุกเคล้ากับดิน

กรรมวิธีที่ 4 ดินน้ำหนัก 100 กรัม + ใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ปริมาณ 3 กรัม ผสมคลุกเคล้ากับดิน (เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเพื่อรักษาความชื้นในดิน 50 เปอร์เซ็นต์)

สุ่มเก็บกรรมวิธีละ 4 จุด สำหรับนำมา drop-plate technique บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี และคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียในสูตรชีวภัณฑ์ (โคโลนี ต่อกรัม)

### 3.8 ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการงอกของราก และการเจริญเติบโตของยางพารา

กะเทาะเปลือกเมล็ดยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ได้จากบริเวณพื้นที่มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ เพาะเมล็ดในกระตวยเพาะ เมื่อรากยางพาราเริ่มงอก ย้ายลงปลูกในดิน 500 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สูตรละลายน้ำ 1 ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เว้นระยะการใช้ชีวภัณฑ์ 15 วัน ต่อครั้งๆ ละ 50 มิลลิลิตร ดูแลรักษาต้นยางพาราด้วยการให้น้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้งๆ ละ 100 มิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) ทำการทดลอง 3 กรรมวิธี 6 ซ้ำๆ ละ 4 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปลูกยางตามปกติ (ไม่ใช้ชีวภัณฑ์)

กรรมวิธีที่ 2 ใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เว้นระยะการใช้ 15 วัน ต่อครั้ง จำนวน 4 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 3 ใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ปริมาณ 6 กรัม ผสมคลุกเคล้ากับดิน

บันทึกผลการเจริญเติบโต โดยวัดความยาวรากแก้ว ความสูงของต้น จำนวนใบ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ที่ระยะเวลา 10, 20, 30 และ 40 วัน นำรากไปวางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้แสงแบบสเตอริโอ เพื่อตรวจสอบลักษณะภายนอกเบื้องต้น และตัดปลายรากยาวพาราไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

### 3.9 ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการเจริญเติบโตของยางพาราในโรงเรือนทดลอง

เตรียมเมล็ดยางพาราพันธุ์ RRIM 600 กะเทาะเปลือกและคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ล้างให้สะอาด เพาะเมล็ดยางพารา โดยใช้ฟองน้ำที่มีความชื้นเหมาะสม เมื่อต้นกล้าอายุ 1 เดือนย้ายลงปลูกในโรงเรือนทดลอง ใช้ดิน 3 กิโลกรัม ต่อถุง ใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ปริมาณ 10 กรัม สำหรับรองก้นหลุมปลูก และเตรียมชีวภัณฑ์ขยาย สูตรละลายน้ำ 1 SM1 (การเลี้ยงขยายเชื้อใช้ชีวภัณฑ์ 10 กรัม ละลายในน้ำต้มสุก 1 ลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน นำมาผสมกับน้ำ 5 ลิตร) รดลงในดินปลูกยางพาราต้นละ 100 มิลลิลิตร เว้นระยะเวลาการใช้ 20 วัน ต่อครั้ง การดูแลรักษาให้น้ำ 2 ครั้งๆ ละ 200 มิลลิลิตร ต่อสัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 4 ต้น บันทึกผลการเจริญเติบโต ได้แก่ ความสูง ความยาวรากแก้ว จำนวนใบ น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง เก็บผลการทดลองเดือนที่ 1, 2 และ 3 ส่วนตัวอย่างดินและพืชเก็บสำหรับวิเคราะห์ธาตุอาหาร (ตารางที่ 3 และ 4) ตรวจสอบลักษณะภายนอกของรากด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ

ตารางที่ 3 พารามิเตอร์และวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติของดิน

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์
pH	pH meter ดิน: น้ำ = 1: 5
EC	Electrical conductivity ดิน: น้ำ = 1: 5
CEC	Ammonium acetate method
Organic matter	Walkley and Black
Total N	Kjeldahl method
Available P	Bray II, Molybdenum blue method
Exchangeable Ca	1 M NH <sub>4</sub> OAc pH7 Atomic Absorption Spectrophotometer
Exchangeable Mg	1 M NH <sub>4</sub> OAc pH7 Atomic Absorption Spectrophotometer
Exchangeable K	1 M NH <sub>4</sub> OAc pH7 Flame photometer
Exchangeable Fe	} 0.005 M DTPA (C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> ) Atomic Absorption Spectrophotometer
Exchangeable Mn	
Exchangeable Zn	
Exchangeable Cu	

**ตารางที่ 4** พารามิเตอร์และวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติของพืช

พารามิเตอร์	วิธีวิเคราะห์
Total N	Kjeldahl method
Total P	Yellow molybdovanadophosphoric acid method
Total K	Flame photometer
Total Ca	} Atomic Absorption Spectrophotometer
Total Mg	
Total Fe	
Total Mn	
Total Zn	
Total Cu	

### 3.10 ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการควบคุม *R. microporus* ในโรงเรือนทดลอง

การเตรียมต้นยางพารา เตรียมเมล็ดยางพาราพันธุ์ RRIM 600 กะเทาะเปลือกและคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ ล้างให้สะอาด เพาะเมล็ดยางพารา โดยใช้ฟองน้ำที่มีความชื้นเหมาะสมเมื่อต้นกล้าอายุ 1 เดือน ย้ายปลูกในดิน 5 กิโลกรัม ต่อถุง จัดการให้น้ำสัปดาห์ละ 3 ครั้งๆ ละ 200 มิลลิลิตร ตลอดระยะเวลาปลูกยาง ดูแลกำจัดวัชพืชทุกๆ 7 วัน จนครบกำหนด 1 ปี

การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ปริมาณ 10 กรัม สำหรับรองกันหลุมปลูก เมื่อยางพาราอายุ 10 เดือน เตรียมชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 โดยการเลี้ยงขยายตามข้อที่ 3.9 นำมาใส่ต้นยางพารา ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ต่อต้น

การใช้ปุ๋ย 15-15-15 และ 20-8-20 ให้กับต้นยางพาราอายุครบ 3 เดือน จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 กรัม ในกรรมวิธีที่มีการใช้ปุ๋ย

การปลูกเชื้อ *R. microporus* ล้างเมล็ดข้าวฟ่างให้สะอาด นำไปต้มประมาณ 10-20 นาที จนเมล็ดเริ่มแตก ตั้งไว้ให้เย็น นำเมล็ดข้าวฟ่างผสมกับซีลี้อยคลุกเคล้าให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตัดขึ้นวันเชื้อรา *R. microporus* วางบนข้าวฟ่างเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญเติบโตเต็มที่ ปลูกเชื้อราลงต้นยางอายุ 7 เดือน โดยการโรยรอบบริเวณโคนต้นยาง ต้นละ 200 กรัม แล้วกลบดิน เป็นระยะเวลา 3 เดือน วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCBD) ทำการทดลอง 4 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปลูกพืชตามปกติ (ไม่ใช้ปุ๋ย และชีวภัณฑ์)

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกพืชตามปกติ + ปลูกเชื้อ *R. microporus* (ไม่ใช้ปุ๋ย และชีวภัณฑ์)

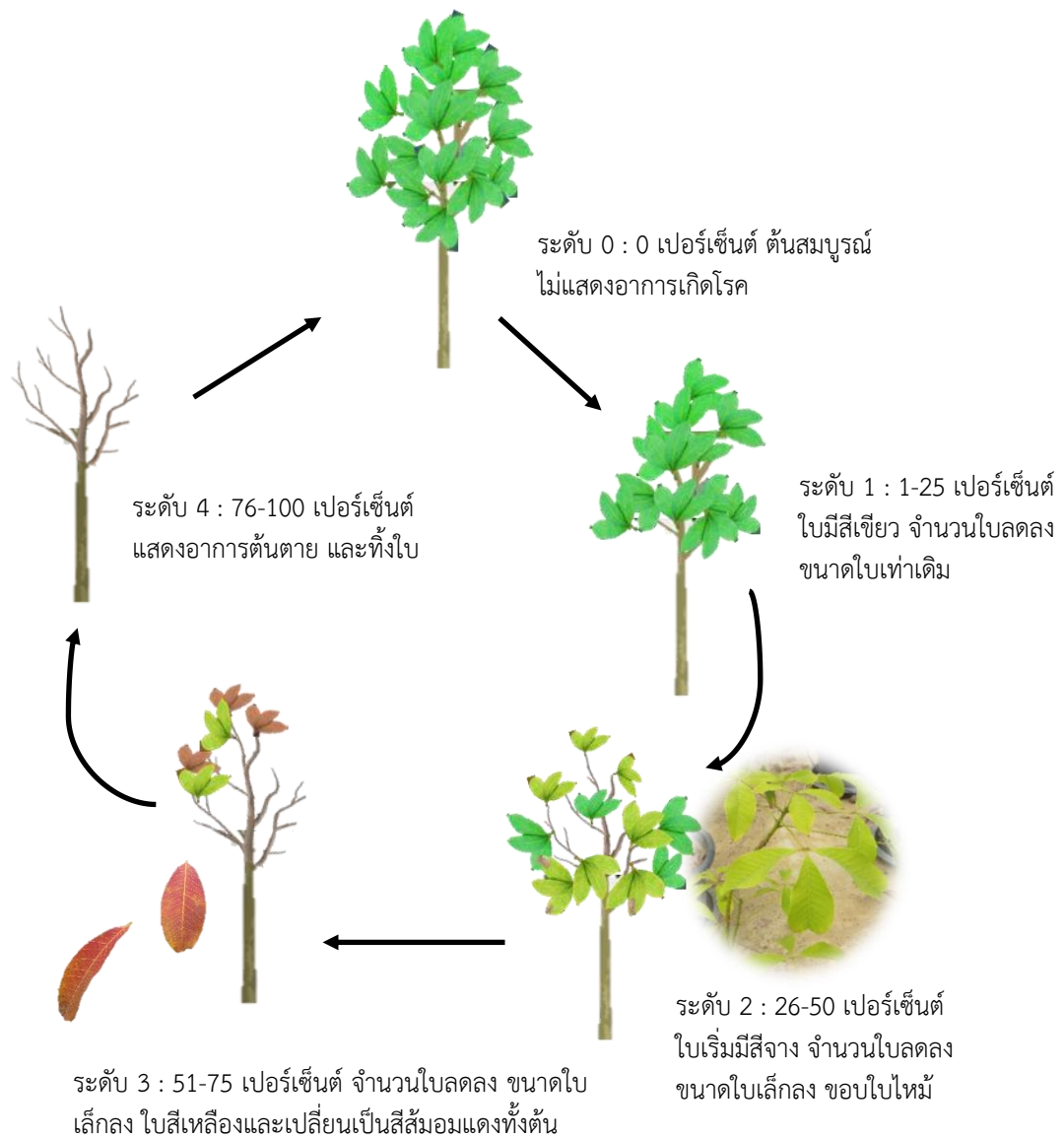
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกพืชตามปกติ + ใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ใช้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 กรัม + ปลูกเชื้อ *R. microporus* + ใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1



กรรมวิธีที่ 4 ปลุกพืชตามปกติ + ใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ใช้ปุ๋ยสูตร  
20-8-20 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 กรัม + ปลุกเชื้อ *R. microporus*  
+ ใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1

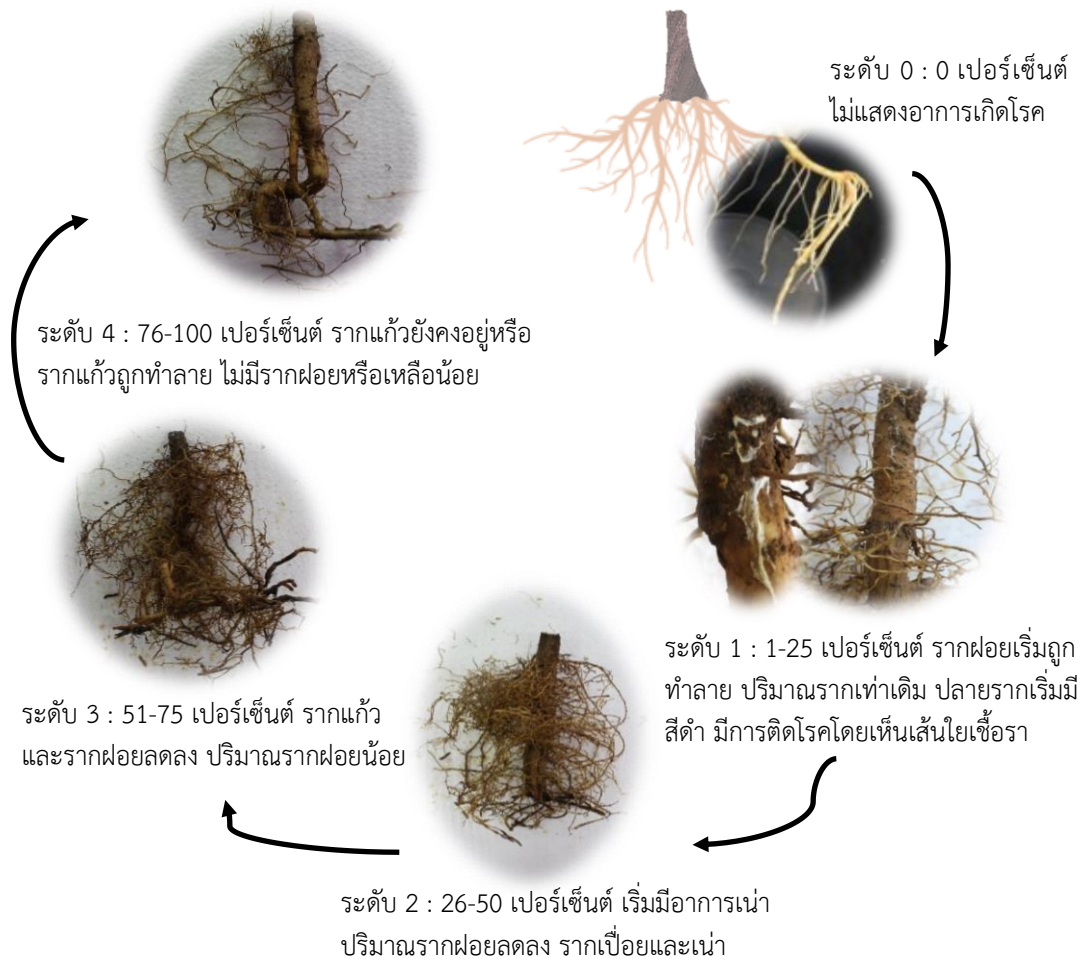
ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 8 ต้น บันทึกผลการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำหนักสด น้ำหนัก  
แห้ง ความยาวรากแก้ว ความสูงต้น จำนวนใบ และเก็บตัวอย่างดินและพืชสำหรับวิเคราะห์ธาตุ  
อาหาร N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn และ Mn (ตารางที่ 3 และ 4) ประเมินระดับความรุนแรงใน  
การเกิดโรคส่วนเหนือดินและราก ตามเกณฑ์ภาพที่ 3 และ 4

เกณฑ์การประเมินระดับความรุนแรงของโรคมี่ดังนี้  
ระดับความรุนแรงการเกิดโรคส่วนเหนือดิน ให้ระดับความรุนแรงการเกิดโรคดังนี้



ภาพที่ 3 ระดับความรุนแรงการเกิดโรคส่วนเหนือดินของต้นยางพารา

เกณฑ์ระดับความรุนแรงการเกิดโรคส่วนของราก ให้ระดับความรุนแรงการเกิดโรคดังนี้



ภาพที่ 4 ระดับความรุนแรงการเกิดโรคส่วนรากของต้นยางพารา

### 3.11 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

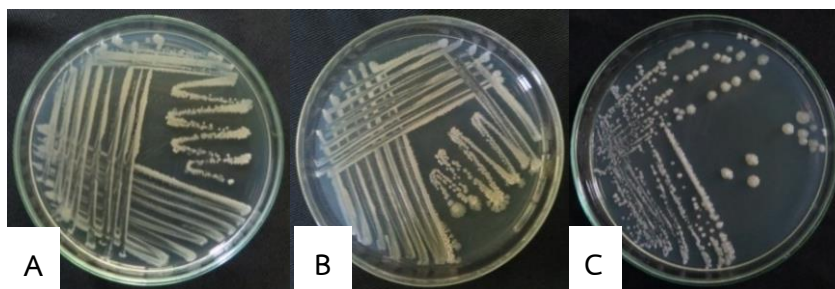
ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์ชุดทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple's Range Test (DMRT)

### บทที่ 3

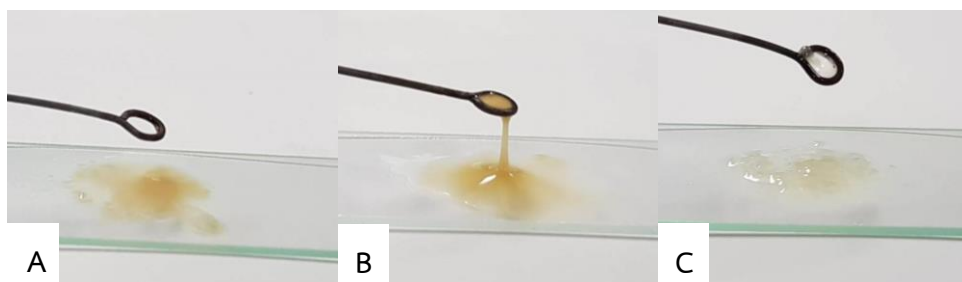
#### ผลการทดลอง

#### 1. ปฏิกริยาทางเคมีและการสร้างเอนโดสปอร์ของ *Bacillus*

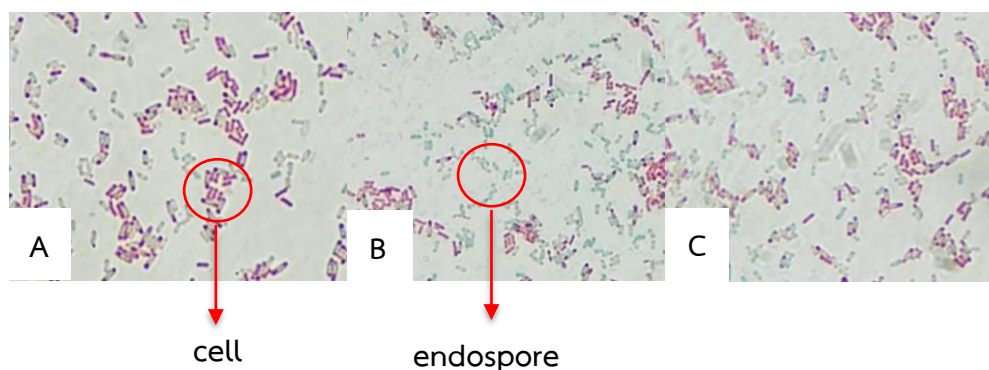
แบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *R. microporus* มีลักษณะดังภาพที่ 5 และจากการตรวจสอบปฏิกริยาทางเคมี แบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 แสดงปฏิกริยาแกรมบวก ส่วน *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 แสดงปฏิกริยาแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมลบมีความเหนียวและเหน็ดติดลูป ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีลักษณะดังกล่าว (ภาพที่ 6) นอกจากนี้แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีการสร้างเอนโดสปอร์ โดยมีลักษณะเป็นรูปร่างรีหรือรูปทรงกระบอก ที่มีความสมบูรณ์ เอนโดสปอร์ติดสีเขียวจากการย้อมด้วยมาลาไค์กรีน ในขณะที่เซลล์ของแบคทีเรียติดสีแดง (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 5 แบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (B) *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 (C) *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7



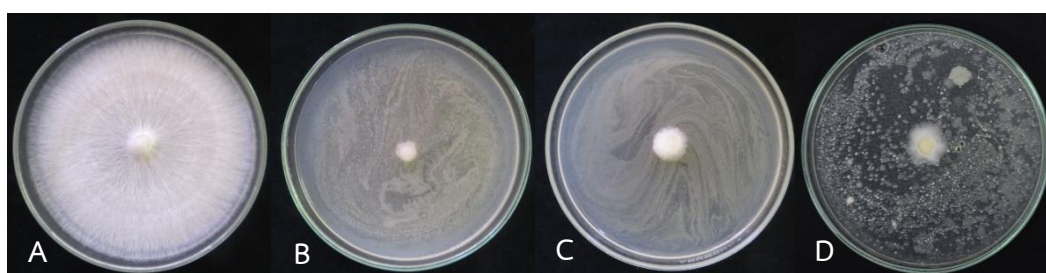
ภาพที่ 6 ปฏิกริยาแกรมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (B) *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 (C) *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7



ภาพที่ 7 ลักษณะเซลล์และเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (B) *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 (C) *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7

## 2. ประสิทธิภาพของ *Bacillus* ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีที่สุด 97.76 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 95.64 และ 82.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) โดยมีผลทำให้ปลายเส้นใยเชื้อรา มีขนาดเล็ก อัดตัวเกาะติดกันเป็นกระจุก ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ ในขณะที่ชุดควบคุมเส้นใยเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ (ภาพที่ 8) เมื่อนำปลายเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* บริเวณที่มีการยับยั้งแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท ตรวจสอบได้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาที่กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะผิดปกติ เส้นใยมีขนาดเล็ก สั้นหยิก โป่งพอง และกระจุกตัวกันแน่น ในขณะที่ชุดควบคุมปลายเส้นใยมีลักษณะมน มีขนาดใหญ่ และเจริญเติบโตงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 9)

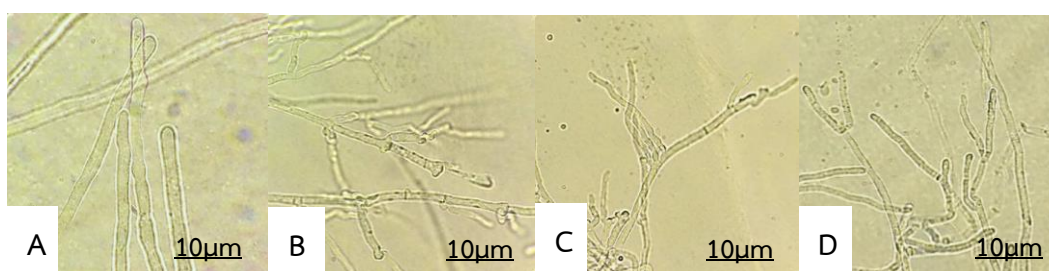


ภาพที่ 8 ลักษณะการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) ชุดควบคุม (B) *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (C) *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 (D) *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์

แบคทีเรียปฏิปักษ์	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i>
SM1	97.76 ± 2.81 a
LPDD3-2	95.64 ± 5.75 b
PT7	82.32 ± 1.72 b
ชุดควบคุม	0.00
T-test	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	4.17

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%  
*B. subtilis* = ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* = ไอโซเลท PT7



ภาพที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 100 เท่า  
 (A) ชุดควบคุม (B) *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (C) *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2  
 (D) *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7

### 3. การเตรียมสารประกอบสูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ

#### 3.1 ผลของสารประกอบต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus*

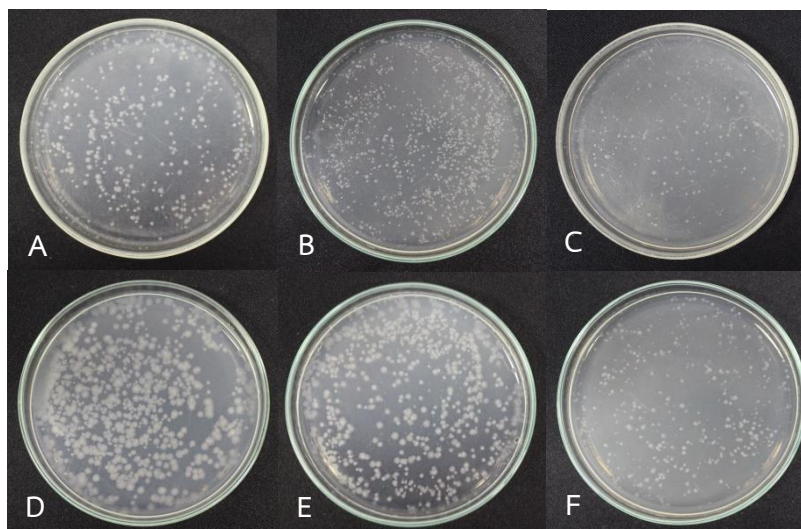
แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบสูตรละลายน้ำ 1 โดยมีปริมาณแบคทีเรีย  $1.5 \times 10^{11}$  และ  $1.4 \times 10^{11}$  โคโลนี ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 6) สังเกตโคโลนีมีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 10) ในขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ยังสามารถเจริญเติบโตได้ดี เมื่อทดสอบบนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบสูตรไม่ละลายน้ำ 2 และ 3 มีปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์  $1.2 \times 10^{11}$  โคโลนี ต่อมิลลิลิตร และปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 น้อยที่สุดในอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบสูตรไม่ละลายน้ำ 2 และ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 การเจริญของแบคทีเรียปฏิชีวนะบนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบสูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ

สารประกอบ+แบคทีเรียปฏิชีวนะ	ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวนะ (โคโลนี ต่อมิลลิลิตร)
control (SM1)	$1.2 \pm 1.8 \times 10^{11}$
control (LPDD3-2)	$1.1 \pm 2.3 \times 10^{11}$
control (PT7)	$1.1 \pm 2.0 \times 10^6$
ละลายน้ำ 1 + SM1	$1.5 \pm 1.8 \times 10^{11}$
ละลายน้ำ 2 + SM1	$1.2 \pm 1.1 \times 10^{11}$
ละลายน้ำ 3 + SM1	$1.2 \pm 1.6 \times 10^{11}$
ละลายน้ำ 1 + LPDD3-2	$1.4 \pm 1.2 \times 10^{11}$
ละลายน้ำ 2 + LPDD3-2	$1.2 \pm 1.5 \times 10^{11}$
ละลายน้ำ 3 + LPDD3-2	$1.2 \pm 1.1 \times 10^{11}$
ละลายน้ำ 1 + PT7	$1.1 \pm 2.3 \times 10^6$
ละลายน้ำ 2 + PT7	$1.1 \pm 1.0 \times 10^6$
ละลายน้ำ 3 + PT7	$1.2 \pm 1.4 \times 10^6$
ไม่ละลายน้ำ 1 + SM1	$1.1 \pm 1.6 \times 10^{11}$
ไม่ละลายน้ำ 2 + SM1	$1.2 \pm 1.1 \times 10^{11}$
ไม่ละลายน้ำ 3 + SM1	$1.2 \pm 1.9 \times 10^{11}$
ไม่ละลายน้ำ 1 + LPDD3-2	$9.6 \pm 3.8 \times 10^{10}$
ไม่ละลายน้ำ 2 + LPDD3-2	$8.6 \pm 1.2 \times 10^{10}$
ไม่ละลายน้ำ 3 + LPDD3-2	$1.1 \pm 1.2 \times 10^{11}$
ไม่ละลายน้ำ 1 + PT7	$1.2 \pm 1.2 \times 10^6$
ไม่ละลายน้ำ 2 + PT7	$3.9 \pm 1.2 \times 10^5$
ไม่ละลายน้ำ 3 + PT7	$6.0 \pm 1.2 \times 10^5$

หมายเหตุ : ปริมาณ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 เริ่มต้น  $3.5 \times 10^{11}$  โคโลนี ต่อมิลลิลิตร, ไอโซเลท LPDD 3-2 เท่ากับ  $2.3 \times 10^{11}$  โคโลนี ต่อมิลลิลิตร, และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 เท่ากับ  $2.2 \times 10^6$  โคโลนี ต่อมิลลิลิตร  
*B. subtilis* = ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* = ไอโซเลท PT7

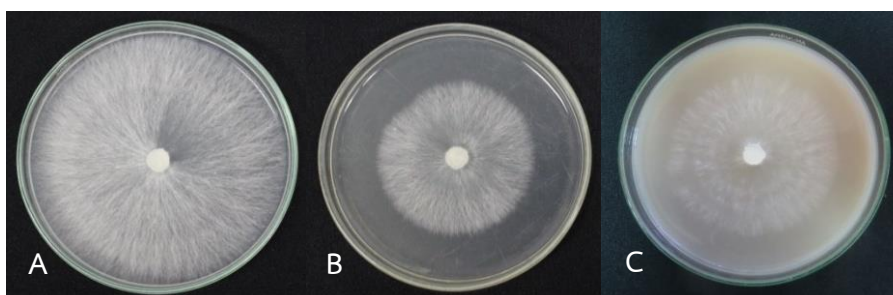




ภาพที่ 10 ผลของอาหาร PDA ผสมสารประกอบสูตรละลายน้ำ 1 ต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) ชุดควบคุม *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (B) ชุดควบคุม *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD 3-2 (C) ชุดควบคุม *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 (D) ชุดทดสอบ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (E) ชุดทดสอบ *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD 3-2 (F) ชุดทดสอบ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7

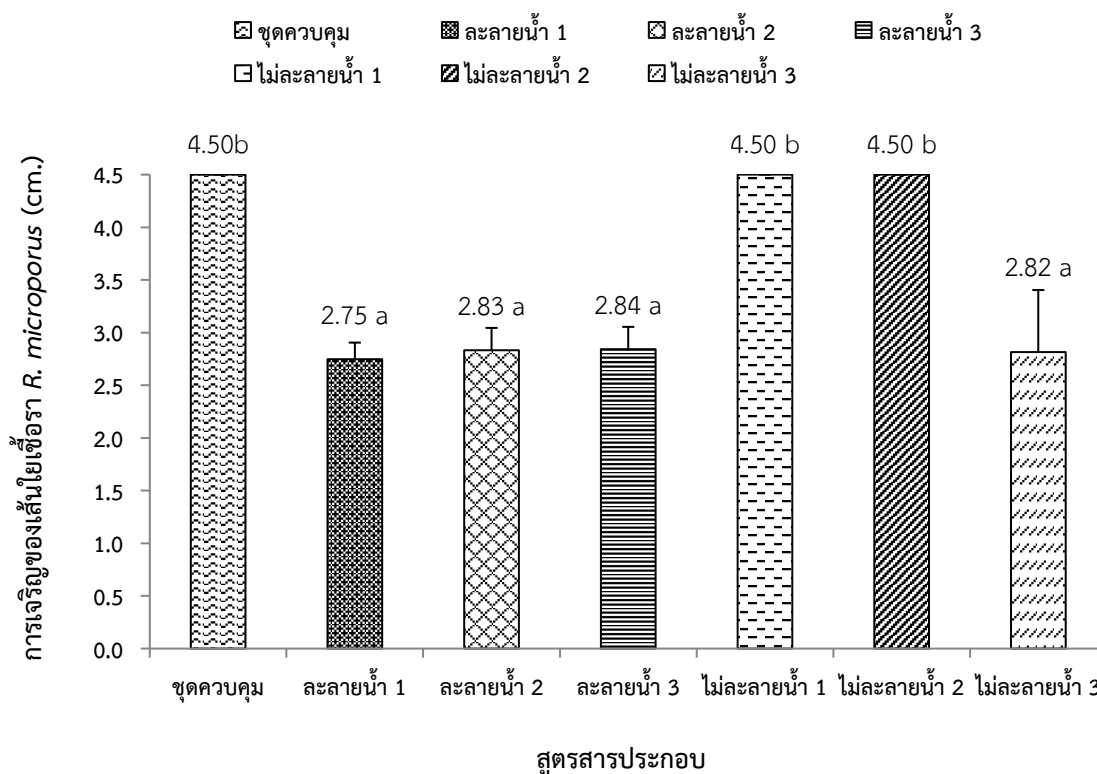
### 3.2 ผลของสารประกอบต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

เชื้อรา *R. microporus* สามารถเจริญบนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบสูตรละลายน้ำ 1, 2 และ 3 ซึ่งการเจริญของเส้นใยมีรัศมี 2.75, 2.83 และ 2.84 เซนติเมตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับกับสารประกอบสูตรไม่ละลายน้ำ 3 เท่ากับ 2.82 เซนติเมตร ซึ่งต่ำกว่าชุดควบคุม และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) กับชุดควบคุม ขณะที่เชื้อรา *R. microporus* เจริญบนอาหาร PDA ผสมสารประกอบสูตรไม่ละลายน้ำ 1 และ 2 ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม (ภาพที่ 12) โดยเส้นใยมีลักษณะอัดตัวกันแน่น มีขนาดเล็ก และเส้นใยบาง เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยชุดควบคุมที่มีขนาดใหญ่ และเจริญได้ตามปกติ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* บนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบที่ระยะเวลา 7 วัน (A) ชุดควบคุม (B) สูตรละลายน้ำ 1 (C) สูตรไม่ละลายน้ำ 3





ภาพที่ 12 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* บนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบที่ระยะเวลา 7 วัน

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแท่งเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

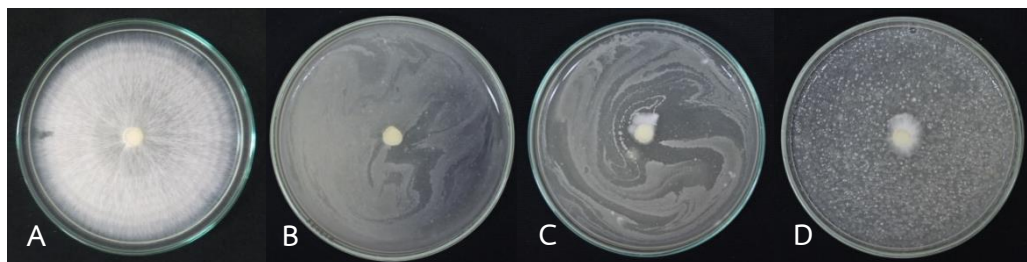
### 3.3 ผลของสารประกอบร่วมกับ *Bacillus* ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

แบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกไอโซเลทที่เจริญบนอาหาร PDA ผสมสารประกอบสูตรละลายน้ำแต่ละสูตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* อยู่ในช่วง 80.22-97.78 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ที่ทดสอบร่วมกับสารประกอบสูตรละลายน้ำ 1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สูงที่สุด (97.78 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา คือ สารประกอบสูตรละลายน้ำ 2 และ 3 เช่นเดียวกับไอโซเลท LPDD3-2 สารประกอบสูตรละลายน้ำ 1 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) กับแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 บนอาหาร PDA ผสมสารประกอบสูตรละลายน้ำทั้ง 3 สูตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้น้อยอยู่ในช่วง (80-81 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 7) ลักษณะการยับยั้งที่เกิดขึ้นเส้นใยเชื้อรากระจุกตัวกันแน่น มีขนาดบาง และไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ในชุดทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เส้นใยเจริญตามปกติ (ภาพที่ 13)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนอาหาร PDA ผสมสารประกอบสูตรละลายน้ำ

สารประกอบ+แบคทีเรียปฏิปักษ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i>
ละลายน้ำ 1 + SM1	97.78 ± 3.05 a
ละลายน้ำ 2 + SM1	92.67 ± 5.02 ab
ละลายน้ำ 3 + SM1	92.44 ± 6.97 ab
ละลายน้ำ 1 + LPDD3-2	93.00 ± 9.59 ab
ละลายน้ำ 2 + LPDD3-2	86.78 ± 6.89 bc
ละลายน้ำ 3 + LPDD3-2	88.44 ± 6.59 abc
ละลายน้ำ 1 + PT7	81.11 ± 4.23 c
ละลายน้ำ 2 + PT7	81.55 ± 2.27 c
ละลายน้ำ 3 + PT7	80.22 ± 1.87 c
ชุดควบคุม	0.00
T-test	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	6.46

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%  
*B. subtilis* = ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* = ไอโซเลท PT7



ภาพที่ 13 การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* บนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบสูตรละลายน้ำ 1 โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ (A) ชุดควบคุม (PDA) (B) *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 (C) *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 (D) *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร PDA ที่ผสมสารประกอบสูตรไม่ละลายน้ำ พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 ที่ทดสอบร่วมกับสารประกอบสูตรไม่ละลายน้ำทั้ง 3 สูตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* อยู่ในช่วง 92.00-95.69 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 บนอาหาร PDA ผสมสารประกอบสูตรไม่ละลายน้ำทั้ง 3 สูตร (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 เพอร์เซ็นต์ยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนอาหาร PDA ผสมสารประกอบสูตรไม่ละลายน้ำ

สารประกอบ+แบคทีเรียปฏิปักษ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i>
ไม่ละลายน้ำ 1 + SM1	93.55 ± 4.40 a
ไม่ละลายน้ำ 2 + SM1	95.69 ± 2.56 a
ไม่ละลายน้ำ 3 + SM1	95.33 ± 5.05 a
ไม่ละลายน้ำ 1 + LPDD3-2	95.00 ± 6.85 a
ไม่ละลายน้ำ 2 + LPDD3-2	92.00 ± 7.34 a
ไม่ละลายน้ำ 3 + LPDD3-2	95.00 ± 6.85 a
ไม่ละลายน้ำ 1 + PT7	81.33 ± 2.03 b
ไม่ละลายน้ำ 2 + PT7	79.33 ± 3.82 b
ไม่ละลายน้ำ 3 + PT7	82.00 ± 1.39 b
ชุดควบคุม	0.00
T-test	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	5.50

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

*B. subtilis* = ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* = ไอโซเลท PT7

#### 4. การพัฒนาชีวภัณฑ์ *B. subtilis* เพื่อการควบคุมเชื้อรา *R. microporus*

##### 4.1 การเพาะเลี้ยง *B. subtilis*

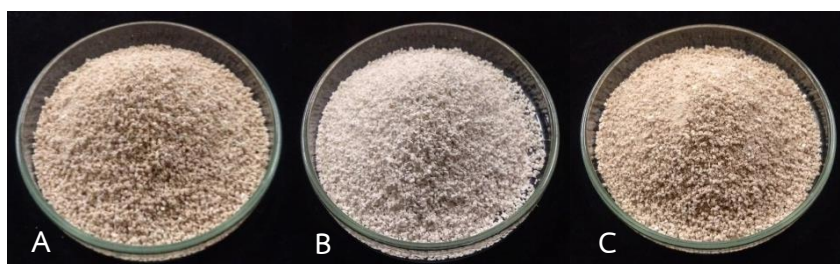
แบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD 3-2 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นทั้งหมด  $9.5 \times 10^{15}$  และ  $8.3 \times 10^{15}$  โคลนี ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 เป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตช้า การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณค่อนข้างยาก ปนเปื้อนง่าย เชื้อมีความขุ่นหนืด จึงเป็นอุปสรรคสำหรับการเก็บเอนโดสปอร์ และให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคที่ต่ำ จึงไม่คัดเลือกสำหรับเตรียมเป็นชีวภัณฑ์

##### 4.2 การเตรียมชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ

ในการเตรียมชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำของแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 สามารถพัฒนาชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำได้ไอโซเลทละ 3 สูตร ซึ่งมีลักษณะเป็นแบบแกรนูลแห้ง สีขาว ขนาด 2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 14) และชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ ไอโซเลทละ 3 สูตร เช่นเดียวกัน โดยชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 1 และ 3 มีสีน้ำตาล ในขณะที่ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 2 แกรนูลมีสีขาวขุ่น (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 14 เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* รูปแบบแกรนูล (A) สูตรละลายน้ำ 1 SM1 (B) สูตรละลายน้ำ 2 SM1 (C) สูตรละลายน้ำ 3 SM1



ภาพที่ 15 เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* รูปแบบแกรนูล (A) สูตรไม่ละลายน้ำ 1 SM1 (B) สูตรไม่ละลายน้ำ 2 SM1 (C) สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1

## 5. คุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ต่อการควบคุมเชื้อรา *R. microporus* ในห้องปฏิบัติการ

### 5.1 การละลายของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ

เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และ LPDD3-2 ใช้เวลาในการละลายน้ำน้อยที่สุดเท่ากับ 1.23 และ 1.25 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) กับเชื้อแบคทีเรียสูตรละลายน้ำ 3 ที่ใช้ระยะเวลา最多ในการละลาย โดยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ทั้ง 2 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการละลายน้ำอยู่ในช่วง 1.23-2.08 นาที และแบบที่เรียไอโซเลทเดียวกันใช้เวลาละลายน้ำต่างกันประมาณ 0.3-0.5 นาที เช่นเดียวกันที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ใช้เวลาน้อยที่สุดในสูตรละลายน้ำ 1 SM1 และ LPDD3-2 และใช้เวลา最多ในสูตรละลายน้ำ 3 ซึ่งการละลายน้ำอยู่ในช่วง 1.44-2.56 นาที และไอโซเลทเดียวกัน ใช้เวลาละลายน้ำต่างกันประมาณ 0.5-0.6 นาที ทั้งนี้สูตรที่เหมือนกันทั้ง 2 ไอโซเลท ใช้เวลาในการละลายน้ำไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ความสามารถในการละลายน้ำของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์

สูตรชีวภัณฑ์	เวลาในการละลายน้ำ (นาที)	
	1 เปอร์เซ็นต์	3 เปอร์เซ็นต์
ละลายน้ำ 1 SM1	1.23 ± 0.01 c	1.44 ± 0.02 c
ละลายน้ำ 2 SM1	1.56 ± 0.02 b	2.02 ± 0.02 b
ละลายน้ำ 3 SM1	2.06 ± 0.01 a	2.56 ± 0.02 a
ละลายน้ำ 1 LPDD 3-2	1.25 ± 0.01 c	1.46 ± 0.04 c
ละลายน้ำ 2 LPDD 3-2	1.55 ± 0.02 b	2.04 ± 0.01 b
ละลายน้ำ 3 LPDD 3-2	2.08 ± 0.01 a	2.54 ± 0.05 a
T-test	*	*
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	0.03	6.37

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.05$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%  
*B. subtilis* = ไอโซเลท SM1 และ ไอโซเลท LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* = ไอโซเลท PT7

## 5.2 ความเป็นกรดเป็นด่างของชีวภัณฑ์ *B. subtilis*

ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 สูตรละลายน้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ในช่วง 6.45-6.79 ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ในช่วง 6.68-6.93 ซึ่งมีค่าเป็นกลาง สำหรับชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ในช่วง 7.01-7.11 และ 7.11-7.47 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเป็นกลาง และที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดเป็นด่างมีค่าน้อยกว่าที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างมากกว่าชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ความเป็นกรดเป็นด่างของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์

สูตรชีวภัณฑ์	ความเป็นกรดเป็นด่าง	
	1 เปอร์เซ็นต์	3 เปอร์เซ็นต์
ละลายน้ำ 1 SM1	6.58 ± 0.19	6.68 ± 0.09
ละลายน้ำ 2 SM1	6.79 ± 0.06	6.80 ± 0.10
ละลายน้ำ 3 SM1	6.45 ± 0.25	6.83 ± 0.05
ละลายน้ำ 1 LPDD 3-2	6.48 ± 0.09	6.71 ± 0.11
ละลายน้ำ 2 LPDD 3-2	6.67 ± 0.02	6.84 ± 0.07
ละลายน้ำ 3 LPDD 3-2	6.67 ± 0.14	6.93 ± 0.06
ไม่ละลายน้ำ 1 SM1	7.01 ± 0.09	7.11 ± 0.15
ไม่ละลายน้ำ 2 SM1	7.10 ± 0.12	7.44 ± 0.12
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1	7.04 ± 0.04	7.26 ± 0.11
ไม่ละลายน้ำ 1 LPDD 3-2	7.07 ± 0.23	7.16 ± 0.25
ไม่ละลายน้ำ 2 LPDD 3-2	7.11 ± 0.10	7.47 ± 0.11
ไม่ละลายน้ำ 3 LPDD 3-2	7.02 ± 0.10	7.34 ± 0.17
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	6.67 ± 0.06	6.68 ± 0.06

*B. subtilis* = ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* = ไอโซเลท PT7

### 5.3 ความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของ *B. subtilis* ในสูตรชีวภัณฑ์

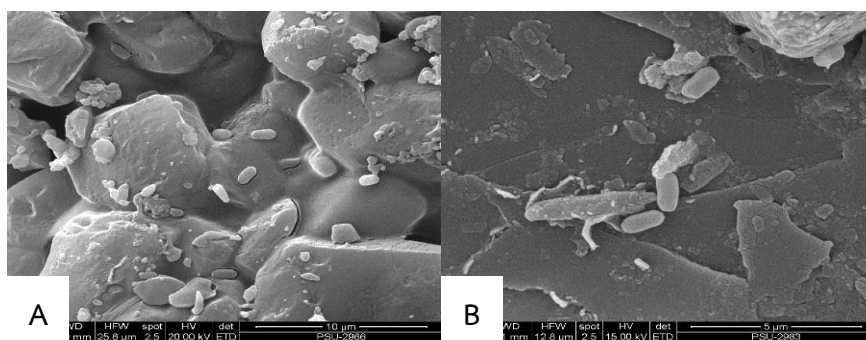
แบคทีเรีย *B. subtilis* มีปริมาณมากที่สุดที่สุดในชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรละลายน้ำ 3 SM1 เท่ากับ  $8.5 \times 10^{11}$  โคโลนี ต่อกรัม และมีปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* น้อยที่สุดในชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 2 LPDD3-2 ( $5.8 \times 10^{11}$  โคโลนี ต่อกรัม) ส่วนชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ แบคทีเรีย *B. subtilis* มีปริมาณมากที่สุดที่สุดในชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ( $9.0 \times 10^{11}$  โคโลนี ต่อกรัม) และมีปริมาณน้อยที่สุดในชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 2 LPDD3-2 ( $6.3 \times 10^{11}$  โคโลนี ต่อกรัม) นอกจากนี้ชีวภัณฑ์ทุกสูตร มีปริมาณแบคทีเรียมากกว่า  $10^{11}$  โคโลนี ต่อกรัม ทั้งในสูตรละลายน้ำและสูตรไม่ละลายน้ำ (ตารางที่ 11) โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชีวภัณฑ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เอนโดสปอร์แบคทีเรียสามารถเข้าไปครอบครองพื้นที่ผิวทั้งภายนอก และภายในสารประกอบที่ใช้ผลิตชีวภัณฑ์ ในขณะที่สูตรละลายน้ำสารประกอบมีช่องว่างมากกว่า และสูตรไม่ละลายน้ำสารประกอบมีลักษณะเป็นแผ่น ซ้อนทับกัน ช่องว่างน้อย สำหรับเอนโดสปอร์มีลักษณะเป็นวงรีหรือทรงกระบอก ยังคงมีความสมบูรณ์ มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ (ภาพที่ 16)

**ตารางที่ 11** ปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ในชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ

สูตรชีวภัณฑ์	ปริมาณแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ (โคโลนี ต่อกรัม)
ละลายน้ำ 1 SM1	$8.5 \pm 1.3 \times 10^{11}$
ละลายน้ำ 2 SM1	$7.3 \pm 1.3 \times 10^{11}$
ละลายน้ำ 3 SM1	$8.5 \pm 1.3 \times 10^{11}$
ละลายน้ำ 1 LPDD3-2	$7.5 \pm 1.3 \times 10^{11}$
ละลายน้ำ 2 LPDD3-2	$5.8 \pm 0.5 \times 10^{11}$
ละลายน้ำ 3 LPDD3-2	$8.3 \pm 1.0 \times 10^{11}$
ไม่ละลายน้ำ 1 SM1	$7.5 \pm 2.4 \times 10^{11}$
ไม่ละลายน้ำ 2 SM1	$8.5 \pm 1.2 \times 10^{11}$
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1	$9.0 \pm 0.8 \times 10^{11}$
ไม่ละลายน้ำ 1 LPDD3-2	$8.0 \pm 1.4 \times 10^{11}$
ไม่ละลายน้ำ 2 LPDD3-2	$6.3 \pm 0.5 \times 10^{11}$
ไม่ละลายน้ำ 3 LPDD3-2	$8.3 \pm 2.2 \times 10^{11}$

หมายเหตุ : ปริมาณแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 เริ่มต้น  $9.5 \times 10^{15}$  โคโลนี ต่อมิลลิลิตร และไอโซเลท LPDD3-2 เริ่มต้น  $8.3 \times 10^{15}$  โคโลนี ต่อมิลลิลิตร

*B. subtilis* = ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* = ไอโซเลท PT7



**ภาพที่ 16** การกระจายตัวของเอนโดสปอร์แบคทีเรีย *B. subtilis* ในชีวภัณฑ์ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย (10 µm) 5000 เท่า (A) สูตรละลายน้ำ 1 SM1 (B) สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1

#### 5.4 ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus*

ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วงระหว่าง 90-96 และ 91-97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 มีแนวโน้มยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด ทั้งที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 96.33 และ 97.22 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 มีแนวโน้มเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่า *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 แต่ทุกสูตรไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) และที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่าที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เล็กน้อย (ตารางที่ 12)

ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำทุกสูตร สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วงระหว่าง 90-97 และ 91-98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 มีแนวโน้มยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด แต่ทั้งนี้ทุกสูตรไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13) ในขณะที่ชุดควบคุมเชื้อราเจริญเติบโตได้ตามปกติ สังเกตได้จากเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีลักษณะที่สมบูรณ์ในชุดควบคุม และเส้นใยขนาดเล็ก เจริญเติบโตแบบกระจุกตัวในชุดทดสอบ (ภาพที่ 17) ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* บริเวณปลายเส้นใยที่ถูกยับยั้งของชุดทดสอบมีลักษณะความผิดปกติ โดยเส้นใยมีการแตกแขนงขนาดเล็ก สั้นหยิก เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีลักษณะเส้นใยที่สมบูรณ์ ปลายเส้นใยมน เจริญงอกยาวเป็นปกติ (ภาพที่ 18)

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์

สูตรชีวภัณฑ์	การยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)	
	1 เปอร์เซ็นต์	3 เปอร์เซ็นต์
ละลายน้ำ 1 SM1	96.33 ± 5.46	97.22 ± 3.81
ละลายน้ำ 2 SM1	95.33 ± 6.40	96.33 ± 5.63
ละลายน้ำ 3 SM1	93.00 ± 5.05	95.11 ± 4.96
ละลายน้ำ 1 LPDD3-2	93.00 ± 3.25	94.33 ± 5.70
ละลายน้ำ 2 LPDD3-2	91.89 ± 3.00	93.00 ± 5.07
ละลายน้ำ 3 LPDD3-2	90.56 ± 5.14	91.78 ± 3.20
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	0.00	0.00
T-test	ns	ns
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	5.27	5.09

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

*B. subtilis* = ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* = ไอโซเลท PT7

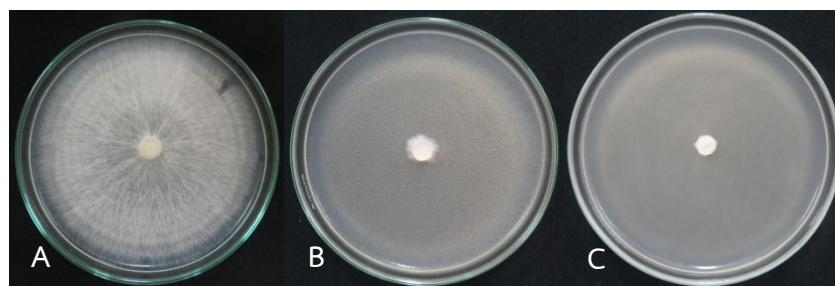


ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์

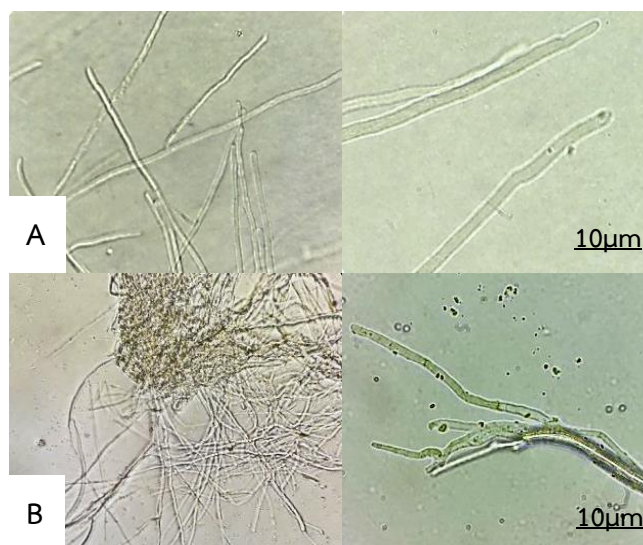
สูตรชีวภัณฑ์	การยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)	
	1 เปอร์เซ็นต์	3 เปอร์เซ็นต์
ไม่ละลายน้ำ 1 SM1	92.33 ± 6.10	94.11 ± 5.84
ไม่ละลายน้ำ 2 SM1	90.22 ± 3.37	93.11 ± 4.93
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1	97.44 ± 3.51	98.89 ± 2.49
ไม่ละลายน้ำ 1 LPDD3-2	91.44 ± 5.74	92.22 ± 5.51
ไม่ละลายน้ำ 2 LPDD3-2	90.44 ± 3.65	91.33 ± 3.53
ไม่ละลายน้ำ 3 LPDD3-2	96.55 ± 3.15	97.78 ± 4.97
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	0.00	0.00
T-test	ns	ns
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	4.75	4.96

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

*B. subtilis* = ไอโซเลท SM1 และ ไอโซเลท LPDD3-2, *B. amyloliquefaciens* = ไอโซเลท PT7



ภาพที่ 17 ลักษณะการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ไอโซเลท NK 6 โดยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 เมื่อทดสอบโดยวิธีการ pour plate ด้วยอาหาร PDA และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน (A) ชุดควบคุม (B) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (C) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* เมื่อทดสอบกับชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา (A) ชุดควบคุมกำลังขยาย 40 เท่า และ 100 เท่า (B) เส้นใยเชื้อราชุดทดสอบกำลังขยาย 40 เท่า และ 100 เท่า

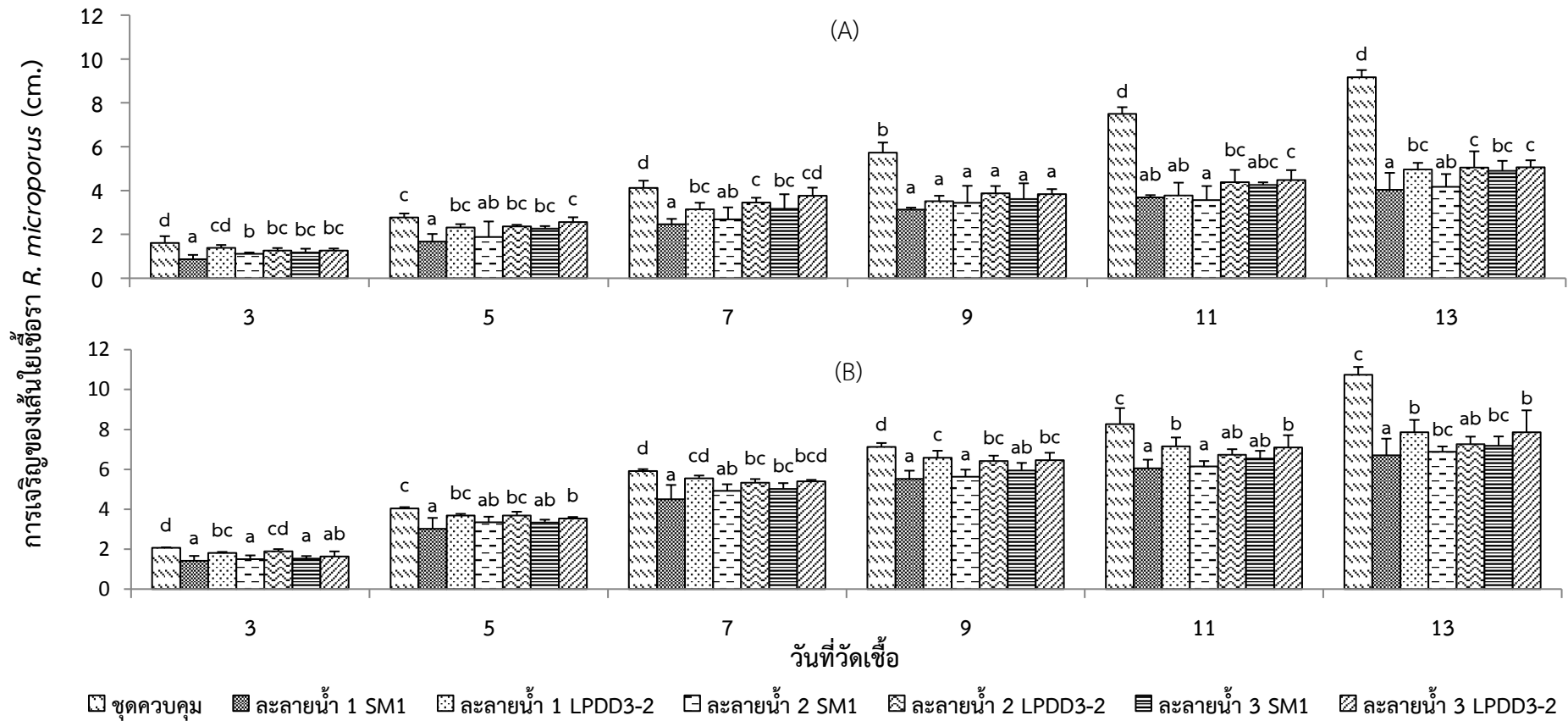
## 5.5 ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในดินผสม

### 5.5.1 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ

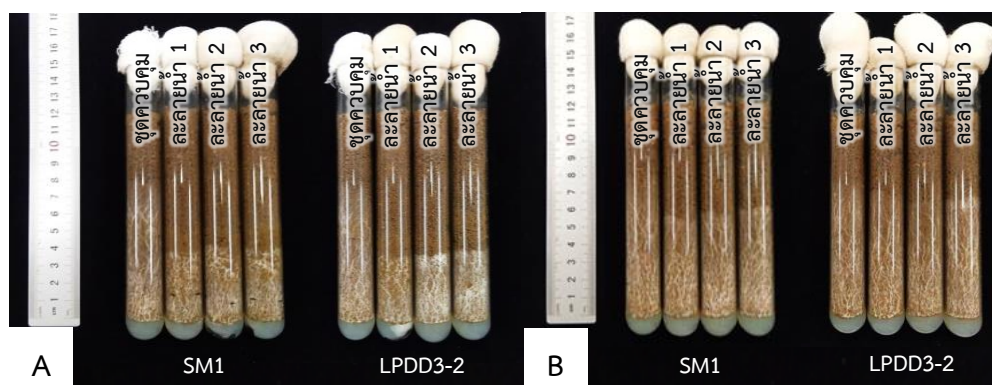
การทดลองที่ 1 การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใช้ที่ระดับความสูง 5 และ 11 เซนติเมตร ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 ที่ระยะเวลา 13 วัน สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีที่สุด โดยเส้นใยเชื้อราเจริญได้น้อย (4.04 เซนติเมตร) และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราตลอดระยะเวลา 13 วัน ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์สูตรอื่นๆ รองลงมา คือ ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 2 SM1 และที่ระยะเวลา 9 วัน ชีวภัณฑ์ทุกสูตรสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้สูงกว่าชุดควบคุมและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) (ภาพที่ 19 A)

การทดลองที่ 2 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุดในช่วงระยะเวลา 13 วัน โดยที่เวลา 13 วัน เชื้อราเจริญได้น้อย (6.71 เซนติเมตร) กว่าชุดควบคุมและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) (ภาพที่ 19 B)

นอกจากนี้การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 มีแนวโน้มยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีกว่าไอโซเลท LPDD3-2 ทั้ง 2 วิธีการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธีการ การทดลองที่ 1 ประสิทธิภาพของการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ดีกว่าการทดลองที่ 2 โดยตลอดระยะเวลา 13 วัน เส้นใยเชื้อราสามารถเจริญเติบโตอยู่ในช่วงระหว่าง 0.8-5.0 เซนติเมตร ขณะที่การทดลองที่ 2 อยู่ในช่วงระหว่าง 1-7 เซนติเมตร ทุกๆไอโซเลท และเมื่อสังเกตการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สำหรับการทดลองที่ 1 ชุดทดสอบ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 เส้นใยเชื้อราเจริญเติบโตได้น้อยกว่าในชุดทดสอบของไอโซเลท LPDD3-2 และเจริญเติบโตในชุดควบคุม (ภาพที่ 20 A) ขณะที่การทดลองที่ 2 เส้นใยเชื้อราในชุดทดสอบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตได้ แต่เจริญได้น้อยกว่าชุดควบคุม (ภาพที่ 20 B)



ภาพที่ 19 การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD 3-2 สูตรละลายน้ำ ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในดินผสม (A) การทดลองที่ 1 ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 5 และ 11 เซนติเมตร (B) การทดลองที่ 2 ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 11 เซนติเมตร  
 หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแท่งเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.05$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 20 การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรละลายน้ำ เพื่อยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในดินผสมที่ระยะเวลา 11 วัน (A) การทดลองที่ 1 ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 5 และ 11 เซนติเมตร (B) การทดลองที่ 2 ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 11 เซนติเมตร

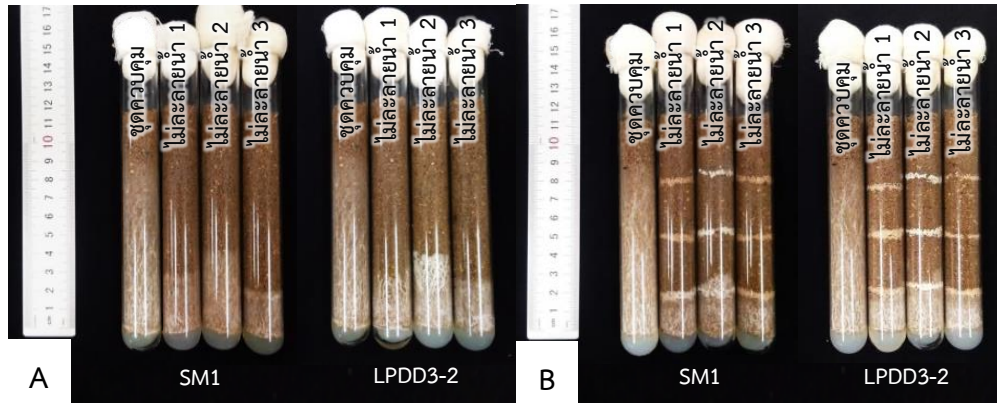
### 5.5.2 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ

การทดลองที่ 1 การใช้ชีวภัณฑ์ผสมคลุกเคล้ากับดิน โดยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีที่สุดตลอดระยะเวลา 11 วัน โดยที่เวลา 11 วัน การเจริญของเส้นใยเชื้อราน้อย (2.65 เซนติเมตร) เมื่อเปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์สูตรอื่นๆ ในการทดลองเดียวกัน ในขณะที่ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 2 LPDD3-2 เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยที่สุดในช่วงระยะเวลา 11 วัน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) กับชุดควบคุม (ภาพที่ 22 A)

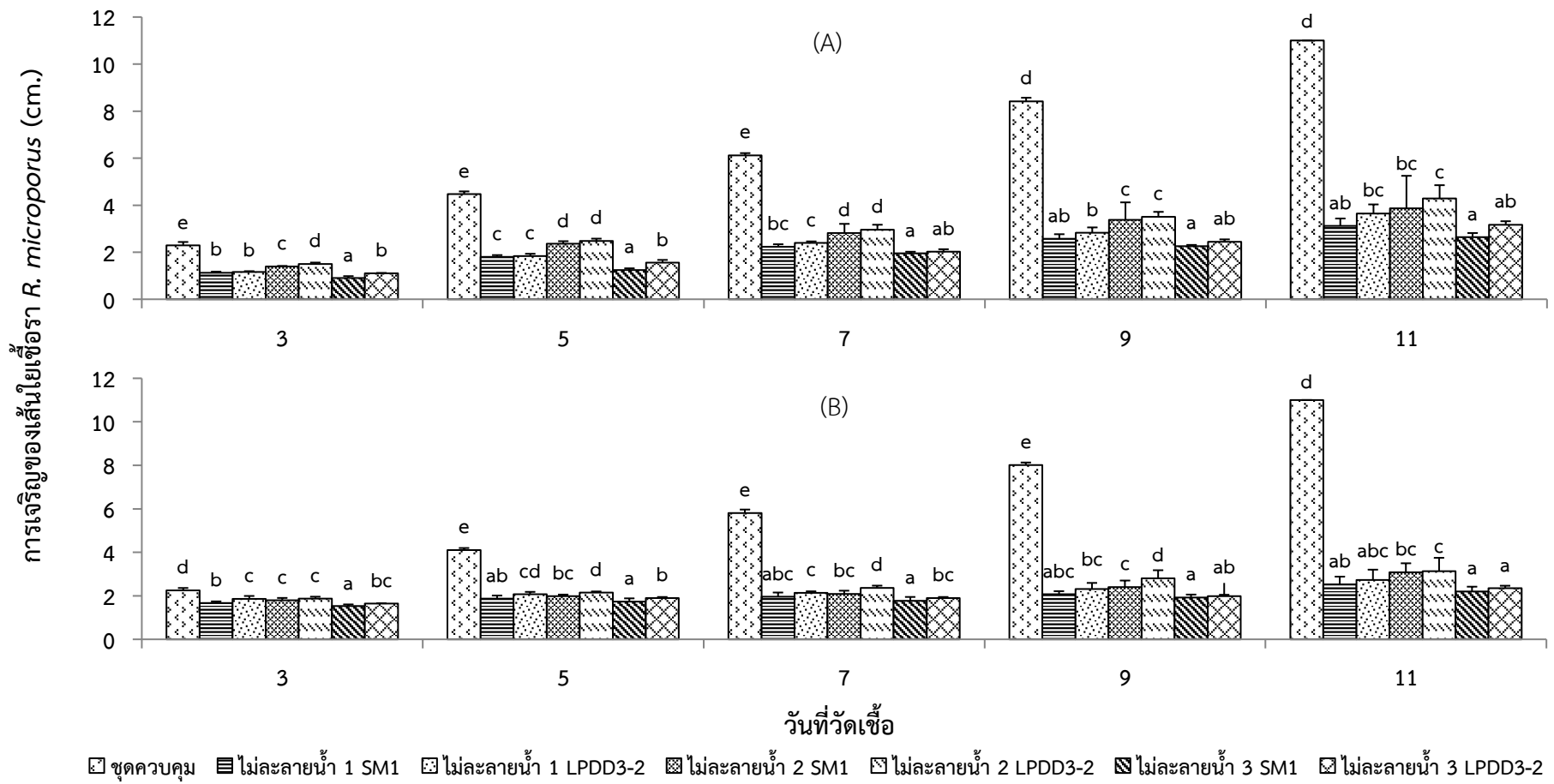
การทดลองที่ 2 การใช้ชีวภัณฑ์โดยการแบ่งใช้ที่ระดับความสูง 2, 5 และ 8 เซนติเมตร ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีที่สุดตลอดระยะเวลา 11 วัน โดยที่เวลา 11 วัน การเจริญของเส้นใยเชื้อราน้อย (2.20 เซนติเมตร) เมื่อเปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์สูตรอื่นๆ ขณะที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยที่สุดในชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 2 LPDD3-2 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) กับชุดควบคุม (ภาพที่ 22 B)

นอกจากนี้การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 มีแนวโน้มยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีกว่าไอโซเลท LPDD3-2 ทั้ง 2 วิธีการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธีการ โดยการทดลองที่ 1 ประสิทธิภาพของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* มีแนวโน้มต่ำกว่าการทดลองที่ 2 โดยตลอดระยะเวลา 11 วัน เส้นใยเชื้อราเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 0.9-4.0 เซนติเมตร และการทดลองที่ 2 อยู่ในช่วง 1.5-3.0 เซนติเมตร ทั้งนี้การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในหลอดทดลอง สำหรับการทดลองที่ 1 ชุดทดสอบ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 เส้นใยเชื้อราเจริญเติบโตได้น้อยกว่าในชุดทดสอบของไอโซเลท LPDD3-2 ซึ่งลักษณะของเส้นใยมีความหนาแน่นเจริญเติบโตขึ้นปกคลุมดิน และเจริญเติบโตได้ดีในชุดควบคุม (ภาพที่ 21 A) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 เส้นใยเชื้อราในชุดทดสอบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถเจริญเติบโตได้น้อยกว่า และเส้นใยมีขนาดเล็กและบาง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบ

*B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 ที่มีลักษณะของเส้นใยเจริญเติบโตหนาแน่น ขณะที่ชุดควบคุมเจริญเติบโตได้ปกติ (ภาพที่ 21 B)



ภาพที่ 21 การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในดินผสมที่ระยะเวลา 9 วัน (A) การทดลองที่ 1 ใช้ชีวภัณฑ์ผสมคลุกเคล้ากับดิน (B) การทดลองที่ 2 ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 2, 5 และ 8 เซนติเมตร



ภาพที่ 22 ชีวภัณฑ์ B. subtilis ไอโซเลท SM1 และ LPDD 3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา R. microporus ในดินผสม (A) การทดลองที่ 1 ใช้ชีวภัณฑ์ผสมคลุกเคล้ากับดิน (B) การทดลองที่ 2 ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 2, 5 และ 8 เซนติเมตร

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \* = มีความแตกต่างทางสถิติที่ P ≤ 0.05 จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

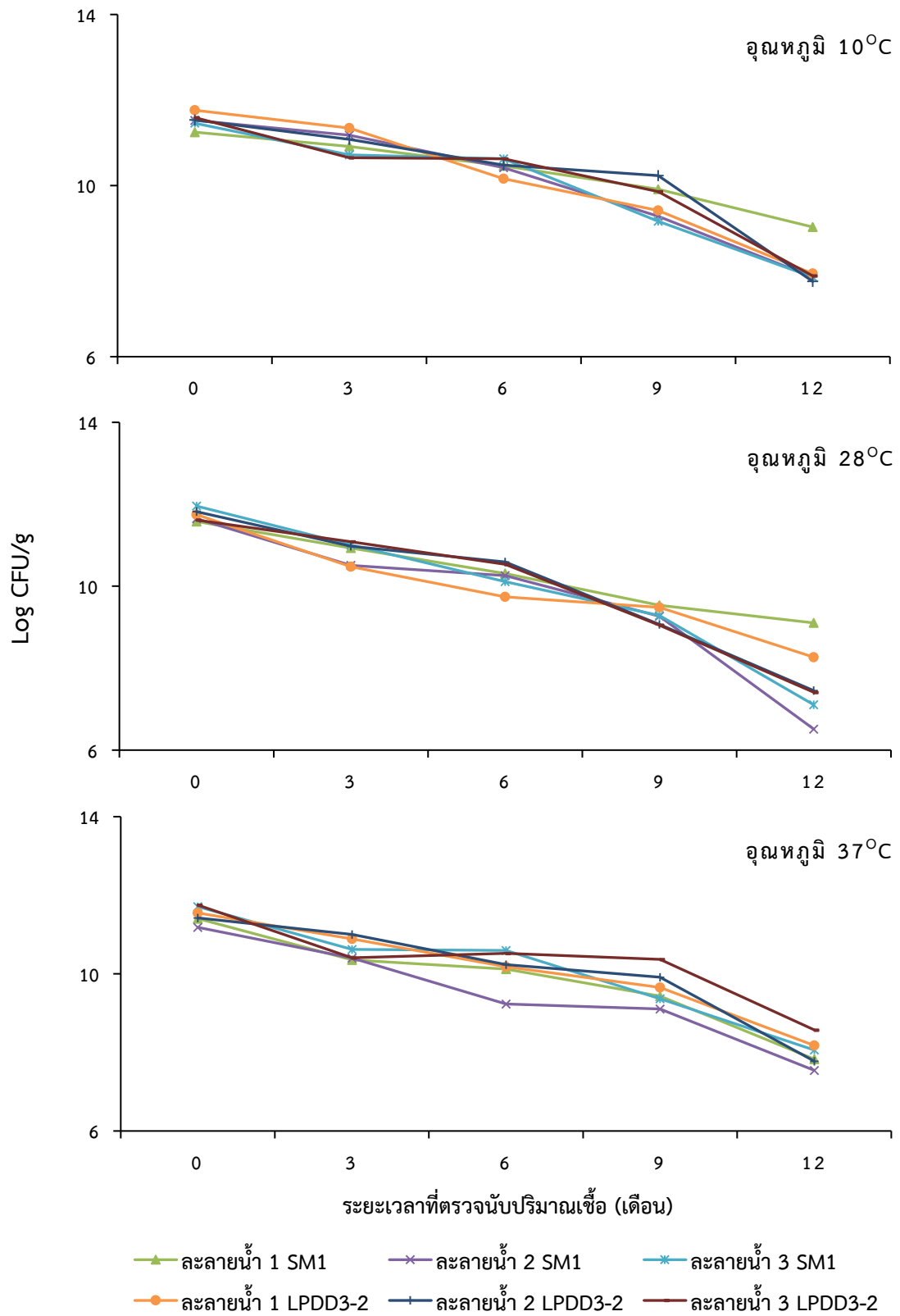
## 6. การมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ที่สภาวะต่างๆ

### 6.1 ผลภายใต้อุณหภูมิ 10, 28 และ 37 องศาเซลเซียส

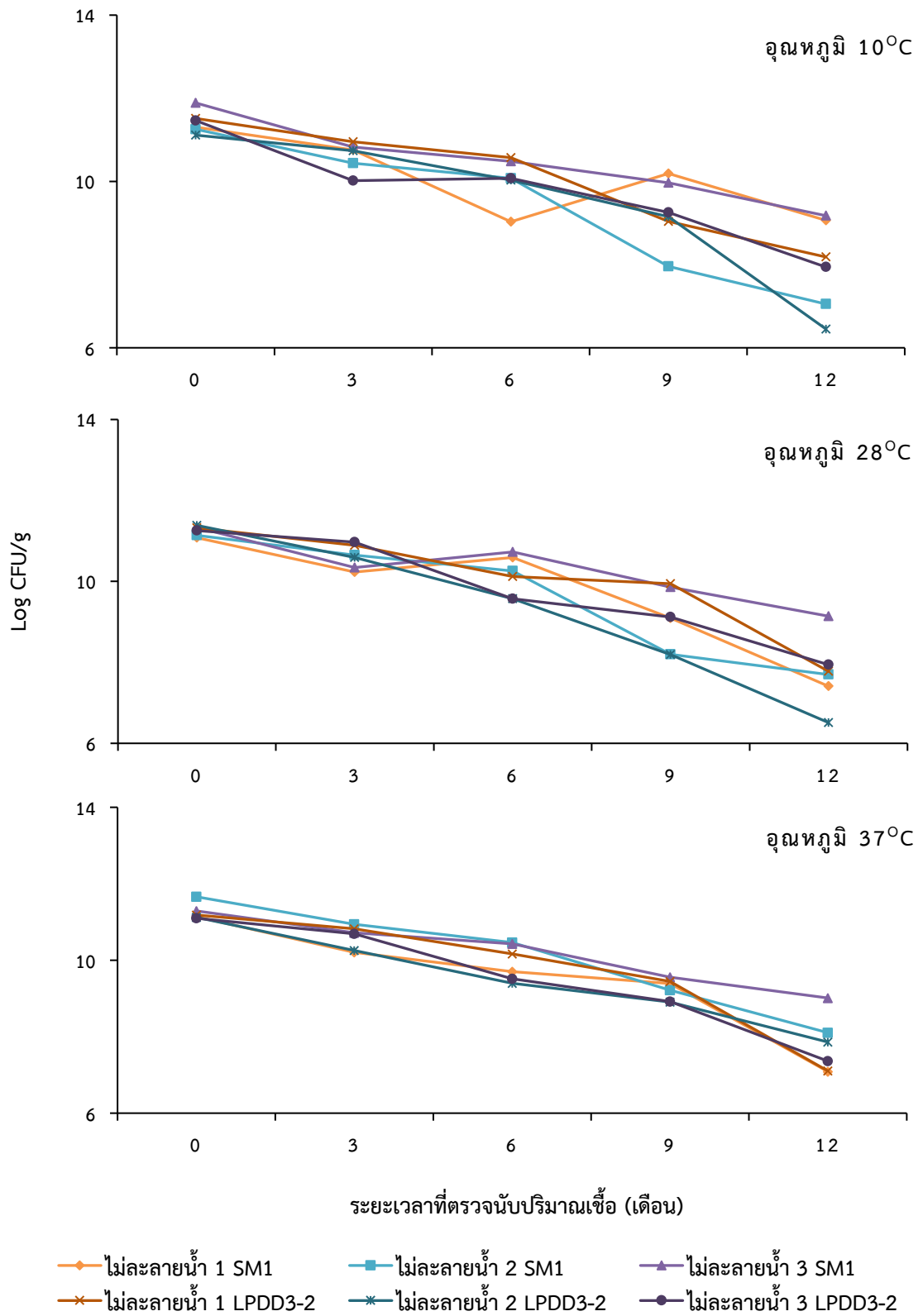
ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ทุกสูตรที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส การมีชีวิตรอดอยู่ในช่วง  $10^7$  โคโลนี ต่อกรัม และการมีชีวิตรอดสูงที่สุดในชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 ( $2.3 \times 10^9$  โคโลนี ต่อกรัม) เช่นเดียวกับการมีชีวิตรอดของ *B. subtilis* ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 การมีชีวิตรอดสูงที่สุด เท่ากับ  $1.2 \times 10^9$  โคโลนี ต่อกรัม ขณะที่การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียในสูตรอื่นๆ อยู่ในช่วง  $10^7$ - $10^8$  โคโลนี ต่อกรัม ส่วนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 3 LPDD3-2 การมีชีวิตรอดสูงที่สุด เท่ากับ  $5.7 \times 10^8$  โคโลนี ต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ทุกสูตร ไอโซเลท LPDD 3-2 มีแนวโน้มลดลงมากกว่าไอโซเลท SM1 และการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียเริ่มมีความแตกต่างกันหลังจากที่เวลา 6 เดือน โดยที่เวลา 12 เดือน การมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์ทุกสูตรมากกว่า  $10^6$  โคโลนี ต่อกรัม (ภาพที่ 23)

ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส การมีชีวิตรอดของ *B. subtilis* สูงที่สุดในสูตรไม่ละลายน้ำ 3 และสูตรไม่ละลายน้ำ 1 SM1 เท่ากับ  $1.8 \times 10^9$  และ  $1.2 \times 10^9$  โคโลนี ต่อกรัม ตามลำดับ เช่นเดียวกับการมีชีวิตรอดของ *B. subtilis* ที่อุณหภูมิ 28 และ 37 องศาเซลเซียส สูงที่สุดในชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 เท่ากับ  $1.8 \times 10^9$  และ  $1.3 \times 10^9$  โคโลนี ต่อกรัม ตามลำดับ และชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 การมีชีวิตรอดมีแนวโน้มสูงกว่าไอโซเลท LPDD3-2 ซึ่งชีวภัณฑ์ทุกสูตรและที่อุณหภูมิต่างๆ การมีชีวิตรอดแตกต่างกันหลังจากที่ระยะเวลา 6 เดือน และการมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์ทุกสูตรมากกว่า  $10^6$  โคโลนี ต่อกรัม (ภาพที่ 24)





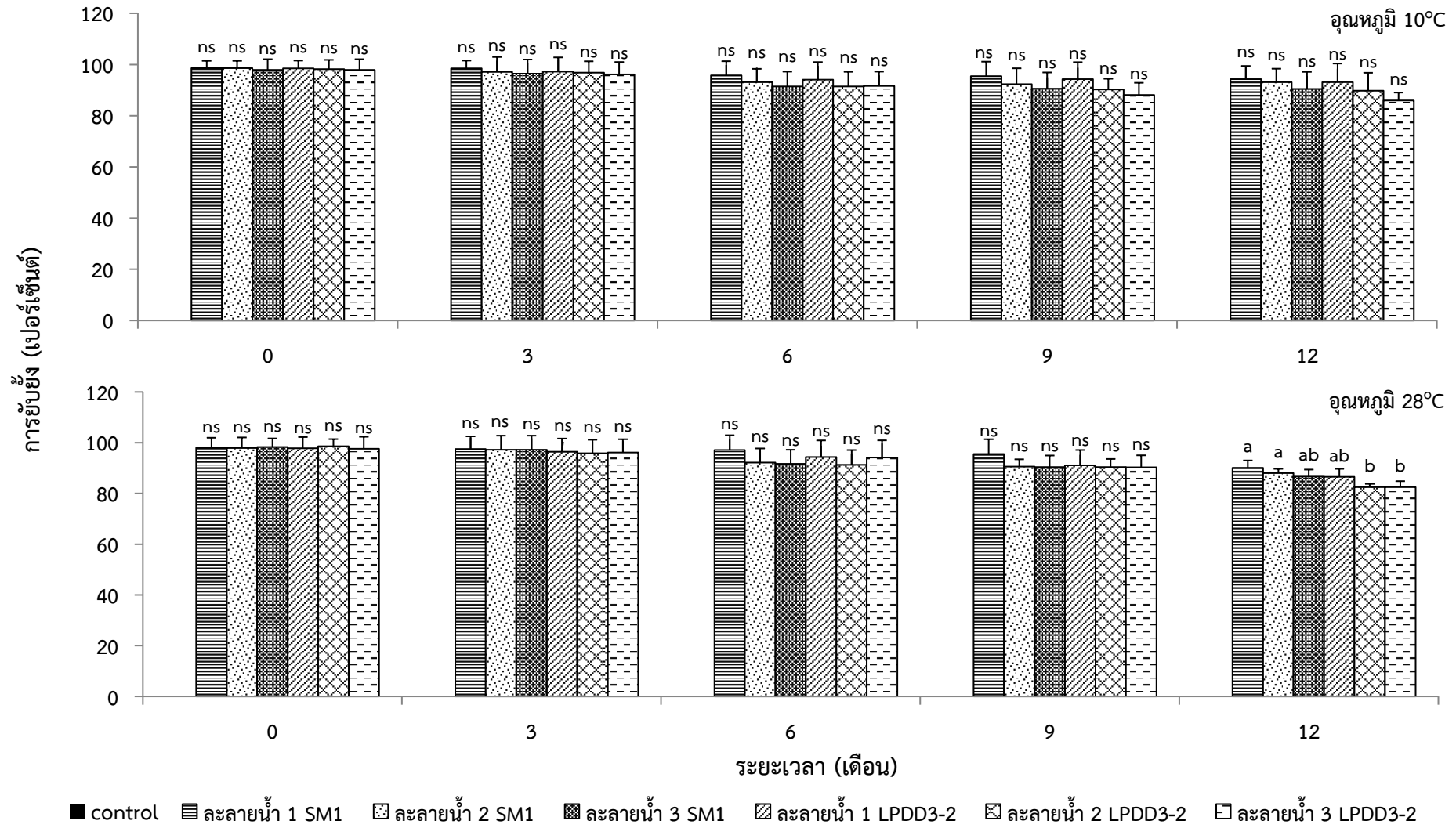
ภาพที่ 23 การมีชีวิตรอดของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 ในชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 10, 28 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน

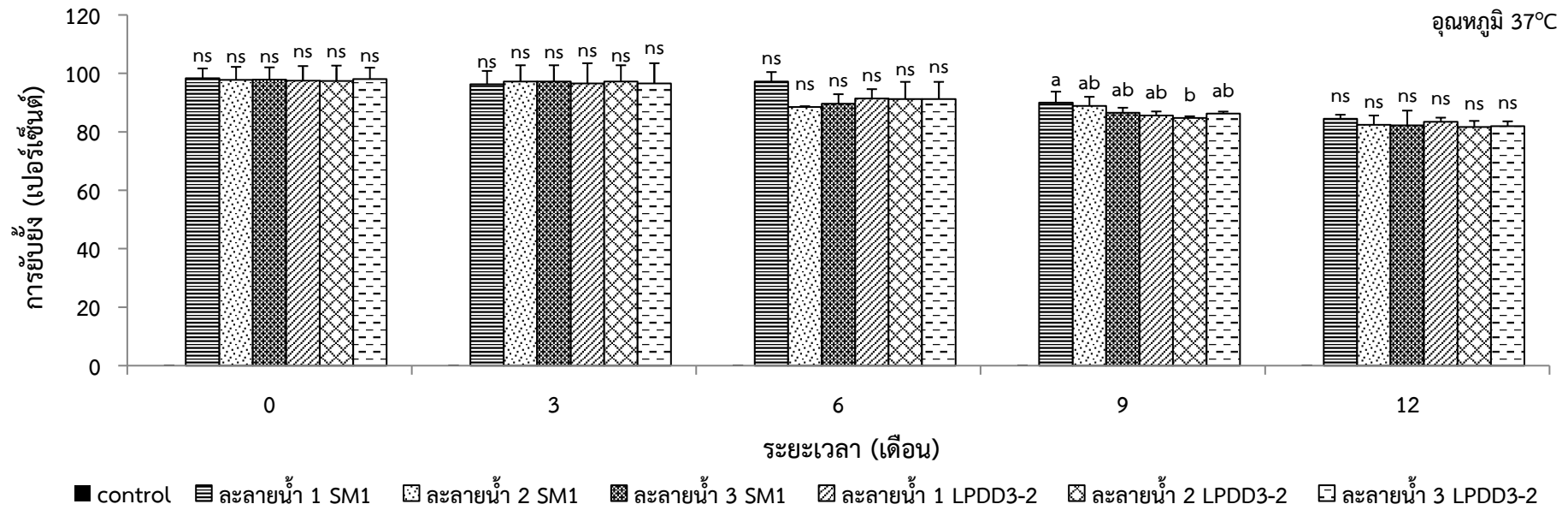


ภาพที่ 24 การมีชีวิตรอดของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD 3-2 ในชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 10, 28 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน

ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ เมื่อเก็บชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ชีวภัณฑ์ทุกสูตรสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการยับยั้งอยู่ในช่วงระหว่าง 85-98 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลา 12 เดือน แต่เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งของชีวภัณฑ์ทุกสูตร ภายในเดือนเดียวกันชีวภัณฑ์แต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) ขณะที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส การยับยั้งเส้นใยเชื้อราอยู่ในช่วง 82-98 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลา 12 เดือน โดยในเดือนที่ 12 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 และสูตรละลายน้ำ 2 SM1 ส่วนการเก็บชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลา 12 เดือน การยับยั้งเส้นใยเชื้อราอยู่ในช่วง 81-98 เปอร์เซ็นต์ โดยหลังจากระยะเวลา 6 เดือน เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของชีวภัณฑ์ทุกสูตรลดลง และในเดือนที่ 9 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* สูงที่สุดเท่ากับ 90.00 เปอร์เซ็นต์ สูตรละลายน้ำ 1 SM1 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) (ภาพที่ 25)

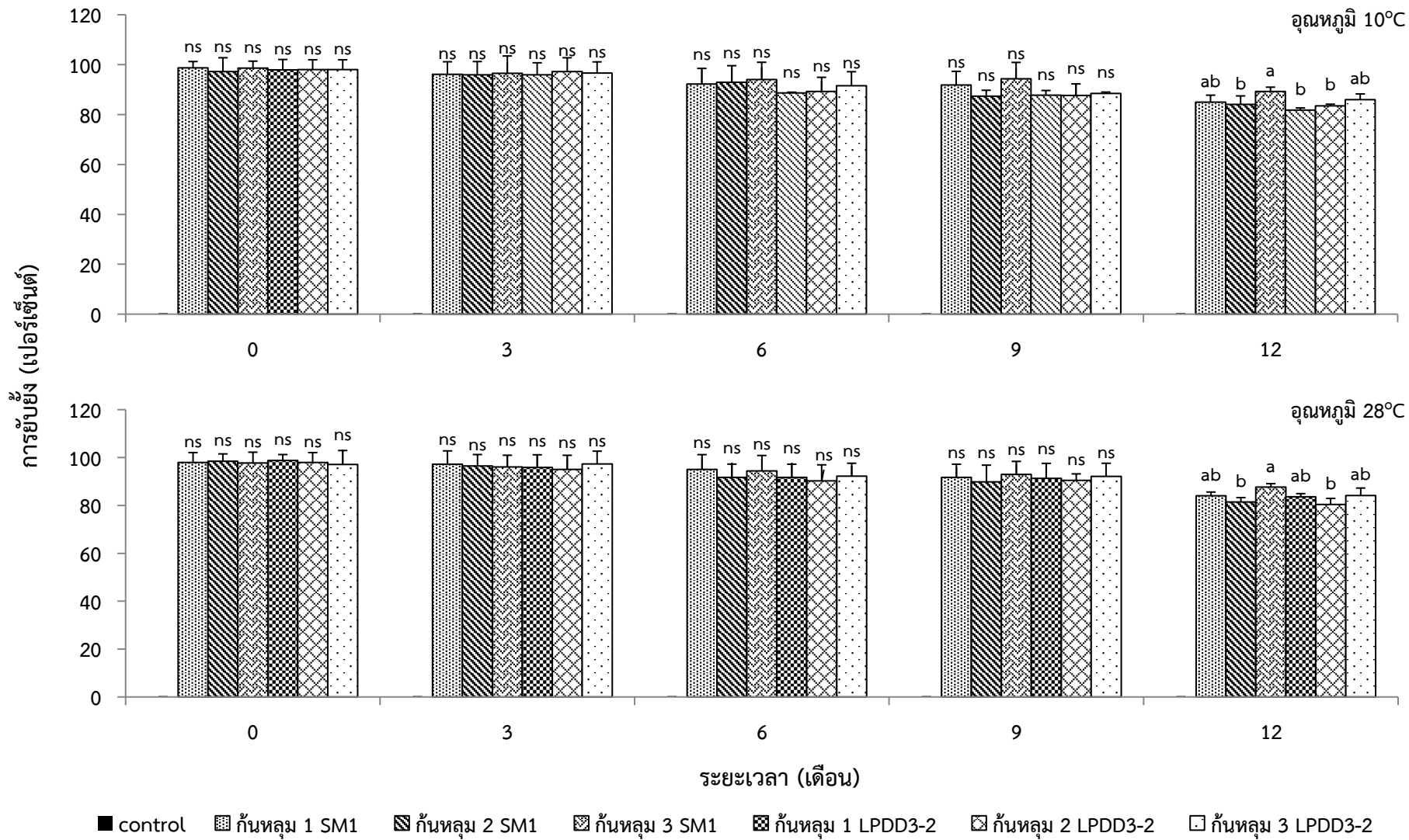
ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ เก็บชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ชีวภัณฑ์ทุกสูตรสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการยับยั้งอยู่ในช่วงระหว่าง 81-98 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลา 12 เดือน และในเดือนที่ 12 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ยับยั้งเส้นใยเชื้อราสูงที่สุด เท่ากับ 89.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 26) เช่นเดียวกันการเก็บชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราสูงที่สุด เท่ากับ 87.65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) ส่วนการเก็บชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลา 12 เดือน การยับยั้งเส้นใยเชื้อราอยู่ในช่วง 81-98 เปอร์เซ็นต์ โดยในเดือนที่ 9 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสูงที่สุดเท่ากับ 90.28 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) กับชีวภัณฑ์สูตรอื่นๆ ในขณะที่ประสิทธิภาพการยับยั้งมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 26)

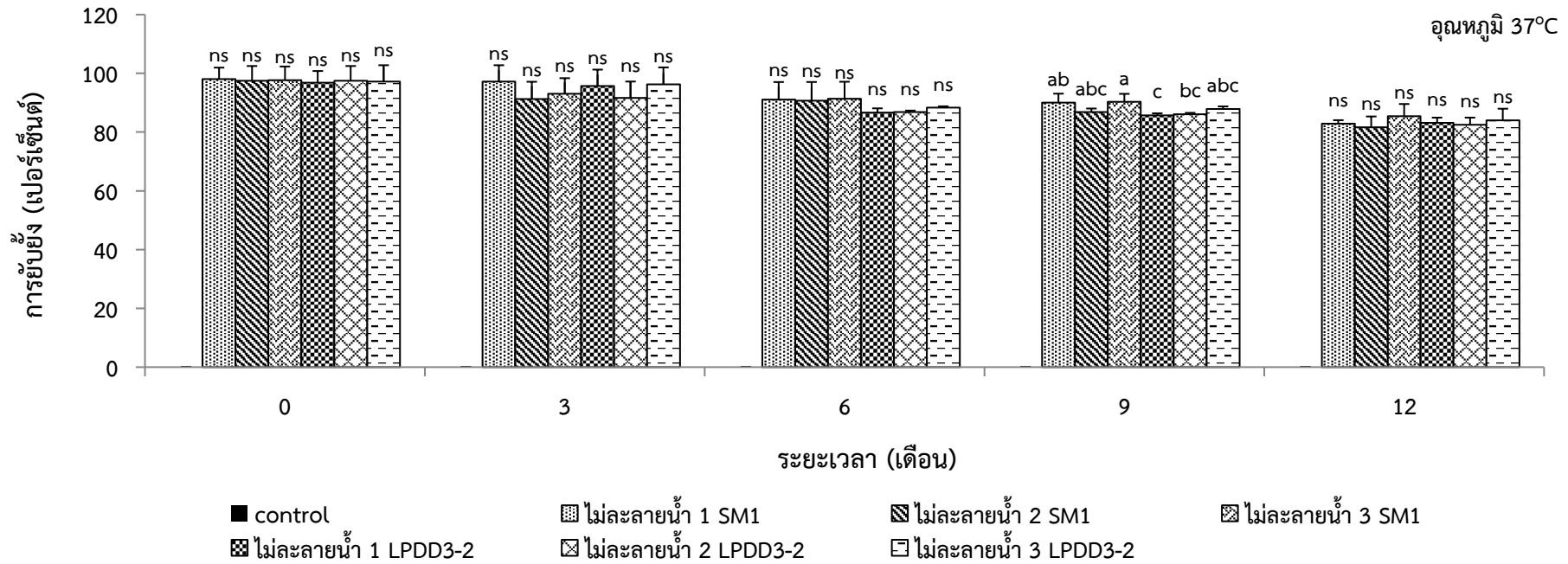




ภาพที่ 25 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD 3-2 สูตรละลายน้ำ ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 10 และ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน (ต่อ)

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแท่งเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%





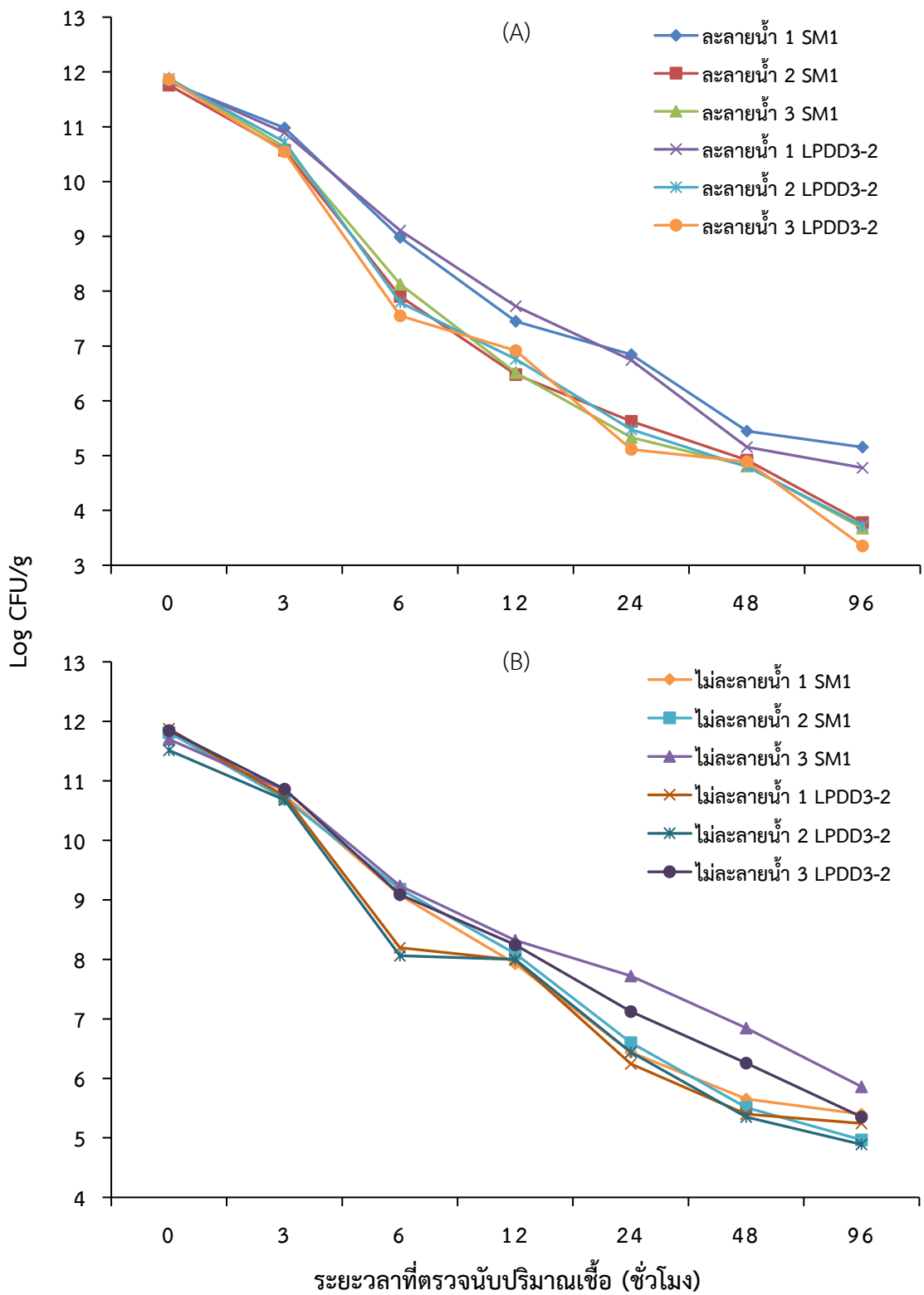
ภาพที่ 26 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD 3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 28 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน (ต่อ)  
 หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแห่งเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

## 6.2 ผลภายใต้รังสี ultraviolet C (UVC)

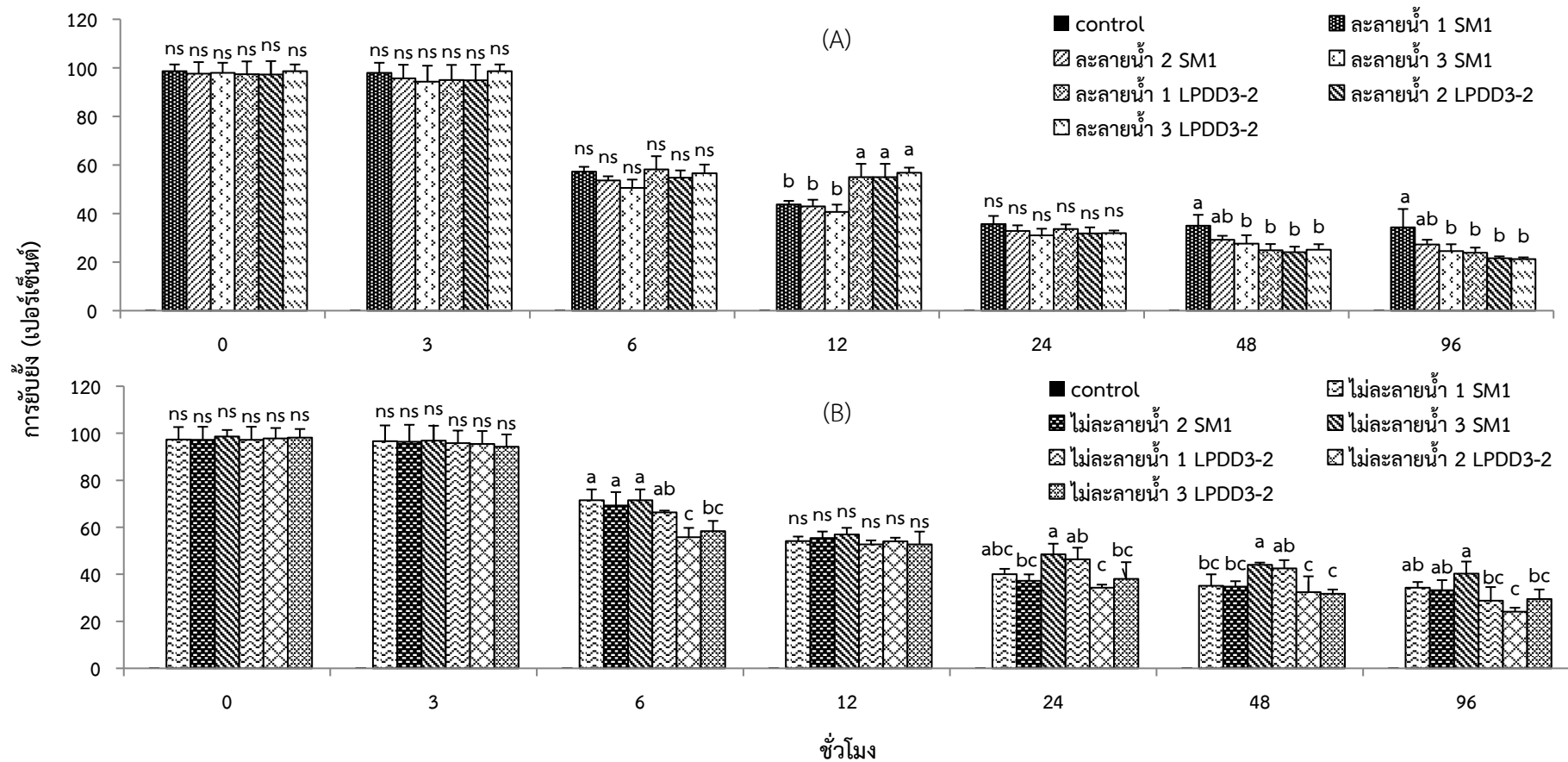
ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำทุกสูตร ปริมาณแบคทีเรียในชีวภัณฑ์เริ่มต้นมากกว่า  $10^{11}$  โคโลนี ต่อกรัม และเริ่มลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากผ่านไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง การมีชีวิตรอดของแบคทีเรีย *B. subtilis* มากกว่า  $10^3$  โคโลนี ต่อกรัม ในขณะที่แบคทีเรีย *B. subtilis* การมีชีวิตรอดสูงสุดในชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 เท่ากับ  $9.7 \times 10^4$  โคโลนี ต่อกรัม และต่ำที่สุดในชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 3 LPDD3-2 เท่ากับ  $3.5 \times 10^3$  โคโลนี ต่อกรัม (ภาพที่ 27 A) เช่นเดียวกับการมีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ เริ่มลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากผ่านไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียมากกว่า  $10^4$  โคโลนี ต่อกรัม ในขณะที่แบคทีเรีย *B. subtilis* การมีชีวิตรอดสูงสุดในชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 เท่ากับ  $9.2 \times 10^5$  โคโลนี ต่อกรัม และต่ำที่สุดในชีวภัณฑ์สูตร ไม่ละลายน้ำ 2 LPDD3-2 เท่ากับ  $9.0 \times 10^4$  โคโลนี ต่อกรัม การมีชีวิตรอดลดลงเมื่อใช้ระยะเวลามากขึ้น (ภาพที่ 27 B)

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* เพอร์เซ็นต์การยับยั้งเริ่มต้นและที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) แต่ชีวภัณฑ์ทุกสูตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลงมากเมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง สำหรับชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ แบคทีเรียสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* สูงที่สุดในชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 เท่ากับ 35.00 และ 34.30 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 28 A) ส่วนชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ แบคทีเรียสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* สูงที่สุดในชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 เท่ากับ 48.47, 44.03 และ 40.28 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 96 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์สูตรอื่นๆ ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราน้อยกว่า ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) โดยที่ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมีแนวโน้มสูงกว่าในชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ (ภาพที่ 28 B)





ภาพที่ 27 การมีชีวิตรอดของ *B. subtilis* ไอโซเลต SM1 และไอโซเลต LPDD3-2 ภายใต้สภาวะที่มีรังสี UVC เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (A) สูตรละลายน้ำ (B) สูตรไม่ละลายน้ำ

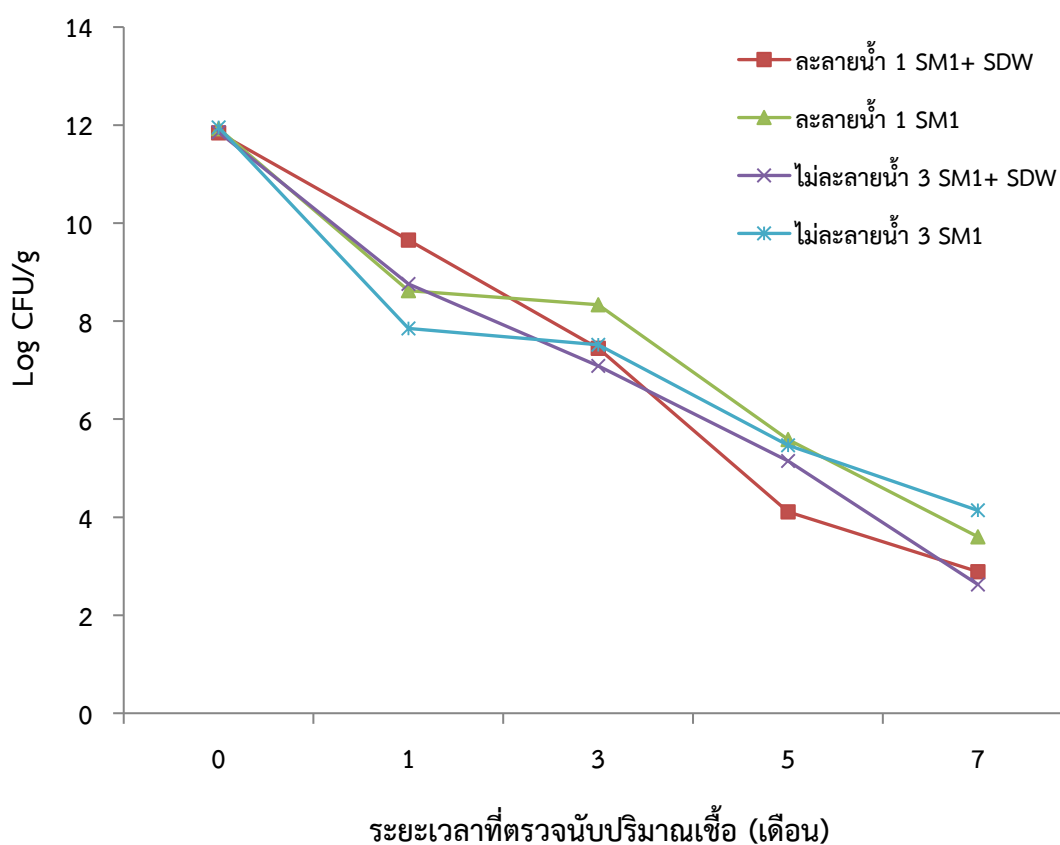


ภาพที่ 28 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD 3-2 ภายใต้สภาพที่มีรังสี UVC เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* (A) สูตรละลายน้ำ (B) สูตรไม่ละลายน้ำ

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

## 7. การมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ในดินปลูกยางพารา

ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพ และคัดเลือกสูตรที่มีประสิทธิภาพสูง จำนวน 2 สูตร คือ สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ทดสอบการมีชีวิตรอดในดิน ในสภาวะที่ควบคุมและไม่ควบคุมความชื้น ปริมาณของแบคทีเรีย *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 เริ่มต้น เท่ากับ  $8.5 \times 10^{11}$  โคโลนี ต่อกรัม และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 เริ่มต้น เท่ากับ  $9.0 \times 10^{11}$  โคโลนี ต่อกรัม ตามลำดับ และตรวจนับปริมาณเชื้อที่ 1, 3, 5 และ 7 เดือน ซึ่งปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ลดลงตั้งแต่เดือนที่ 1 ที่มีการใช้ชีวภัณฑ์ลงในดิน และลดลงต่อเนื่องเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น โดยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 ที่มีการเติมน้ำกลั่นเพื่อรักษาความชื้นในดิน 50 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้ปริมาณแบคทีเรียมีชีวิตรอดสูง เท่ากับ  $6.5 \times 10^9$  โคโลนี ต่อกรัม ซึ่งสูงกว่าในกรรมวิธีอื่นๆ และในช่วง 2 เดือนแรก การมีชีวิตรอดต่ำสุดในชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ที่ไม่มีการควบคุมความชื้นในดิน แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 เดือน การมีชีวิตรอดของแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ยังคงลดลงต่อเนื่อง ในขณะที่เดือนที่ 7 กรรมวิธีที่ไม่มีการควบคุมความชื้น การมีชีวิตรอดสูงที่สุดในชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 เท่ากับ  $1.4 \times 10^4$  โคโลนี ต่อกรัม (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 29 การมีชีวิตรอดของแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ในดินปลูกยางพารา เป็นระยะเวลา 7 เดือน

### 8. ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการงอกของรากและการเจริญเติบโตของยางพารา

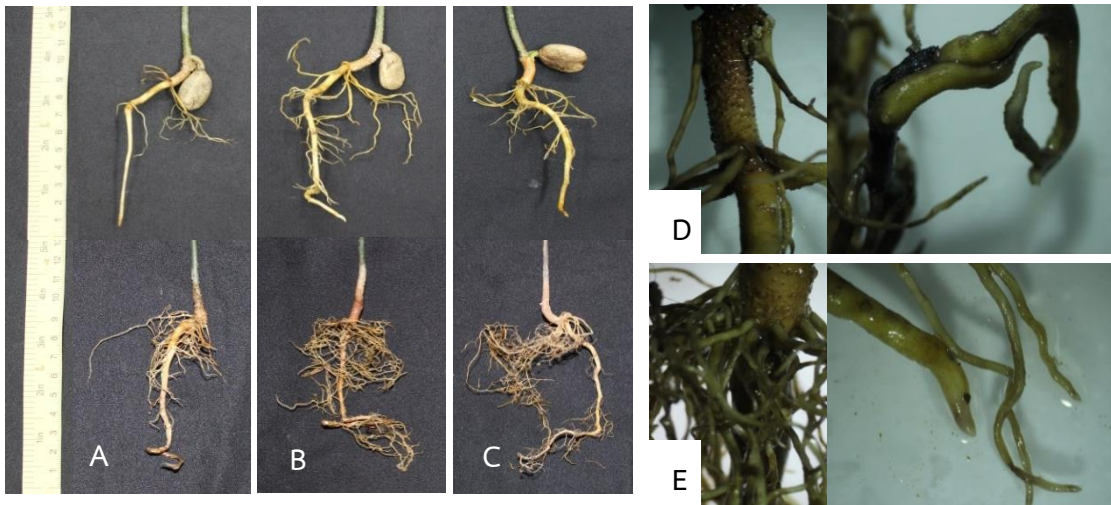
การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 เป็นระยะเวลา 40 วัน การงอกของรากและการเจริญเติบโตของยางพาราเปลี่ยนแปลง ดังนี้

ความยาวรากแก้ว การใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 ทำให้ความยาวรากแก้วเพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ตลอดระยะเวลา 40 วัน โดยชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 ความยาวรากแก้วเพิ่มขึ้นเท่ากับ 20.56 เซนติเมตร และชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 เท่ากับ 18.11 เซนติเมตร ซึ่งความยาวรากแก้วเพิ่มขึ้น 6 เซนติเมตร และ 4 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใช้ชีวภัณฑ์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) นอกจากนี้ทำให้ปริมาณรากฝอยเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

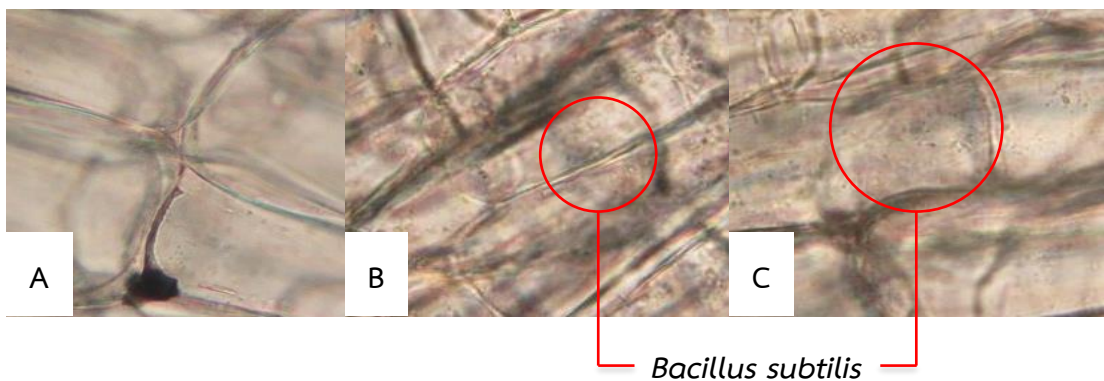
ความสูงของต้นยางพารา ที่ระยะเวลา 10 และ 20 วัน การใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) กับชุดควบคุม แต่ความสูงของต้นยางพาราที่ระยะเวลา 30 และ 40 วัน ของการใช้ชีวภัณฑ์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )

น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน การใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 ทำให้น้ำหนักสดส่วนเหนือดินเพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ตลอดระยะเวลา 40 วัน เช่นเดียวกับกับน้ำหนักสดทั้งต้น จึงมีผลให้น้ำหนักแห้งทั้งต้นเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใช้ชีวภัณฑ์ (ตารางที่ 14 และ 15)

ทั้งนี้ลักษณะของยางพารายังคงมีความสมบูรณ์ โดยรากแก้วมีขนาดใหญ่ขึ้น มีความแข็งแรง และปริมาณรากฝอยมากกว่า และรากมีสีขาวเหลือง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใช้ชีวภัณฑ์ เป็นไปในลักษณะเดียวกันเมื่อนำรากไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ พบว่ารากมีความแข็งแรงโดยเฉพาะบริเวณปลายรากมีลักษณะที่สมบูรณ์ไม่แสดงอาการรากเน่า (ภาพที่ 30) นอกจากนี้เมื่อตัดปลายรากแก้วของยางพาราที่มีการใช้และไม่ใช้ชีวภัณฑ์ มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา ภายในเซลล์รากแก้วของยางพารา พบการเข้าอาศัยของเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ ในขณะที่ชุดควบคุมไม่มีลักษณะดังกล่าว (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 30 ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของยางพารา ที่ระยะเวลา 10 และ 40 วัน และภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ (A) ชุดควบคุม (B) สูตรละลายน้ำ 1 SM1 (C) สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 (D) การเจริญของ รากแก้ว และรากฝอยชุดควบคุม (E) การเจริญของรากแก้วและรากฝอยชุดทดสอบ สูตรละลายน้ำ 1 SM1



ภาพที่ 31 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในเซลล์รากแก้วของยางพารา ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 100 เท่า (A) ชุดควบคุม (B) สูตรละลายน้ำ 1 SM1 (C) สูตร ไม่ละลายน้ำ 3 S

ตารางที่ 14 การงอกของรากและการเจริญเติบโตของยางพาราเมื่อใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1

กรรมวิธี	การเจริญเติบโตของยางพารา							
	ความยาวราก (cm.)				จำนวนใบ			
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
Control (ไม่ใช้ชีวภัณฑ์)	10.17±1.52b	12.22±3.38b	14.11±1.90b	14.78±2.10c	5.56±1.01b	7.56±1.94	7.67±2.12	8.00±2.55
ละลายน้ำ 1 SM1	12.17±1.98a	16.11±2.67a	18.00±2.78a	20.56±1.33a	7.00±1.50a	9.00±1.32	9.67±3.61	10.89±4.46
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1	11.33±1.22ab	15.67±3.94a	17.78±4.15a	18.11±1.96b	7.67±1.58a	8.67±2.24	8.89±3.52	10.00±2.74
T-test	*	*	*	*	*	ns	ns	ns
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	14.32	22.92	18.59	10.30	20.71	22.30	36.09	34.99
กรรมวิธี	ความสูงต้น (cm.)				น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน (g plant <sup>-1</sup> )			
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
Control (ไม่ใช้ชีวภัณฑ์)	27.83±3.86	30.00±2.40	32.22±8.42b	33.78±2.33b	24.48±1.12c	28.66±0.81c	29.11±0.70c	31.30±0.80c
ละลายน้ำ 1 SM1	29.00±6.58	35.22±4.68	40.33±6.82a	45.67±7.53a	30.32±0.75a	34.59±0.71a	40.41±0.78a	45.06±0.72a
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1	28.67±5.17	31.33±8.14	39.56±5.03a	42.06±6.16a	28.37±0.60b	32.39±0.71b	36.09±0.70b	42.90±0.83b
T-test	ns	ns	*	*	*	*	*	*
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	18.66	17.38	18.44	14.26	3.08	2.34	2.07	0.20

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \* = มีความแตกต่างทางสถิติที่ P ≤ 0.05  
จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 15 การงอกของรากและการเจริญเติบโตของยางพาราเมื่อใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1

กรรมวิธี	การเจริญเติบโตของยางพารา							
	น้ำหนักสดทั้งต้น (g plant <sup>-1</sup> )				น้ำหนักแห้งทั้งต้น (g plant <sup>-1</sup> )			
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
Control (ไม่ใช่ชีวภัณฑ์)	37.88±1.12c	42.80±0.81c	43.58±0.70c	45.37±0.78c	7.01±0.50c	7.38±0.64c	8.17±0.68c	10.09±0.51c
ละลายน้ำ 1 SM1	48.94±0.60a	54.51±0.71a	66.71±0.78a	71.77±0.73a	10.40±0.52a	11.44±0.50a	14.35±0.89a	17.40±1.12a
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1	44.54±0.75b	49.00±0.71b	58.14±0.70b	70.38±0.82b	9.18±0.52b	10.08±0.47b	11.96±0.53b	14.41±0.49b
T-test	*	*	*	*	*	*	*	*
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	1.92	1.53	1.30	1.25	5.80	5.90	6.23	5.49

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \* = มีความแตกต่างทางสถิติที่ P ≤ 0.05  
จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

## 9. ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการเจริญเติบโตของยางพาราในโรงเรือนทดลอง

การเจริญเติบโตของต้นยางพาราเมื่อใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ร่วมกับสูตรละลายน้ำ 1 SM1 การเจริญเติบโตของยางพาราเปลี่ยนแปลง ดังนี้

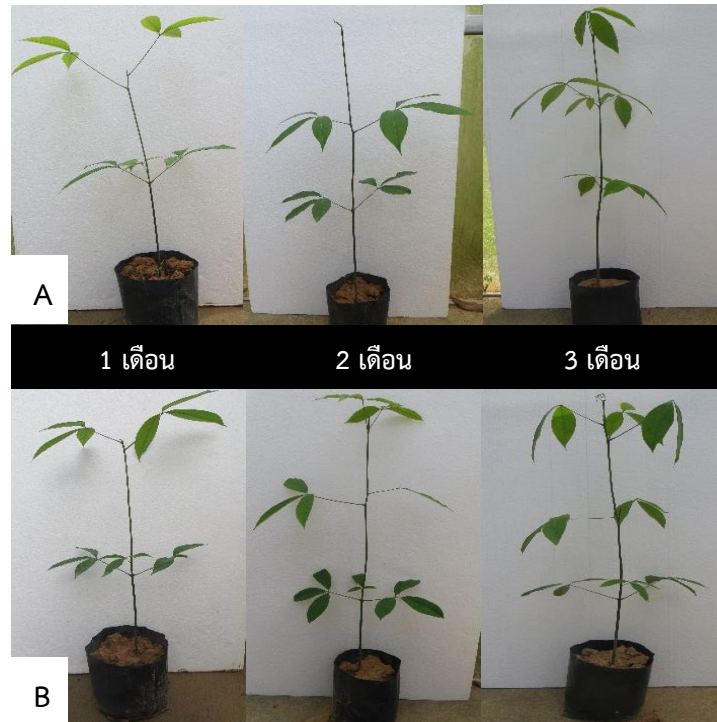
ความยาวรากแก้ว การใช้ชีวภัณฑ์ที่ระยะเวลา 3 เดือน ทำให้ความยาวรากแก้วของยางพาราเพิ่มขึ้น เท่ากับ 33.31 เซนติเมตร ซึ่งมากกว่าชุดควบคุม 3 เซนติเมตร และความยาวรากแก้วเพิ่มขึ้นทุกๆ เดือน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใช้ชีวภัณฑ์ นอกจากนี้ปริมาณของรากฝอยเพิ่มขึ้น และมีความยาวรากมากกว่าชุดควบคุม

ความสูงของต้นยางพาราภายในเดือนแรกของการใช้ชีวภัณฑ์ ไม่มีความแตกต่างกัน และความสูงต้นยางพาราเริ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) กับชุดควบคุมในเดือนที่ 2 และ 3 โดยในเดือนที่ 3 ความสูงของต้นยางพารา เท่ากับ 74.31 เซนติเมตร ขณะที่ชุดควบคุม เท่ากับ 67.53 เซนติเมตร เช่นเดียวกันการใช้ชีวภัณฑ์ทำให้จำนวนใบยางพาราเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุม

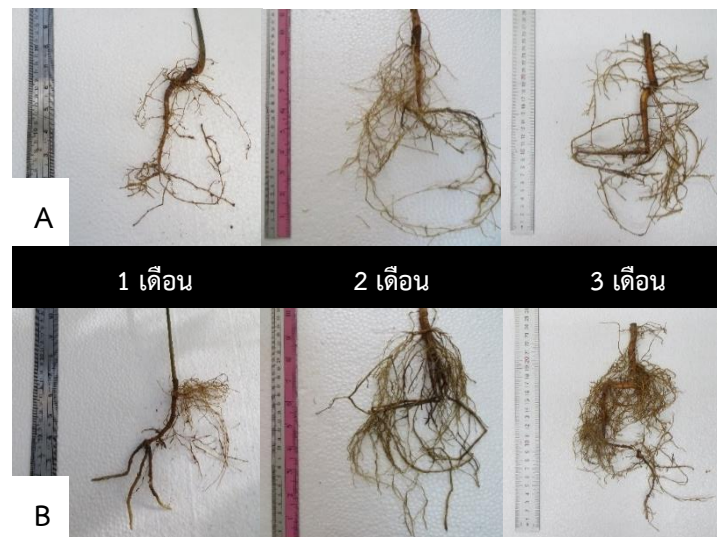
น้ำหนักสดส่วนเหนือดินของยางพาราเพิ่มขึ้นเมื่อมีการใช้ชีวภัณฑ์ โดยน้ำหนักเริ่มมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจนในเดือนที่ 2 และ 3 โดยในเดือนที่ 3 น้ำหนักสดส่วนเหนือดินเท่ากับ 16.60 กรัม ต่อต้น ในขณะที่ชุดควบคุมเท่ากับ 14.89 กรัม ต่อต้น และเมื่อรวมน้ำหนักสดทั้งต้น ทำให้น้ำหนักเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุม เช่นเดียวกับกับน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินของยางพาราในเดือนแรกของการใช้ชีวภัณฑ์ ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม และเริ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) ในเดือนที่ 2 และ 3 โดยในเดือนที่ 3 การใช้ชีวภัณฑ์ทำให้น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินของยางพาราเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุม (ตารางที่ 16)

เมื่อสังเกตต้นยางพาราที่มีการใช้ชีวภัณฑ์ช่วงระยะเวลา 1 เดือน ต้นยางพารามีความสูง และจำนวนใบ ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม แต่การใช้ชีวภัณฑ์ทำให้ใบยางพารามีสีเขียวเข้ม และขนาดของใบใหญ่กว่าชุดควบคุม และในเดือนที่ 2 การเจริญเติบโตของต้นยางพาราเริ่มมีความแตกต่างกับชุดควบคุม ซึ่งเห็นได้จากการแตกยอดและใบของฉัตรที่ 3 โดยที่ระยะเวลา 3 เดือน เริ่มมีการแตกยอดของฉัตรที่ 4 ขณะที่ชุดควบคุมการเจริญเติบโตของต้นอยู่ในฉัตรที่ 3 (ภาพที่ 32) และการใช้ชีวภัณฑ์ทำให้ปริมาณรากฝอยเพิ่มขึ้นและยาวขึ้น โดยเฉพาะรากแก้วมีการแตกแขนงส่วนในเดือนที่ 3 ต้นยางพาราเจริญเติบโตแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างชัดเจนทั้งปริมาณของราก ความยาวราก (ภาพที่ 33) และลักษณะของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ รากแก้วมีการแตกแขนง โดยการเจริญของรากมีขนาดใกล้เคียงกัน ในขณะที่รากแก้วของชุดควบคุมไม่มีการแตกแขนงดังกล่าว ส่วนรากฝอยของชุดควบคุมมีขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบที่มีความแข็งแรง สมบูรณ์ และปรายรากมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 34)





ภาพที่ 32 การเจริญเติบโตของต้นยางพาราเมื่อใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ร่วมกับสูตรละลายน้ำ 1 SM1 (A) ต้นยางพาราชุดควบคุม อายุ 1, 2 และ 3 เดือน (B) ต้นยางพาราชุดทดสอบ อายุ 1, 2 และ 3 เดือน



ภาพที่ 33 ลักษณะรากของยางพาราเมื่อใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ร่วมกับสูตรละลายน้ำ 1 SM1 (A) รากของชุดควบคุม อายุ 1, 2 และ 3 เดือน (B) รากของชุดทดสอบอายุ 1, 2 และ 3 เดือน



ภาพที่ 34 ลักษณะรากของยางพาราเมื่อใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ร่วมกับละลายน้ำ 1 SM1 ที่ระยะเวลา 3 เดือน ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ (A) รากแก้วชุดควบคุม (B) รากฝอยชุดควบคุม (C) รากแก้วชุดทดสอบ (D) รากฝอยของชุดทดสอบ

ตารางที่ 16 ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ต่อการเจริญเติบโตของยางพาราในโรงเรือนทดลอง

ข้อมูลการเจริญเติบโต	กรรมวิธี	เดือน			T-test	C.V. (%)
		1	2	3		
ความสูงต้น (cm.)	Control (ไม่ใช้ชีวภัณฑ์)	50.35 c	58.25 bc	67.53 ab	**	16.52
	ไม่ละลายน้ำ 3+ละลายน้ำ 1	52.74 c	66.19 ab	74.31 a		
ความยาวราก (cm.)	Control (ไม่ใช้ชีวภัณฑ์)	13.41 c	28.19 b	30.44 ab	**	19.29
	ไม่ละลายน้ำ 3+ละลายน้ำ 1	16.53 c	32.13 ab	33.31 a		
จำนวนใบ (ใบ)	Control (ไม่ใช้ชีวภัณฑ์)	16.88 b	16.63 b	17.66 b	**	18.37
	ไม่ละลายน้ำ 3+ละลายน้ำ 1	16.19 b	18.31 ab	21.06 a		
น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน (g plant <sup>-1</sup> )	Control (ไม่ใช้ชีวภัณฑ์)	8.76 c	13.73 b	14.89 ab	**	21.40
	ไม่ละลายน้ำ 3+ละลายน้ำ 1	10.24 c	15.19 ab	16.60 a		
น้ำหนักสดทั้งต้น (g plant <sup>-1</sup> )	Control (ไม่ใช้ชีวภัณฑ์)	13.09 c	21.39 b	24.20 ab	**	20.84
	ไม่ละลายน้ำ 3+ละลายน้ำ 1	16.32 c	23.04 ab	26.24 a		
น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน (g plant <sup>-1</sup> )	Control (ไม่ใช้ชีวภัณฑ์)	2.92 d	4.37 c	5.72 ab	**	18.49
	ไม่ละลายน้ำ 3+ละลายน้ำ 1	2.95 d	5.11 bc	6.24 a		
น้ำหนักแห้งทั้งต้น (g plant <sup>-1</sup> )	Control (ไม่ใช้ชีวภัณฑ์)	3.74 c	7.20 b	8.99 a	**	19.49
	ไม่ละลายน้ำ 3+ละลายน้ำ 1	3.78 c	7.42 b	9.39 a		

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

เมื่อนำดินไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารและสมบัติทางเคมีของดินหลังจากการใช้ชีวภัณฑ์ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดินที่เหมาะสมอยู่ในช่วงระหว่าง 4.5-5.5 (ตารางที่ 17) ซึ่งจากผลวิเคราะห์ดินมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เป็นกลาง ขณะที่ค่าสภาพการนำไฟฟ้าไม่มีความแตกต่างกัน และความสามารถในการแลกเปลี่ยนแคตไอออนในดินทุกกรรมวิธีเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

ปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งหมดในดินตลอดระยะเวลา 3 เดือน มีปริมาณต่ำกว่าช่วงที่เหมาะสม (1.1-2.5) (ตารางที่ 17) แต่การใช้ชีวภัณฑ์ทำให้ปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งหมดในดินมีแนวโน้มสูงขึ้น และลดลงต่อเนื่องเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ขณะที่ชุดควบคุมลดลงน้อยกว่าชุดทดสอบ และฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินของชุดทดสอบที่มีการใช้ชีวภัณฑ์อยู่ในช่วงที่เหมาะสม (11-30) โดยการใช้ชีวภัณฑ์ทำให้ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์ดินก่อนการทดลอง (ตารางที่ 17) และมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกๆเดือนมากที่สุดในเดือนที่ 3 เท่ากับ 21.59 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่ปริมาณของโพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน ปริมาณธาตุอาหารลดลงจากเดือนแรก ซึ่งชุดทดสอบมีปริมาณของธาตุอาหารน้อยกว่าในชุดควบคุม

ปริมาณของเหล็ก คอปเปอร์ สังกะสี และแมงกานีส ค่อยๆ ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) กับชุดควบคุม (ตารางที่ 18)

นอกจากนี้ความเข้มข้นของธาตุอาหารในต้นยางพาราส่วนเหนือดิน โดยในชุดทดสอบที่มีการใช้ชีวภัณฑ์ ทำให้ค่าความเข้มข้นของธาตุอาหารทุกธาตุในต้นยางพาราสูงกว่าชุดควบคุม และค่าความเข้มข้นของธาตุอาหารแต่ละธาตุในต้นยางพาราชุดทดสอบ สูงที่สุดในเดือนที่ 3 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) กับชุดควบคุม โดยความเข้มข้นของธาตุอาหารในต้นยางพาราสูงขึ้นทุกๆ เดือน จึงมีผลให้ปริมาณธาตุอาหารในดินลดลงต่อเนื่อง ในขณะที่ความเข้มข้นของแมงกานีส ในชุดทดสอบที่ใช้ชีวภัณฑ์ทำให้ความเข้มข้นของแมงกานีสเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับธาตุอาหารตัวอื่นๆ (ตารางที่ 19) และค่าความเข้มข้นในต้นยางพาราส่วนเหนือดินมีความสัมพันธ์กับค่าการดูดใช้ธาตุอาหาร โดยต้นยางพาราที่มีปริมาณความเข้มข้นของธาตุอาหารสูงจึงมีค่าการดูดใช้ที่สูง และสูงที่สุดในเดือนที่ 3 ที่มีการใช้ชีวภัณฑ์ โดยค่าการดูดใช้มีความแตกต่างอย่างชัดเจนในธาตุอาหารหลัก คือ ธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักที่พืชดูดใช้ปริมาณมากเพื่อการเจริญเติบโต (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 17 ผลวิเคราะห์ดินก่อนการทดลอง

พารามิเตอร์	ผลวิเคราะห์	ช่วงที่เหมาะสม
pH (1 : 5)	5.45	4.5-5.5
Total N (g kg <sup>-1</sup> )	0.29	1.1-2.5
Avai. P (mg kg <sup>-1</sup> )	9.61	11-30
Exch. K (mg kg <sup>-1</sup> )	21.73	> 40
Exch. Ca (mg kg <sup>-1</sup> )	16.51	> 60
Exch. Mg (mg kg <sup>-1</sup> )	6.62	> 36
Extr. Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	4.22	2-4
Extr. Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	1.00	0.4-0.6
Extr. Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	54.34	30-35
Extr. Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	0.37	0.8-1.0

หมายเหตุ : เปรียบเทียบกับระดับธาตุอาหารพืชที่เหมาะสมในดินปลูกยางพาราของนุชนารถ (2554)

ตารางที่ 18 ปริมาณธาตุอาหารและสมบัติทางเคมีของดินหลังการใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ต่อการเจริญเติบโตของยางพาราในโรงเรือนทดลอง

เดือน	กรรมวิธี	pH	EC (1:5)	CEC	Total. N	Avai. P	Extr. K
		(ดิน:น้ำ = 1:5)	(dS m <sup>-1</sup> )	(cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	(g kg <sup>-1</sup> )	(mg kg <sup>-1</sup> )	(mg kg <sup>-1</sup> )
1	ชุดควบคุม	4.80±0.12b	1.47±0.01	4.73±0.08ab	0.87±0.12a	7.70±0.23c	25.77±0.29a
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	5.15±0.06a	1.47±0.02	4.78±0.60a	0.74±0.19a	10.87±2.98bc	24.95±0.68b
2	ชุดควบคุม	5.05±0.06a	1.48±0.03	4.36±0.10ab	0.78±0.11a	7.27±0.13c	25.21±0.79ab
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	5.13±0.10a	1.49±0.01	4.48±0.66ab	0.61±0.20b	14.14±4.06b	24.75±0.84b
3	ชุดควบคุม	5.10±0.05a	1.48±0.01	3.86±0.10b	0.59±0.31b	6.17±0.09c	24.94±7.27b
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	5.05±0.06a	1.48±0.01	4.02±1.77ab	0.53±0.16b	21.59±4.84a	24.72±0.72b
T-test		**	ns	**	**	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)		1.40	0.04	9.30	9.20	25.28	11.88
เดือน	กรรมวิธี	(mg kg <sup>-1</sup> )					
		Extr. Ca	Extr. Mg	Extr. Fe	Extr. Mn	Extr. Cu	Extr. Zn
1	ชุดควบคุม	40.54±0.31a	11.27±0.13a	26.06±0.09a	23.40±0.37bcd	0.51±0.01a	4.60±0.01a
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	36.55±0.32b	9.04±1.19b	25.82±1.95a	27.02±2.32a	0.48±0.02ab	4.42±0.20ab
2	ชุดควบคุม	36.27±0.09b	8.44±0.17bc	22.82±0.13b	22.90±0.21cd	0.49±0.01ab	4.50±0.01a
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	33.43±0.57c	7.92±0.22c	21.43±1.63bc	25.45±0.98ab	0.47±0.01b	4.39±0.13ab
3	ชุดควบคุม	32.41±0.13c	7.66±0.13cd	20.41±0.22bc	21.20±0.05d	0.48±0.01ab	4.49±0.12a
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	31.57±0.85c	6.83±0.07d	20.04±1.61c	24.82±0.74abc	0.43±0.02c	4.21±0.16b
T-test		**	**	**	**	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)		1.31	5.92	5.42	4.50	5.76	2.85

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่ P < 0.01 จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 19 ความเข้มข้นของธาตุอาหารในต้นยางพาราส่วนเหนือดิน หลังการใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ต่อการเจริญเติบโตของยางพาราในเรือนทดลอง

เดือน	กรรมวิธี	ความเข้มข้นของธาตุอาหารในต้นยางพาราส่วนเหนือดิน				
		N (g kg <sup>-1</sup> )	P (g kg <sup>-1</sup> )	K (g kg <sup>-1</sup> )	Ca (g kg <sup>-1</sup> )	Mg (g kg <sup>-1</sup> )
1	ชุดควบคุม	13.41±0.08d	0.63±0.01b	9.92±0.02c	3.52±0.09b	1.18±0.02c
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	14.02±0.51cd	0.77±0.21b	10.77±.49bc	3.44±0.60b	1.25±0.04bc
2	ชุดควบคุม	15.86±0.08bc	0.78±0.02b	10.02±0.13c	3.78±0.07b	1.25±0.03bc
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	16.24±0.57b	0.90±0.33ab	11.62±0.93ab	4.15±0.32ab	1.29±0.18bc
3	ชุดควบคุม	16.49±0.01b	0.82±0.02ab	10.18±0.01c	4.02±0.04ab	1.43±0.05b
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	20.54±2.32a	1.20±0.23a	11.95±0.11a	4.85±0.89a	1.89±0.14a
T-test		**	**	**	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)		6.21	22.04	4.02	11.57	7.23
เดือน	กรรมวิธี	ความเข้มข้นของธาตุอาหารในต้นยางพาราส่วนเหนือดิน				
		Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	
1	ชุดควบคุม	98.93±1.06b	51.16±0.51c	2.16±0.14b	17.45±0.05c	
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	130.17±7.94a	53.07±1.63c	3.07±0.63b	20.04±2.34bc	
2	ชุดควบคุม	102.76±0.47b	53.58±1.45bc	4.74±0.81a	19.54±0.08c	
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	142.08±15.89a	54.37±5.18bc	5.31±0.97a	23.82±0.70a	
3	ชุดควบคุม	106.20±1.70b	58.66±1.59ab	4.97±0.75a	22.43±1.09ab	
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	144.11±4.64a	58.85±1.46a	5.97±1.09a	24.44±1.80a	
T-test		**	**	**	**	
C.V. (เปอร์เซ็นต์)		6.25	4.48	18.10	6.18	

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่ P < 0.01 จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 20 การดูดใช้ธาตุอาหารของต้นยางพาราหลังการใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ต่อการเจริญเติบโตของยางพาราในเรือนทดลอง

เดือน	กรรมวิธี	ปริมาณการดูดใช้ธาตุอาหารของต้นยางพาราส่วนเหนือดิน (mg plant <sup>-1</sup> )				
		N	P	K	Ca	Mg
1	ชุดควบคุม	39.17±2.03d	1.81±0.11c	28.99±0.03d	10.29±0.26d	3.46±0.06e
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	41.34±1.90d	2.27±0.56c	31.79±1.43d	10.14±1.77d	3.70±0.13e
2	ชุดควบคุม	69.32±2.34c	3.37±0.45bc	43.81±0.57c	16.52±0.31c	5.47±0.13d
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	82.88±5.06bc	4.55±1.69b	59.35±4.74b	21.21±1.63bc	6.60±0.93c
3	ชุดควบคุม	94.33±3.43b	4.61±0.78b	58.24±0.01b	22.98±0.03b	8.16±0.26b
	ไม่ละลายน้ำ 3 + ละลายน้ำ 1 SM1	128.16±18.54a	7.56±1.81a	74.58±0.66a	30.29±5.54a	11.80±0.86a
T-test		**	**	**	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)		10.39	25.69	4.15	13.30	8.23
เดือน	กรรมวิธี	Mn	Fe	Cu	Zn	
1	ชุดควบคุม	0.29±0.003e	0.15±0.001e	0.013±0.007b	0.05±0.001d	
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	0.38±0.023d	0.16±0.005e	0.008±0.002b	0.06±0.006d	
2	ชุดควบคุม	0.45±0.002d	0.23±0.006d	0.015±0.010ab	0.09±0.002c	
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	0.83±0.007b	0.28±0.003c	0.030±0.012a	0.12±0.004b	
3	ชุดควบคุม	0.61±0.009c	0.34±0.009b	0.029±0.004a	0.13±0.006b	
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ละลายน้ำ 1 SM1	0.98±0.06a	0.37±0.009a	0.031±0.014a	0.15±0.011a	
T-test		**	**	**	**	
C.V. (เปอร์เซ็นต์)		7.57	0.01	0.00	0.02	

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่ P ≤ 0.01 จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

## 10. ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการควบคุม *R. microporus* ในโรงเรือนทดลอง

การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ร่วมกับสูตรละลายน้ำ 1 SM1 เพื่อควบคุม *R. microporus* โดยมีการใช้ปุ๋ยสูตร 20-8-20 เป็นสูตรที่เหมาะสมกับยางพาราก่อนเปิดกรีด และปุ๋ยสูตร 15-15-15 เป็นปุ๋ยที่เกษตรกรนิยมใช้กับต้นยางพารา ทำให้ต้นยางพารามีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน คือ

ความสูงต้นยางพารา การใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ร่วมกับสูตรละลายน้ำ 1 SM1 ที่มีการใช้ปุ๋ยสูตร 20-8-20 การเจริญเติบโตดีที่สุด โดยต้นยางพารามีความสูง 133.53 เซนติเมตร แต่เมื่อจัดการปุ๋ยสูตร 15-15-15 ต้นยางพาราเจริญเติบโตได้น้อยกว่า คือ 122.84 เซนติเมตร ในขณะที่ชุดควบคุมที่มีการปลูกยางพาราแบบปกติ (ไม่ใช้ชีวภัณฑ์ และไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค) ต้นยางพาราเจริญเติบโตได้น้อย และน้อยที่สุดในชุดควบคุมที่มีการปลูกเชื้อ

จำนวนใบของต้นยางพารา ในกรรมวิธีที่มีการใช้ชีวภัณฑ์ มีการใช้ปุ๋ยสูตร 20-8-20 และสูตร 15-15-15 จำนวนใบทั้ง 2 กรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างกัน แต่จำนวนใบของยางพารามีน้อยมากในชุดควบคุมที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค เช่นเดียวกับกับความยาวของรากแก้ว ไม่มีความแตกต่างเมื่อใช้ชีวภัณฑ์ร่วมกับการใช้ปุ๋ย ในขณะที่ชุดควบคุมที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค ทำให้ความยาวของรากแก้วเจริญได้น้อยที่สุด

น้ำหนักสดส่วนเหนือดิน มีน้ำหนักมากที่สุดในกรรมวิธีที่มีการใช้ชีวภัณฑ์ และการใช้ปุ๋ยสูตร 20-8-20 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับชุดควบคุมที่มีการปลูกยางพาราแบบปกติ (ไม่ใช้ชีวภัณฑ์ และไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค) และชุดควบคุมที่มีการปลูกเชื้อ เช่นเดียวกับน้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน และน้ำหนักแห้งราก (ตารางที่ 24)

เมื่อประเมินผลระดับการเกิดโรค พบว่าในชุดควบคุม (ต้นยางพาราปกติที่ไม่มีการปลูกเชื้อ) ลักษณะส่วนเหนือดินและรากของต้นยางมีความแข็งแรงสมบูรณ์ เจริญเติบโตตามปกติ (ภาพที่ 36 A) และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรค ในระยะแรกต้นยางพารายังคงแข็งแรง สมบูรณ์ เจริญเติบโตเป็นปกติ (ภาพที่ 35 A) ซึ่งระดับการประเมินเท่ากับศูนย์ คือไม่แสดงอาการเกิดโรค และเมื่อระยะเวลาที่มากขึ้นต้นยางพาราเริ่มแสดงอาการในใบล่าง โดยใบเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองส้ม ขนาดของใบเท่าเดิม จำนวนใบลดลง เมื่อดูในส่วนของราก รากฝอยเริ่มถูกทำลาย มีการติดโรค มีเส้นใยเชื้อรา โดยปลายรากเริ่มมีสีดำ และปริมาณของรากฝอยเริ่มลดลง เมื่อการเข้าทำลายของโรครุนแรงขึ้น ขนาดของใบเล็ก จำนวนใบลดลงมาก ใบสีเหลืองทั้งต้น ต้นยางแสดงอาการต้นตาย และทิ้งใบ ในขณะที่รากแก้วถูกทำลาย รากฝอยเหลือน้อยและรากฟอนที่สุด (ภาพที่ 35 B)





ภาพที่ 35 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงส่วนเหนือดิน และรากของต้นยางพารา ที่ระยะเวลา 3 เดือน เมื่อเชื้อรา *R. microporus* เข้าทำลาย ในชุดควบคุม (A) ต้นยางพาราที่มีการปลูกเชื้อในระยะเริ่มต้น (B) เชื้อรา *R. microporus* เริ่มเข้าทำลายจนถึงระดับรุนแรง

ขณะเดียวกันเมื่อมีการใช้ปุ๋ยให้กับต้นยางพารา ร่วมกับการใช้ชีวภัณฑ์ สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 และสูตรละลายน้ำ 1 SM1 ทำให้ต้นยางพารา มีความแข็งแรงสมบูรณ์ จำนวนใบเพิ่มขึ้น ลักษณะใบมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 36 B และ C) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 36 A) เมื่อมีการปลูกเชื้อรา *R. microporus* ทำให้เส้นใยเชื้อราเจริญเติบโตได้น้อยในชุดทดสอบ โดยใช้ระยะเวลาในการเข้าทำลายต้นยางพารานานกว่าชุดควบคุมที่มีการปลูกเชื้อ นอกจากนี้การใช้ชีวภัณฑ์ โดยการเทราดลงดิน สามารถควบคุม *R. microporus* ได้ทันที ทำให้เชื้อราไม่สามารถเข้าทำลายต้นยางพาราได้หรือได้น้อยมาก ลักษณะส่วนเหนือดินของต้นยางพาราจึงยังคงมีความแข็งแรงสมบูรณ์ ใบและรากแก้วมีขนาดใหญ่ มีปริมาณรากฝอยและจำนวนใบมาก และดีที่สุดเมื่อมีการใช้ปุ๋ยสูตร 20-8-20 (ภาพที่ 36 C) ทำให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ส่วนเหนือดินและรากเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 22) การเข้าทำลายของเชื้อรา *R. microporus* น้อย จึงสามารถลดการเกิดโรคได้ทั้งในส่วนเหนือดิน และในรากอยู่ในช่วงระหว่าง 96-100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 21) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการปลูกเชื้อ (ภาพที่ 35 B) และมีโอกาสของการเกิดโรคเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 21) นอกจากนี้ส่วนเหนือดินและรากมีความแข็งแรงสมบูรณ์กว่าชุดควบคุมที่มีการปลูกยางแบบปกติ (ภาพที่ 36 A)

เมื่อพิจารณาสมบัติทางเคมีและปริมาณธาตุอาหารพืชในดินหลังการใช้ชีวภัณฑ์ ร่วมกับการใช้ปุ๋ย ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดินช่วงที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4.5-5.5

(ตารางที่ 17) และจากผลวิเคราะห์ดินมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เป็นกลาง ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับชุดควบคุม เช่นเดียวกับค่าสภาพการนำไฟฟ้า ขณะที่กรรมวิธีที่ใช้ชีวภัณฑ์และใช้ปุ๋ย ทำให้ความสามารถในการแลกเปลี่ยนแคตไอออนในดินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ อยู่ในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับค่าในช่วงที่เหมาะสม แต่การใช้ชีวภัณฑ์ร่วมกับการใช้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 และ 20-8-20 ทำให้ปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มขึ้นมากที่สุด ส่วนแคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ มีแนวโน้มลดลงในชุดทดสอบ

ปริมาณจุลธาตุ คอปเปอร์ มีปริมาณธาตุอาหารอยู่ในระดับต่ำ ยกเว้นปริมาณของแมงกานีส สังกะสี และเหล็ก ปริมาณธาตุอาหารสูงกว่าระดับที่เหมาะสมในดินปลูกยางพารา (ตารางที่ 17) เมื่อใช้ชีวภัณฑ์ร่วมกับการใช้ปุ๋ย แต่เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณธาตุอาหารมีแนวโน้มลดลง (ตารางที่ 23)

นอกจากนี้ ปริมาณความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในใบยางพาราสูงที่สุดในกรรมวิธีที่มีการใช้ปุ๋ยสูตร 20-8-20 ร่วมกับการใช้ชีวภัณฑ์ เท่ากับ 28.30 กรัม ต่อกิโลกรัม, 2.22 กรัม ต่อกิโลกรัม และ 13.17 กรัม ต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เช่นเดียวกับปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียม และแมกนีเซียม ขณะที่ปริมาณความเข้มข้นของจุลธาตุในใบยางพาราต่ำที่สุดในกรรมวิธีชุดควบคุมที่เป็นโรครากขาว และชุดควบคุมที่ไม่ใช้ชีวภัณฑ์และไม่ใช้ปุ๋ย (ตารางที่ 24) สอดคล้องกับการลดลงของปริมาณธาตุอาหารในดินแปรผกผันกับปริมาณความเข้มข้นของธาตุในใบยางพารา ซึ่งความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบยางพาราที่เพิ่มขึ้นเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณการดูดใช้ของพืช สังเกตได้ว่าปริมาณของธาตุอาหารหลัก คือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม พืชดูดใช้มากที่สุด โดยเฉพาะไนโตรเจน นอกจากนี้ธาตุอาหารรอง ได้แก่ แคลเซียม และแมกนีเซียม รวมถึงจุลธาตุก็มีความสำคัญที่พืชไม่สามารถขาดได้ ทั้งนี้ปริมาณของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และจุลธาตุที่พืชดูดใช้สูงที่สุดในกรรมวิธีที่มีการใช้ชีวภัณฑ์ร่วมกับการใช้ปุ๋ยสูตร 20-8-20 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.01$ ) กับกรรมวิธีที่มีการใช้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 และชุดควบคุม (ตารางที่ 25)



ภาพที่ 36 ลักษณะส่วนเหนือดินและรากของต้นยางพาราเมื่อเชื้อรา *R. microporus* เข้าทำลายจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

(A) ชุดควบคุม + ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค

(B) ใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 และสูตรละลายน้ำ 1 SM1 + ปุ๋ยสูตร 15-15-15 + ปลูกเชื้อ *R. microporus*

(C) ใช้ชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 และสูตรละลายน้ำ 1 SM1 + ปุ๋ยสูตร 20-8-20 + ปลูกเชื้อ *R. microporus*

ตารางที่ 21 ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ร่วมกับการใช้ปุ๋ยในการควบคุม *R. microporus* ในโรงเรือนทดลอง

กรรมวิธี	การเกิดโรค (เปอร์เซ็นต์)		ลดการเกิดโรค (เปอร์เซ็นต์)	
	ส่วนเหนือดิน	ราก	ส่วนเหนือดิน	ราก
Control	-	-	-	-
Control ( <i>R. microporus</i> )	100.00±0.00a	100.00±.00a	0.00±0.00b	0.00±0.00b
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ปุ๋ยสูตร 15-15-15 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	1.89±3.78b	12.70±15.55b	98.11±3.78a	87.30±15.55a
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1+ ปุ๋ยสูตร 20-8-20 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	0.00±0.00b	3.18±3.67b	100.00±0.00a	96.82±3.67a
T-test	**	**	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	6.42	13.84	3.03	15.03

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 22 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ร่วมกับการใช้ปุ๋ยในการควบคุม *R. microporus* ในโรงเรือนทดลอง

ทรีทเมนต์	ความสูงต้น (cm.)	จำนวนใบ	ความยาวราก (cm.)	น้ำหนักสด		น้ำหนักแห้ง	
				ส่วนเหนือดิน	ราก	ส่วนเหนือดิน	ราก
control	102.95±4.68c	28.10±3.31b	28.21±0.91ab	71.16±5.45c	40.85±3.14b	41.68±2.78c	21.00±1.23b
Control+ <i>R. microporus</i>	82.18±3.70d	5.16±1.56c	23.78±8.32b	45.96±4.55d	38.05±4.54b	28.56±2.21d	19.42±2.24b
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 15-15-15 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	122.84±12.91b	59.46±1.49a	29.15±0.67a	98.95±12.61b	49.25±9.63a	51.66±5.80b	25.90±4.80a
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 20-8-20 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	133.53±9.23a	58.50±2.38a	29.86±0.87a	131.60±17.02a	54.63±5.00a	63.73±6.67a	28.28±1.52a
T-test	*	*	*	*	*	*	*
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	7.68	6.09	15.20	12.85	13.32	10.26	11.94

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.05$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 23 สมบัติทางเคมีและปริมาณธาตุอาหารพืชในดิน หลังการใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 และละลายน้ำ 1 SM1 ร่วมกับการใช้ปุ๋ย

ทรีทเมนต์	pH (ดิน:น้ำ = 1:5)	EC (1:5) (dS m <sup>-1</sup> )	CEC (cmolc kg <sup>-1</sup> )	Total. N (g kg <sup>-1</sup> )	Avai. P (mg kg <sup>-1</sup> )	Extr. K (mg kg <sup>-1</sup> )
Control (ปลูกยางตามปกติ)	4.99±0.09	1.48±0.30	4.83±0.12b	0.58±0.05b	13.97±2.32b	33.92±1.59b
Control + <i>R. microporus</i>	5.00±0.12	1.49±0.02	6.58±0.13a	0.77±0.09a	14.30±0.19b	34.14±0.8b
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 15-15-15 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	4.78±0.10	1.47±0.06	7.73±0.85a	0.67±0.06ab	43.31±14.36a	53.27±3.90a
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 20-8-20 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	4.75±0.31	1.48±0.01	7.58±0.68a	0.79±0.08a	41.44±11.35a	58.89±7.92a
T-test	ns	ns	**	**	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	11.59	14.49	8.24	10.12	32.66	9.96
ทรีทเมนต์	Extr. Ca	Extr. Mg	Extr. Cu	Extr. Fe	Extr. Zn	Extr. Mn
	(mg kg <sup>-1</sup> )					
Control (ปลูกยางตามปกติ)	38.24±1.23a	8.77±1.40ab	0.61±0.01a	42.18±1.17	4.00±0.08b	23.64±4.79a
Control + <i>R. microporus</i>	41.86±0.25a	10.57±0.06a	0.53±0.05b	40.69±0.76	5.25±0.09a	25.05±1.20a
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 15-15-15 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	26.04±2.70b	7.5±1.00b	0.55±0.04b	43.50±2.24	3.33±0.23b	15.11±1.25b
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 20-8-20 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	27.89±1.87b	5.96±1.84b	0.54±0.01b	43.48±1.45	3.42±0.62b	13.42±0.91b
T-test	**	**	**	ns	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	5.25	15.37	5.71	3.54	8.32	13.39

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่ P ≤ 0.01 จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 24 ความเข้มข้นของธาตุอาหารพืชในใบยางพารา หลังการใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 และละลายน้ำ 1 SM1 ร่วมกับการใช้ปุ๋ย

ทรีทเมนต์	N (g kg <sup>-1</sup> )	P (g kg <sup>-1</sup> )	K (g kg <sup>-1</sup> )	Ca (g kg <sup>-1</sup> )	Mg (g kg <sup>-1</sup> )
Control (ปลูกยางตามปกติ)	21.64±0.77bc	1.30±0.11b	11.09±0.60b	4.83±0.54bc	1.65±0.22b
Control + <i>R. microporus</i>	19.64±0.27c	1.19±0.006b	9.68±0.03c	4.52±0.81c	1.55±0.16b
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 15-15-15 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	25.22±3.03ab	1.83±0.51ab	12.03±0.37ab	6.22±0.61ab	2.53±0.43a
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 20-8-20 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	28.30±.3.01a	2.22±0.43a	13.17±0.80a	7.09±0.79a	2.00±0.31ab
T-test	**	**	**	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	20.71	20.66	4.64	12.56	15.37
ทรีทเมนต์	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	Mn (g kg <sup>-1</sup> )	
Control (ปลูกยางตามปกติ)	4.40±1.10c	27.68±1.11c	23.91±0.67	0.41±0.02b	
Control + <i>R. microporus</i>	5.17±0.22bc	25.73±1.42c	22.38±1.26	0.18±0.03c	
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 15-15-15 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	6.29±0.13ab	30.67±.901b	23.53±0.40	0.49±0.12ab	
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 20-8-20 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	7.36±0.79a	33.77±.1.19a	25.04±1.98	0.61±0.13a	
T-test	**	**	ns	**	
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	11.89	3.97	5.23	21.14	

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่ P ≤ 0.01 จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 25 การดูดใช้ธาตุอาหารในใบยางพารา หลังการใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 และละลายน้ำ 1 SM1 ร่วมกับการใช้ปุ๋ย

กรรมวิธี	ปริมาณของธาตุอาหารที่พืชดูดใช้ (mg plant <sup>-1</sup> )				
	N	P	K	Ca	Mg
Control (ปลูกยางตามปกติ)	246.33±16.89c	14.81±1.69b	125.75±11.06c	54.82±7.84b	18.71±2.72b
Control + <i>R. microporus</i>	200.26±12.56c	11.70±3.12b	99.26±5.62d	46.42±8.91b	15.83±1.40b
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 15-15-15 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	326.16±37.95b	23.67±6.71a	155.38±9.13b	78.58±7.77a	32.78±5.11a
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 20-8-20 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	391.33±38.77a	30.51±3.93a	177.17±6.81a	93.32±12.55a	27.03±4.38a
T-test	**	**	**	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	9.76	19.73	5.73	13.87	15.68
กรรมวิธี	Cu	Fe	Zn	Mn	
Control (ปลูกยางตามปกติ)	0.05±0.001c	0.31±0.01c	0.27±0.01bc	4.64±0.41b	
Control + <i>R. microporus</i>	0.05±0.003c	0.26±0.01d	0.23±0.02c	1.86±0.06c	
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 15-15-15 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	0.08±0.003b	0.39±0.02b	0.31±0.02ab	6.29±1.34ab	
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1 + ปุ๋ยสูตร 20-8-20 + <i>R. microporus</i> + ละลายน้ำ 1 SM1	1.00±0.014a	0.44±0.02a	0.35±0.04a	8.28±2.08a	
T-test	**	**	**	**	
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	0.00	0.03	10.87	23.86	

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่ P < 0.01 จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



## บทที่ 4

### วิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. การตรวจสอบปฏิกิริยาและประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์

การตรวจสอบปฏิกิริยาทางเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1, ไอโซเลท LPDD3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 พบว่าแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 และ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 แสดงปฏิกิริยาแกรมบวก (gram positive bacteria) โดยผนังเซลล์เป็นชั้นหนาของ peptidoglycan ชั้นเดียว และไม่มีชั้นไขมัน มีคุณสมบัติสามารถทนร้อน แร้งดัน รังสี และสารเคมีได้ดี (Nannan *et al.*, 2021) แต่ขณะที่แบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท LPDD3-2 แสดงปฏิกิริยาแกรมลบ มีความเหนียวและเหน็ดติดรูป (ภาพที่ 6) ซึ่งเกิดจากการแตกออกของผนังเซลล์และปลดปล่อย chromosomal material (Henner and Hoch, 1980) ออกมานอกเซลล์โดยลักษณะของผนังเซลล์บาง ชั้นในเป็นชั้นของ peptidoglycan ชั้นนอกเป็นชั้นไขมันซึ่งไม่สามารถทนต่อแร้งดัน รังสี และสารเคมี (Nannan *et al.*, 2021) อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีคุณสมบัติในการสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) เป็นส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (vegetative cell) ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ มีลักษณะเป็นแท่งรี หรือทรงกระบอกที่มีความสมบูรณ์ (ภาพที่ 7) ทำให้แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิสูง สภาพที่มีสารเคมี สภาพขาดแคลนอาหาร และเอนโดสปอร์จะสามารถงอกกลับมาเป็น vegetative cell ได้ใหม่เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (McKenney *et al.*, 2013)

การตรวจสอบเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* บริเวณที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา เส้นใยผิดปกติมีการแตกแขนง ขนาดเล็ก สั้นหยิก โป่งพอง ผนังเซลล์หนา เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีปลายเส้นใยมน ไม่บวมสามารถเจริญงอกเป็นเส้นยาวได้เป็นปกติ (ภาพที่ 9) เนื่องจากเส้นใยเชื้อรามีการเจริญทางปลายยอด และเป็นส่วนที่ไวต่อสารเคมีต่างๆ จึงแสดงให้เห็นว่า สารที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ปลดปล่อยออกมามีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* (ภาพที่ 8) โดยมีผลในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ทำให้การนำสารเข้าออกเซลล์ผิดปกติ ส่งผลให้เชื้อราไม่สามารถแบ่งตัวต่อไปได้ (Moore *et al.*, 2003) การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์จึงมีประสิทธิภาพควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เนื่องจากแบคทีเรีย *Bacillus* สามารถสร้างเอนไซม์ เช่น โปรติเอส (protease) และไคติเนส (chitinase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสารประกอบโปรตีนและไคติลิน (Jongjeen and Aoki, 2010) ที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของผนังเซลล์ของเชื้อรา และสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น iturin, fengycin, surfactin, bacylomycin, bacillaene และ bacilysin (Rabbee *et al.*, 2019; Khedherab *et al.*, 2021) จึงสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ เช่น สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา (อุบลวรรณ, 2564) เชื้อรา *Rhizoctonia solani* โรคกาบใบแห้ง และเมล็ดต่างของข้าว (Pengnoo *et al.*, 2000; Chamswarnng *et al.*, 2018) ใบไหม้ของถั่วหรั่ง (Pengnoo *et al.*, 2006)

และเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุของโรคผลเน่าในฝรั่ง (ศิริพร และคณะ, 2019) โดยจากการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

## 2. ผลของสารประกอบในสูตรชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *R. microsporus*

สารประกอบมีหน้าที่ช่วยเพิ่มขนาดหรือน้ำหนักของแกรนูล ช่วยการไหลและการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ดี มีการแตกตัวดีและปลดปล่อยแบคทีเรียปฏิปักษ์ขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารหลายชนิด เช่น อาหาร potato dextrose agar (PDA) และ nutrient agar (NA) เมื่อแบคทีเรียได้รับพลังงาน คาร์บอน น้ำ และธาตุอาหารต่างๆ พลังงานส่วนใหญ่ถูกใช้ในการสังเคราะห์ทางชีวภาพ อาศัยประสิทธิภาพของปฏิปักษ์ยาเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต มีการใช้พลังงานจากสารที่ได้จากการย่อยสลายในการสร้างสารโมเลกุลขนาดใหญ่ ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งการเจริญเติบโตแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับลักษณะของแหล่งกำเนิดคาร์บอนและความเข้มข้นของสารประกอบที่ได้รับ โดยเมื่อมีการใช้สารประกอบชนิดต่างๆ ผสมกับอาหาร PDA ทำให้แบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญเติบโตได้ดีกว่าในอาหาร PDA แบบปกติ (ตารางภาคผนวกที่ 1) และ (ภาพที่ 10) เนื่องจากสารพลาในกลุ่มของแป้ง น้ำตาล และแร่ดินชนิดต่างๆ เป็นแหล่งอาหารและพลังงานให้กับแบคทีเรียปฏิปักษ์ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งเห็นได้ว่าสารพลาในน้ำตาล เช่น Lactose monohydrate เป็นโคแฟกเตอร์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 1 โมเลกุล ของกาแลคโตสและคาร์บอน 4 โมเลกุล ของกลูโคส (Modugno *et al.*, 2015 ; Wijayasinghe *et al.*, 2019) ยังมีสมบัติที่ทึบแสง ช่วยในการปกป้องเซลล์และเอนโดสปอร์ของจุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยแลคโตสเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้หมดจะถูกดูดซึมผ่าน LacS permease ที่มี arboxyterminal hydrophilic ที่คล้ายคลึงกับโปรตีนของแบคทีเรียที่สามารถเข้ากันได้ (Vuyst and Vin, 2007) ซึ่งจากการนำสารประกอบแลคโตสและซูโครสมาทดสอบการเจริญเติบโต สามารถเจริญเติบโตดี โดยการใช้สารประกอบแลคโตสและซูโครส 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ทำให้แบคทีเรีย *Streptococcus thermophilus* สามารถผลิตสาร acetaldehyde ได้ดีกว่าการใช้แลคโตสและซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (Bennama *et al.*, 2012) เช่นเดียวกันกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่ใช้สารประกอบกลุ่มน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เชื้อปฏิปักษ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าสารประกอบที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารกลุ่มยัดเกาะนิยมนำมาใช้โดยเฉพาะ Sodium alginate และ calcium alginate สามารถดูดซึมผ่านเซลล์ได้ดี (Dzyadevych and Renault, 2014 ; Szekalska *et al.*, 2016) มีการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และในการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ยังมีลักษณะคล้ายเจลช่วยชะลอสำหรับการปลดปล่อยจุลินทรีย์ออกมาภายนอก (Segale *et al.*, 2016; Chuang *et al.*, 2017) และสามารถเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจลได้ เมื่อน้ำมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ ภายในไฮโดรเจลมีความสำคัญต่อการรักษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (Zhang *et al.*, 2011) ทั้งนี้การเลือกใช้สารประกอบพัฒนาชีวภัณฑ์จึงต้องมีความปลอดภัยสูงต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม

### 3. การพัฒนาชีวภัณฑ์ *B. subtilis* เพื่อควบคุมเชื้อรา *R. microsporus*

ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ ได้จากการนำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมกับ สารกลุ่มสารยัดเกาะ และกลุ่มน้ำตาลที่สามารถละลายน้ำได้หมด (ตารางที่ 1) ซึ่งชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำที่มีอัตราส่วนแตกต่างกันหรือประกอบด้วยสารยัดเกาะสูง การละลายน้ำใช้เวลาของการละลาย นานกว่า โดยสูตรทั้งหมดที่ได้สามารถละลายน้ำได้ดีอยู่ในช่วง 1.2-2.56 นาที และสูตรที่ 1 ละลายน้ำ ได้ดีที่สุดในช่วง 1.23 นาที ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมของ การละลายน้ำของแกรนูลอนขนาด 0.2-4.0 มิลลิเมตร ใช้เวลาในการละลายไม่เกิน 10 นาที (Ring *et al.*, 2011) ชีวภัณฑ์ที่สามารถละลายน้ำได้เร็ว ช่วยประหยัดระยะเวลา ใช้งานได้ทันที โดยรวมแล้ว เมื่อมีการนำชีวภัณฑ์ไปละลายน้ำ สารประกอบละลายน้ำหมด จะปลดปล่อยเซลล์แรกเกิดของ แบคทีเรียที่ไม่มีนิวเคลียส ออกมารวมตัวกันในน้ำอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสารประกอบที่ละลายน้ำกลายเป็น แหล่งอาหาร และพลังงานของแบคทีเรียสำหรับใช้ในการเจริญเติบโตในช่วงเริ่มต้น (Gao *et al.*, 2011) ส่วนความเป็นกรดเป็นด่างของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ที่ได้จากสารพามีค่าเป็นกลาง (ตารางที่ 10) จึงเหมาะสมต่อการสร้างเอนโดสปอร์และการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ เนื่องจากสาร พากลุ่มน้ำตาล เช่น แลคโตส มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ที่ประมาณ 5.99 โดยความเข้มข้นของ ไฮโดรเจนไอออน ( $H^+$ ) มีบทบาทต่อการละลายของแลคโตสและความไวในการย่อยสลาย เนื่องจาก สภาวะที่เป็นกรดมากๆ ไม่เหมาะสมในการปลดปล่อยกลูโคสและกาแลคโตสเพื่อเป็นแหล่งอาหารและ พลังงานให้แก่จุลินทรีย์ (Wijayasinghe *et al.*, 2019) และสารยัดเกาะ เช่น sodium alginate สามารถละลายน้ำได้ดีในช่วงความเป็นกรดเป็นด่าง 5-11 ส่วนในสภาพของการละลายที่เป็นกรดจะ เกิดการตกตะกอน ซึ่งความเป็นกรดเป็นด่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 6-7 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม ในขณะที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่ำกว่า 3-4 มีสภาวะเป็นกรด มีผลต่อการยับยั้งการสร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรีย (Aleksic *et al.*, 2019) ขณะเดียวกันชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำมีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 7 ค่อนข้างเหมาะสมต่อการนำไปใช้ ในระยะยาว และไม่ส่งผลกระทบต่อดิน อีกทั้งยังสามารถช่วยปลดปล่อยแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยมีสาร พากลุ่มแร่ดินชนิดต่างๆ ที่ทำหน้าที่เป็นสารช่วยไหล และกระจายตัวแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการแทรก ซึมในดิน ทำให้แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถกระจายตัวได้ดี และเกาะยึดตามพื้นผิวดิน และรากพืช ได้ง่าย

สำหรับลักษณะของชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้เป็นแบบแกรนูลอนแห้งที่มีขนาด 0.2-0.4 มิลลิเมตร ความหนาแน่นอยู่ในช่วงระหว่าง 5-10  $mm^3$  (Satinder *et al.*, 2006) โดยความหนาแน่น ขึ้นอยู่กับสารประกอบที่นำมาใช้พัฒนาชีวภัณฑ์ ซึ่งชีวภัณฑ์แต่ละสูตรมีปริมาณของแบคทีเรียที่ แตกต่างกัน โดยจากการศึกษาเห็นได้ว่า ปริมาณของ *B. subtilis* สามารถเจริญได้ดีในสูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 (ตารางที่ 11) จากการถ่ายภาพภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่ง กราด แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถเข้าไปครอบครองพื้นที่ผิวภายนอกและภายในอนุภาคของสารพา และระหว่างชั้นต่างๆ ได้ โดยเอนโดสปอร์ยังคงมีลักษณะที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 16) ในขณะที่ความ หนาแน่นรวมภายในชีวภัณฑ์รูปแบบแกรนูลอนไม่มีความสม่ำเสมอ เนื่องจากในการผลิตขึ้นรูปชีวภัณฑ์

เป็นการใช้แรงงานคน หรือการทำด้วยมือ ทำให้การลงแรงกดไม่มีความสม่ำเสมอ แต่อย่างไรก็ตามไม่มีผลกระทบต่อปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในขณะที่ลักษณะเอนโดสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในภายในแกรนูล ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อสูงและเจริญเติบโตดีกว่าเอนโดสปอร์ที่อยู่พื้นผิวภายนอกแกรนูล (Garcia, 2017) ดังนั้น การพัฒนาชีวภัณฑ์ให้มีประสิทธิภาพจึงต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเป็นกรดเป็นด่างของสารพา ความสามารถในการละลายน้ำ การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์เมื่ออยู่ในสูตรชีวภัณฑ์ ความสะดวกในการใช้งาน และการเก็บรักษา เป็นต้น

#### 4. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* เพื่อควบคุมเชื้อรา *R. microsporus* ภายในสภาพห้องปฏิบัติการ

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* มีการสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของ *R. microsporus* โดยเฉพาะการเจริญส่วนปลายของเส้นใยเชื้อราที่มีการสังเคราะห์สารโคติน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ เกิดการแบ่งเซลล์ ทำให้เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ (สมใจ, 2531) เมื่อแบคทีเรียปฏิปักษ์ผลิตสารปฏิปักษ์ออกมาออกเซลล์ ทำให้การสร้างผนังเซลล์ของเชื้อราถูกยับยั้ง เส้นใยเชื้อราบวม ผนังเซลล์หนา และเกิดการขดตัว (ภาพที่ 18) สังเกตได้จากชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12 และ 13) โดยที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ การยับยั้งมีประสิทธิภาพสูงกว่าระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และสารพากลุ่มน้ำตาล แร่ดิน และกลุ่มแป้ง ที่เป็นองค์ประกอบในชีวภัณฑ์ เป็นแหล่งอาหาร และพลังงานของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่นเดียวกันการใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจาก *A. longipes* ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ (98.6 เปอร์เซ็นต์) (วานิด, 2552) และการใช้ชีวภัณฑ์ *B. megaterium* ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* เท่ากับ 99.64 เปอร์เซ็นต์ (Wiwattanapatapee *et al.*, 2007)

การใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับดินผสม การแบ่งใช้ตามระดับความสูงของดิน 5 และ 11 เซนติเมตร ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microsporus* สูงกว่าการใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 11 เซนติเมตร (ภาพที่ 20) เช่นเดียวกับศุภรัตน์ (2564) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microsporus* ที่มีการราดแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ตามลำดับชั้นในดินผสมแบบที่ 1 ทำให้การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* สามารถเจริญได้ 19.00-43.50 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถแทรกเข้าไปอยู่ตามผิวดิน และยึดเกาะกับอนุภาคของดิน ไปสู่พื้นที่เป้าหมายหรือพื้นที่ที่มีเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งใช้ระยะที่ใกล้กว่า ทำให้มีประสิทธิภาพดีกว่า เช่นเดียวกับการนำไปใช้ วิธีใช้ต้องมีความเหมาะสม จึงช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคสูงขึ้น และสูตรไม่ละลายน้ำเมื่อผสมคลุกเคล้ากับดิน ประสิทธิภาพในการยับยั้งน้อยกว่าการแบ่งใช้ชีวภัณฑ์แบบลำดับชั้นที่ 2, 5 และ 8 เซนติเมตร เนื่องจากชีวภัณฑ์ไม่ละลายน้ำการใช้แบบผสมคลุกเคล้ากับดิน แบคทีเรีย

ปฏิปกษ์ค่อยๆ ถูกปลดปล่อยออกมาในดิน เมื่อดินมีความชื้นที่เหมาะสมต่อการละลายทำให้แบคทีเรียมีการกระจายตัวในดิน ขณะที่การแบ่งใช้ชีวภัณฑ์แบบลำดับขั้น ทำให้ดินบริเวณนั้นมีความเข้มข้นของแบคทีเรียปฏิปกษ์ที่สูง ซึ่งช่วยหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. microsporus* ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (ภาพที่ 21) นอกจากนี้การผสมคลุกเคล้ากับดินเป็นวิธีการที่ไม่สะดวก เนื่องจากการนำไปใช้จริงต้องใช้ระยะเวลานานและประสิทธิภาพในการควบคุมน้อย อย่างไรก็ตามการใช้ชีวภัณฑ์รองกันหลุมก่อนปลูกยางพารา สามารถช่วยป้องกันและควบคุมเชื้อรา *R. microsporus* ได้ในระยะยาว และชีวภัณฑ์ละลายน้ำใช้สำหรับรดลงดิน โดยสามารถควบคุมเชื้อรา *R. microsporus* ได้อย่างทันที่และสะดวกต่อการนำมาใช้

### 5. การมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ที่สภาวะต่างๆ

ชีวภัณฑ์ที่อยู่ภายใต้อุณหภูมิ 10, 28 และ 37 องศาเซลเซียส ต่อการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปกษ์ในช่วงระยะเวลา 12 เดือน ของการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปกษ์สามารถมีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์ได้มากกว่า  $10^{10}$  โคโลนี ต่อกรัม โดยเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ และสูตรไม่ละลายน้ำ แบคทีเรียปฏิปกษ์สามารถมีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์ได้มากกว่า  $10^6$  โคโลนี ต่อกรัม (ภาพที่ 23 และ 24) การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปกษ์ในชีวภัณฑ์ที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากการกระจายตัวในแกรนูล และสารประกอบชีวภัณฑ์ที่มีอัตราส่วนของสารประกอบในแต่ละสูตรไม่เท่ากัน โดยปริมาณคาร์บอน หรือคาร์บอนต่อไนโตรเจนในชีวภัณฑ์แตกต่างกัน ส่งผลต่อการฟื้นตัวหรือพักตัวของเซลล์ไม่เท่ากัน (Schisler *et al.*, 2004) จึงมีผลต่อการมีชีวิตรอดตลอดระยะเวลา 12 เดือน ชีวภัณฑ์ที่อยู่ภายใต้อุณหภูมิต่างๆ (ภาพที่ 23 และ 24) สามารถยับยั้ง *R. microsporus* ได้ดี (ภาพที่ 25 และ 26) เพราะการฟื้นตัวหรือการพักตัวของจุลินทรีย์ภายในแกรนูลยังคงสมบูรณ์ เมื่อทดสอบบนอาหาร PDA และประสิทธิภาพจะลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการพักตัวและการเจริญเติบโต ซึ่งจะมีผลต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค (Schisler *et al.*, 2004) อีกทั้งอุณหภูมียังเป็นปัจจัยสำคัญต่อการมีชีวิตรอดและการเจริญของเชื้อ โดยเฉพาะในกลุ่มของ *Bacillus* มีการสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนร้อนสูง ความร้อนที่อุณหภูมิมากกว่า 45 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อ *Bacillus* (Setlow, 2014) แต่ถ้าให้ความร้อนต่อเนื่องเป็นเวลานาน เอนโดสปอร์ของ *Bacillus* จะเกิดความผิดปกติ ซึ่งทำให้ *Bacillus* มีชีวิตรอดน้อยลง แม้ว่าจะมีสารเติมแต่งสำหรับปกป้องเซลล์ก็ตาม (Stoeckel *et al.*, 2013)

การเก็บรักษาชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ภายใต้สภาพที่มีรังสี UVC ส่งผลให้แบคทีเรียปฏิปกษ์มีชีวิตรอดลดลงอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 27) เนื่องจากรังสี UVC มีความยาวคลื่นสูงสุด คือ 253.7 นาโนเมตร เป็นช่วงความยาวคลื่นที่ถูกดูดกลืนได้มากที่สุด ด้วยสารพันธุกรรม (nucleic acids ; DNA, RNA) ของจุลินทรีย์ (Navarrete *et al.*, 2020) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถดูดซับรังสี UVC ที่มีความยาวคลื่นในช่วง 200-310 นาโนเมตร (Takada *et al.*, 2017) เนื่องจาก UVC ผ่านทะลุเข้าไปในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์และทำลาย DNA และ RNA ทั้งนี้การดูดกลืนพลังงานโฟตอนของรังสี UVC เป็นสาเหตุทำให้เกิดความเสียหายจากโฟโตเคมีคอลของจุลินทรีย์ (Pereira *et al.*, 2015) ทำลายกรด

นิวคลีอิก (nucleic acid) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของ DNA ส่งผลให้ DNA ไม่สามารถเกิดกระบวนการจำลองตัวเองใหม่ได้ (Rastogi *et al.*, 2010) ผลเสียหายที่เกิดขึ้นอาจทำให้เซลล์มีลักษณะที่ผิดปกติไป ขัดขวางการแบ่งเซลล์ เอนโดสปอร์จุลินทรีย์มีความผิดปกติ เกิดการกลายพันธุ์ และจุลินทรีย์ไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอด (Goldman and Travisano, 2011) รังสี UVC จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ สภาพที่มีรังสี UVC จึงเป็นสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ส่งผลให้การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ลดลงอย่างรวดเร็ว รวมถึงการลดลงของประสิทธิภาพในการยับยั้ง *R. microporus* (ภาพที่ 28) การใช้รังสี UVC ที่มีความเข้มรังสีเท่ากับ  $0.1 \text{ W/m}^2$  หรือในช่วงคลื่น 253.7 นาโนเมตร เป็นความเข้มรังสีที่ใช้ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ มาใช้สำหรับการทดสอบชีวภัณฑ์ด้วยความเข้มรังสี UVC ที่สูง จึงมีผลให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ในสภาพธรรมชาติมีเพียงรังสี UVA และ UVB ซึ่งความเข้มแสงต่ำ แบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์จึงมีแนวโน้มมีชีวิตรอดสูง และการพัฒนาชีวภัณฑ์ไม่ได้เติมสารป้องกันรังสี UV แต่สารพวกกลุ่มแร่ดินที่ใช้พัฒนาชีวภัณฑ์สามารถปกป้อง *Bacillus* จากรังสี UVC อย่างไรก็ตามการให้รังสี UVC ต่อเนื่องและยาวนาน ทำให้การมีชีวิตรอดต่ำ ในช่วงแรกที่เชื้อมีชีวิตรอดสูง อาจเป็นเพราะได้รับอาหารจากสารประกอบเพื่อใช้ในการฟักตัว แต่หลังจากนั้นการมีชีวิตรอดจะเริ่มลดลง ในขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ การมีชีวิตรอดมีแนวโน้มสูงกว่าสูตรละลายน้ำ เนื่องจากสารประกอบที่นำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรไม่ละลายน้ำ มีสารประกอบกลุ่มแร่ดินที่มีความทึบแสง จึงช่วยป้องกันเซลล์จุลินทรีย์จากรังสี UVC การใช้เบนโทไนต์ (bentonite) เคโอลิน (เคโอลิน) นมขาดมันเนย (Nonfat Skim Milk : NFSM) และซูโครส (Sucrose) จากการให้รังสี UV ทำให้การมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ในรูปเซลล์สดลดลง ( $2.7 \log_{10}$  โคโลนี ต่อมิลลิลิตร) ขณะที่จุลินทรีย์ที่พัฒนาเป็นชีวภัณฑ์มีปริมาณลดลงน้อยกว่า ( $4.98 \log_{10}$  โคโลนี ต่อมิลลิลิตร) (Ting *et al.*, 2010)

อย่างไรก็ตามในสภาพที่มีความชื้นที่แตกต่างกัน การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ลงในดิน การมีชีวิตรอดลดลงมากในช่วงสัปดาห์แรกหลังการใช้ชีวภัณฑ์ และเมื่อระยะเวลา 7 เดือน กรรมวิธีที่ไม่มีการรักษาความชื้น การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียสูงกว่ากรรมวิธีที่มีการรักษาความชื้นในดิน เนื่องจาก *Bacillus* สามารถปรับตัวในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ โดยในสภาวะที่ไม่มีการรักษาความชื้นจะมีการปรับตัวไปอยู่ในรูปของเอนโดสปอร์ได้ดีกว่า เนื่องจากความชื้นที่ต่ำ มีผลสำหรับกิจกรรมการเผาผลาญสารอาหารภายในเซลล์ การหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ การเสื่อมสภาพของเซลล์ และการสร้างเอนโดสปอร์ให้อยู่รอดได้นานในดินแห้ง (Vries, 2006) แต่ในสภาวะที่มีการรักษาระดับความชื้นไว้ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถเจริญเติบโตได้ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปการมีชีวิตรอดลดลงมากกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการรักษาความชื้น (ภาพที่ 29) เนื่องจาก *Bacillus* ในดินอยู่ในลักษณะของเซลล์มากกว่าการสร้างเอนโดสปอร์ จึงแสดงอัตราการตายที่มากขึ้นในระดับความชื้นที่สูงขึ้น นอกจากนี้การนำชีวภัณฑ์ไปใช้ในดินทั่วไป ที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อ อาจเกิดขึ้นได้จากการแข่งขันของแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ที่มีอยู่ในดิน เช่น แบคทีเรียกลุ่มแอโรบิก (Boas *et al.*, 2000) ที่ใช้ออกซิเจน ทำให้ออกซิเจนในดินลดลง ส่งผลให้ความสามารถในการออกของสปอร์แบคทีเรียลดลง จึงเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการลดจำนวนประชากร (Ferreira *et al.*, 2003)

แต่การนำชีวภัณฑ์ไปใช้แม้อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น มีฝนตกหรือแล้ง แบคทีเรียก็สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในดิน จึงควรมีการใช้ชีวภัณฑ์เพิ่มทุกๆ 6 เดือน

## 6. ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการงอกของรากและการเจริญเติบโตของยางพารา

ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* การใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ลงไปในดิน แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถอาศัยอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน (ภาพที่ 29) เนื่องจากการสร้างเอนโดสปอร์ที่สามารถทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น หนาว หนรังสียูวี และแบคทีเรียปฏิปักษ์ยังสามารถผลิตเอมไซม์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การใช้ชีวภัณฑ์ทำให้การงอกของรากแก้ว และปริมาณรากฝอยเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการใช้ชีวภัณฑ์ (ภาพที่ 30) เป็นไปได้ว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์มีการผลิตเอมไซม์ indole-3-acetic acid (IAA) ที่ช่วยส่งเสริมการงอกของราก เนื่องจากเอมไซม์ IAA เป็นเอมไซม์ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ช่วยการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการยึดตัวของเซลล์ และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ได้ (สุวรรณณี, 2555) สังเกตได้จากความยาวรากแก้วของยางพาราเพิ่มขึ้น 6 เซนติเมตร ที่ระยะเวลา 40 วัน (ตารางที่ 14) รากแก้วมีขนาดใหญ่ มีความแข็งแรง และปริมาณรากฝอยเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 30) รากที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวโดยรวมของราก เพื่อการดูดใช้ธาตุอาหารในดิน และความยาวรากที่เพิ่มขึ้นสามารถเข้าถึงแหล่งอาหารใหม่ ทำให้พืชเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น (Bucio *et al.*, 2003) การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ยังช่วยให้ต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 ที่ปลูกในสภาวะดินเค็ม มีความยาวราก ความสูงของต้นเพิ่มขึ้น (อนุเทพ, 2558) นอกจากนี้การเจริญเติบโตของต้นยางพาราที่เพิ่มขึ้น เช่น ความยาวรากแก้ว ปริมาณรากฝอย ความสูงต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง เป็นต้น เนื่องจากพืชได้รับธาตุอาหารที่มีอยู่ในดิน ขณะที่ธาตุอาหารบางตัว เช่น ธาตุฟอสฟอรัส เมื่อใช้ชีวภัณฑ์ในดิน ทำให้ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มขึ้นทุกๆ เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินค่อยๆ ลดลง (ตารางที่ 18) เป็นไปได้ว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์มีการผลิตเอมไซม์ phosphatase ที่ช่วยปลดปล่อยธาตุฟอสฟอรัสที่อยู่ในดิน ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ให้กับพืช การใช้ชีวภัณฑ์จึงทำให้ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 18 และตารางที่ 23) นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่มของ *Bacillus* ที่อยู่บริเวณรอบรากของต้นยางพารา ยังช่วยย่อยและแปรสภาพธาตุอาหารให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ และต้านทานต่อความเครียดของพืชได้ นอกจากนี้การเจริญเติบโตของพืชที่เพิ่มขึ้น ส่วนหนึ่งพืชได้รับแสงตามธรรมชาติ และคาร์บอนไดออกไซด์จากชั้นบรรยากาศจะถูกดูดซับโดยใบพืช และถูกเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอน คาร์บอนถูกลำเลียงลงสู่รากสูงถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (Stephane *et al.*, 2005) และถูกปลดปล่อยออกไปในดิน ทำให้มีการสะสมอยู่ในดิน บริเวณรอบรากพืช จึงเป็นบริเวณที่มีธาตุอาหารต่างๆ ดินที่มีปริมาณของธาตุอาหารสูง ช่วยในการดึงดูดความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดิน มีผลให้จุลินทรีย์ในรากพืชสูงกว่าในดินมากถึง 100 เท่า แสดงให้เห็นว่ารากของพืชมีการปลดปล่อยสารต่างๆ ออกมานอกเซลล์ราก เพื่อดึงดูดจุลินทรีย์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับพืช ทำให้จุลินทรีย์ถูกดูดซับเข้าไปในรากพืช (Ho *et al.*, 2017) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำที่ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 สังเกตเห็นเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่ในเซลล์รากแก้วของยางพารา (ภาพที่ 31) การใช้ชีวภัณฑ์

*B. subtilis* ไอโซเลท SM1 จึงช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของยางพารา เช่น ความสูงต้น และน้ำหนักของต้นเพิ่มขึ้น

## 7. ผลของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค

เชื้อรา *R. microsporus* เป็นกลุ่มของเชื้อราสาเหตุโรคในดิน ที่เข้าทำลายทางระบบราก โดยเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ Laccase และย่อยสลายเนื้อไม้ต้นยางพารา โดยสามารถย่อยสลายอินทรีย์สาร ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลขนาดต่างๆ และมีความซับซ้อน เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพคติน แป้ง ลิกนิน และสามารถนำคาร์บอนจากองค์ประกอบภายในเซลล์ของพืชมาใช้ เช่น น้ำตาล กรดอินทรีย์ ไตแซคคาไรด์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถนำไนโตรเจนจากสารประกอบเชิงซ้อนของอินทรีย์ไนโตรเจนมาใช้ เพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Kamilova *et al.*, 2006) การเข้าทำลายระบบรากจึงก่อให้เกิดความเสียหาย และเชื้อรายังสามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วเมื่อดินมีความชื้น แสดงให้เห็นว่า การปลูกยางพาราโดยการไม่ใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคเบื้องต้น เชื้อรา *R. microsporus* สามารถเข้าทำลายระบบรากของยางพาราได้ทุกช่วงอายุของการเจริญเติบโต และในระยะรุนแรงระบบรากของยางพาราเกิดความเสียหาย พืชจึงไม่สามารถดูดน้ำและธาตุอาหารในดิน สำหรับการเจริญเติบโตได้ ทำให้ยางยืนต้นตาย (ภาพที่ 35) การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และไม่ละลายน้ำ 3 SM1 เพื่อการควบคุมโรคเบื้องต้น ร่วมกับการใช้ปุ๋ย ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในรากน้อยมาก อยู่ในช่วงระหว่าง 3-12 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 21) จึงสามารถลดการเกิดโรครากขาวในรากได้ 87-96 เปอร์เซ็นต์ เพราะแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถอาศัยอยู่ในดินได้เป็นระยะเวลาเวลานาน (ภาพที่ 30) จึงสามารถยับยั้งหรือมีส่วนช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรค (Gang *et al.*, 2013) ขณะที่การราดเซลล์สดของ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 สามารถลดการเกิดโรครากขาวในส่วนเหนือดินและรากได้ 72.22 และ 65.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ศุภรัตน์, 2564) และการใช้ชีวภัณฑ์ *B. megaterium* สามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าวได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Chumthong *et al.*, 2015) การใช้ชีวภัณฑ์ *Bacillus* สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้ เนื่องจากแบคทีเรียปฏิปักษ์มีการผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อรา เช่น surfactin, fengycin, bacyllomycin, bacilysin, macrolactin และ bacillaene ยังสามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น protease, amylase, lipase (พรพรรณ, 2550), glucanase หรือ proteases, lipopeptides, surfactin หรือ iturin พบว่า *B. subtilis* ไอโซเลท PCL1608 และ PCL1612 สามารถผลิตเอนไซม์ iturin ในการควบคุมโรคพืช และสามารถเข้าครอบครองพื้นที่ได้ดีที่สุด (Cazorla *et al.*, 2007)

อย่างไรก็ตามการใช้ปุ๋ยให้กับต้นยางพาราเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ เมื่อพืชได้รับธาตุอาหารที่เหมาะสม พืชเจริญเติบโตดี มีความต้านทานต่อเชื้อโรคเพิ่มขึ้น (ยุรฉัตร, 2554) ทำให้ความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อรา *R. microsporus* ลดลง ซึ่งการใช้ชีวภัณฑ์สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ร่วมกับการใช้ปุ๋ย 20-8-20 ทำให้ต้นยางพาราสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร 15-15-15 (ภาพที่ 36B) เนื่องจากสัดส่วนของธาตุอาหารที่มีอยู่ในปุ๋ยแตกต่างกัน และการใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* แบคทีเรียช่วยปลดปล่อยธาตุอาหารในดิน โดยเฉพาะฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 23) ทั้งนี้ธาตุอาหารพืชจึงมี



ความสำคัญมาก เช่น ธาตุโพแทสเซียมช่วยลดความไวของพืช ส่งผลให้พืชต้านทานโรคเพิ่มขึ้น (Blachinski *et al.*, 1996) แมงกานีสเป็นธาตุอาหารที่สามารถควบคุมโรคได้หลายชนิดเนื่องจากแมงกานีสมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์, การสังเคราะห์ฟีนอล, ซึ่งทำให้เชื้อราเข้าทำลายได้ยาก (Brennan, 1992) สัตว์ส่วนของไนโตรเจนต่อโพแทสเซียมสูงเกินไป ทำให้ผนังเซลล์พืชบางและเยื่อหุ้มเซลล์อ่อนแอทำให้เชื้อโรคเข้าทำลายได้ง่าย (Perrenoud, 1990; McMahon, 2014) และ สัตว์ส่วนของโพแทสเซียมต่อคลอไรด์ต่ำในเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากการใช้ปุ๋ยที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น ปุ๋ยแอมโมเนียม ทำให้พืชเกิดโรคได้ การใช้แมกนีเซียมและโพแทสเซียมในอัตราสูง ทำให้แคลเซียมในลำต้นลดลงและส่งผลทำให้ความรุนแรงของโรคในลำต้นเพิ่มขึ้น (Prabhu *et al.*, 2007)

## บทที่ 5

### สรุปและข้อเสนอแนะ

#### 1. สรุป

1.1 แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD 3-2 และ *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลท PT7 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* ได้ดี โดย *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 ยับยั้งได้ดีที่สุด

1.2 การนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปใช้ร่วมกับสารประกอบชีวภัณฑ์ ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* เพิ่มขึ้น ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

1.3 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 รูปแบบแกรนูล ประสิทธิภาพของการละลายน้ำ ความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ในระดับที่เหมาะสม การกระจายตัวของแบคทีเรียปฏิปักษ์สม่ำเสมอ และสามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงมากกว่า  $10^9$  โคโลนี ต่อกรัม รวมถึงภายใต้รังสี UVC และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* ได้ผลดี

1.4 การใช้ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรละลายน้ำ 1 SM1 และสูตรไม่ละลายน้ำ 3 SM1 ในโรงเรือนทดลอง ทำให้การงอกของราก การเจริญเติบโตของยางพารา และการละลายฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเพิ่มขึ้น ซึ่งการใช้ปุ๋ยให้กับต้นยางพาราร่วมกับการใช้ชีวภัณฑ์ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสามารถลดการเกิดโรคได้ 80-100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในส่วนเหนือดินและรากของยางพารา

#### 2. ข้อเสนอแนะ

การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ นอกจากจะต้องพัฒนาชีวภัณฑ์ให้อยู่ในรูปที่เก็บรักษาได้ง่าย สะดวกต่อการขนส่ง สารประกอบในสูตรชีวภัณฑ์ต้องสามารถช่วยยึดอายุแบคทีเรีย ปกป้องเซลล์หรือแม้แต่เป็นแหล่งของอาหาร เมื่อนำชีวภัณฑ์ไปใช้แล้วแบคทีเรียปฏิปักษ์ยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ดีในระดับหนึ่ง และไม่ส่งผลกระทบต่อพืช สัตว์ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม การใช้ชีวภัณฑ์ควบคุมโรคจึงเป็นแนวทางหนึ่งของการควบคุมแบบชีววิธี ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในอนาคต เนื่องจากช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมี ช่วยลดต้นทุนการผลิต แต่การใช้ชีวภัณฑ์เพียงอย่างเดียวในการควบคุมโรคหรือยับยั้งโรครากขาวของยางพารา จากเชื้อสาเหตุ *R. microsporus* จะไม่เกิดประสิทธิภาพมากนัก หากผู้ปลูกไม่ได้จัดการปุ๋ยที่เหมาะสมให้กับต้นยางพารา จึงควรมีการใช้ปุ๋ยให้กับยางพารา เพื่อให้ต้นยางพาราเจริญเติบโต แข็งแรง ซึ่งเป็นปัจจัย

หนึ่งที่เชื้อสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายได้ยาก นอกจากนี้การนำชีวภัณฑ์ไปใช้ในพื้นที่ที่มีความแตกต่างกันควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

### เอกสารอ้างอิง

- กุศล ถมมา และพิศาล ศิริธร. 2556. ชีวภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิบัศ์ *Bacillus subtilis* B076 เพื่อการเคลือบเมล็ดและพ่นทางใบเพื่อควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. แก่นเกษตร 1: 339-345.
- การยางแห่งประเทศไทย. 2564. ข้อมูลวิชาการยางพารา. กรุงเทพมหานคร: สถาบันวิจัยยาง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ: ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จักรพันธ์ ศิริธัญญาลักษณ์. 2538. ยาเม็ด. เชียงใหม่: การผลิตวิจัยและพัฒนา ภาควิชาเทคโนโลยี เกษษกรรม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- จรัสศรี นवलศรี, อยุทธ์ นิสสภา, เสมอใจ ชื่นจิตต์, สมปอง เตชะโต, อารมณ โรจน์สุจิตร, วสันต์ เพชรรัตน์, สายัณห์ สดุดี, ปฎิมาพร ปลอดภัย, อิบรอเฮม ยีดา, กษมา เชิงฉลาด, สุณีรัตน์ วัฒนาศิลากรณ์, ยุพากรณ์ ศิริโสม และสุนทรียา กาละวงศ์. 2556. การคัดเลือกและการขยายพันธุ์ต้นตอยางพาราที่ต้านทานโรครากขาว และการควบคุมโดยชีววิธี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์พรานนการพิมพ์.
- นุชนารถ กังพิสดาร. 2554. คำแนะนำการใช้ปุ๋ยยางพาราปี 2554. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร.
- นิวัตร วรรณนิธกุล และเบญจรงค์ จิรเศวตกุล. 2549. Crop requirement ยางพารา. กรุงเทพฯ: กลุ่มส่งเสริมการผลิตยางพาราและปาล์มน้ำมัน สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร.
- ปฎิมาพร ปลอดภัย, เสมอใจ ชื่นจิตต์ และวสันต์ เพชรรัตน์. 2551. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อราบางชนิดโดยชีววิธี. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร 39: 185-188.

- ปัทมวรรณ มณีสุวรรณ และพิศาล ศิริจร. 2556. ผลของแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* BFP011 ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. แก่นเกษตร 1: 327-332.
- ปวีณา สังข์แก้ว. 2556. สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Streptomyces griseus* subsp. *Formicus* สำหรับการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปวีณา สังข์แก้ว, เสมอใจ ชื่นจิตต์ และวสันต์ เพชรรัตน์. 2555. การคัดเลือกและเตรียมสูตรสำเร็จเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* เพื่อควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา. วิทยาศาสตร์เกษตร 43: 21-24.
- ผาสุก เปี่ยมสุวรรณมาศ. 2548. สารยับยั้งสปอร์ P.l larvae จากแบคทีเรียและแนวโน้มการประยุกต์ใช้ควบคุมโรคคอเมริก้านพาล์วบรูต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พรทิพย์ แยมสุวรรณ. 2557. การคัดเลือกกลไกการเป็นปฏิปักษ์และการประยุกต์ใช้เชื้อรา *Tricho derma harzianum* Rifai เพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พรพรรณ อู่สุวรรณ. 2550. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- มนต์ชูลี นิติน. 2534. ยาเม็ด. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอ. เอส. ฟรินตังเฮาส์.
- มณจันทร์ เมฆธน และอมรรรัตน์ ทศนกิจ. 2539. การศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ *B. subtilis* AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืชในหนุ่ถักจักร. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ:
- มานะ กาญจนมณีเสถียร, อัจฉรา เฟื่องหนู, ถศิกร วิวัฒน์ปฐพี และวานิด รอดเนียม. 2556. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร.

- ยุรฉัตร ยอดโยธี. 2554. การชักนำการต้านทานโรคและการแสดงออกของยีน PR-1 ในยางพารา โดยใช้ตัวกระตุ้นชนิดต่างๆ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วิภาวรรณ เชื้อทอง, ฐิติ แก้วกับทอง, ธัญชนก สายสุนทร และกนกพร เพชรดี. 2556. การทดสอบความเป็นพิษของสารชีวภัณฑ์ Biobest, Larminar และ Trisan ในไก่อเนื้อ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วคินี อินศฤงคาร และปฎิมาพร ปลอดภัย. 2559. การใช้เชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* เพื่อลดการเกิดโรครากขาวของยางพารา. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 3: 1-8.
- วานิด รอดเนียม. 2552. การคัดเลือกและเตรียมสูตรสำเร็จ *Bacillus subtilis* เพื่อควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจาก *Alternaria longipes* ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการทรัพยากรดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ศักดิ์อนันต์ แซ่ลิ้ม. 2553. การตอบสนองทางสรีระวิทยาของยางพาราภายใต้ระบบกรีดแบบ DCA และระบบกรีดแบบรอยกรีดเดียวในจังหวัดสงขลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ศิริพร ทิพย์สิงห์, สติത്യ พันวิไล, จรัญ ประจันบาล และรัชฌู เมยตง. 2019. ประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. จากดินจอมปลวกในการต้านรา *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุของโรคผลเน่าในฝรั่ง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยศิลปากร 6: 1-14.
- ศุภรัตน์ สังข์ทอง. 2564. แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพารา (*Hevea brasiliensis*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการทรัพยากรดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุจินต์ แมนเหมือน. 2553. ข้อมูลวิชาการยางพารา. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สุชาติ สงวนพันธุ์, ภคอร อัครมธุรากุล และนวลจันทร์ พารักษา. 2560. การศึกษาประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะ (*Bacillus subtilis*) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และผลต่อสมรรถภาพการผลิตของไก่อเนื้อ. แก่นเกษตร 45: 255-262.

สิทธิชัย บุญมณี. 2556. เปรียบเทียบการใช้ปุ๋ยตามค่าทดสอบดินและปุ๋ยเชิงผสมสูตร 20-8-20 ในยางพาราก่อนเปิดกรีด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการทรัพยากรดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุภัทร์ อิศรางกูร ณ อยุธยา, อโนมา ดงแดนสุข, รวมชาติ แต่พงษ์โสรัถ และธีระยุทธ นาคแดง. 2550. ความสัมพันธ์ของสภาพภูมิอากาศกับการเจริญเติบโตของยางพารา พันธุ์ RRIM 600 ที่ปลูกภายใต้ระบบการให้น้ำ. เกษตร 35: 118-125.

สุภาภรณ์ เอี่ยมแข่ง และมารีนา ทารง. 2557. การควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* สาเหตุโรครากขาวในยางพารา (*Havea brasiliensis* Muell. Arg). เกษตร 42: 686-692.

สมใจ เอี่ยมพรรัตน์. 2531. ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ที่แยกได้และผลของสารปฏิชีวนะ ต่อการยับยั้งการเจริญของבקเตรีทำให้เกิดโรคในสัตว์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรางค์ สุธิราวุธ. 2538. การศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของ EM: การศึกษา Lactic acid bacteria. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุวรรณณี แทนธานี. 2555. จุลินทรีย์เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงบำรุงดิน. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ 60: 36-39.

สายทอง แก้วฉาย. 2556. โรครากขาวของยางพารา และการป้องกันกำจัด. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ 5 : 118-131.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. ข้อมูลการผลิตยางพารา ปี 2564. 2564. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

หทัยกานต์ นวลแก้ว. 2557. สถานะธาตุอาหารหลักและการใช้ปุ๋ยกับยางพาราที่ปลูกในพื้นที่ลุ่ม และที่ดอนในจังหวัดสงขลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการทรัพยากรดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อัจฉรา เพ็งหนู, ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี, มานะ กาญจนมณีเสถียร, วิภาพร โรจนรัตน์ และวานิด รอดเนียม. 2550. พัฒนาเทคโนโลยีสูตรสำเร็จ *Bacillus megaterium* แบบเม็ดเพื่อควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. โครงการวิจัยย่อยที่ 9 ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีแห่งชาติภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 166-189.

อนุเทพ ภาสุระ. 2558. การใช้ชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวที่ปลูกในสภาวะดินเค็มจากน้ำทะเล. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา.

อัจฉรา อุทิศวรรณกุล. 2536. รูปแบบเกสรภัณฑ์. กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุบลวรรณ พลทวีชัย. 2564. ผลของไนโตรเจนและแมงกานีสร่วมกับ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SM1 ต่อ *Rigidoporus microporus* สายพันธุ์ NK6 สาเหตุโรครากขาวของยางพารา (*Hevea brasiliensis*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการทรัพยากรดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

อุยर्थ นิสสกา และเสมอใจ ชื่นจิตต์. 2554. การประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากโรครากขาวในยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อารมณั์ วิจารณ์สุจิตร์, สายใจ สุชาติกุล, วสันต์ เพชรรัตน์ และเสมอใจ ชื่นจิตต์. 2552. ลักษณะทางสรีรวิทยาและแนวทางควบคุมเชื้อราโรครากขาวยางพารา. รายงานวิจัยสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. 202-121.

Ajilogba, F.C., Babalola, O.O. and Ahmad, F. 2013. Antagonistic effects of *Bacillus* species in biocontrol of tomato fusarium wilt. *Ethnomedicine*. 7: 205-216.

Aleksic, S.V., Nielsen, E.J., Boskovic, A. 2019. Organizational prerequisites for knowledge creation and sharing: empirical evidence from Serbia. *Journal of Knowledge Management*. 23(8): 1543-1565.

Bennama, R., Ladero, V., Alvarez, A.M., Fernandez, M. and Bensoltane, A. 2012. Influence of lactose and sucrose on growth and acetaldehyde production by three strains of *Streptococcus thermophilus*. *Applied Life Sciences*. 10: 223-228.



- Blachinski, D., Shtienberg, D., Dinoor, A., Kafkafi, U., Sujkowski, L.S., Zitter, T.A. and Fry, W.E. 1996. Influence of foliar application of nitrogen and potassium on *Alternaria* diseases in potato, tomato and cotton. *Phytoparasitica*. 24: 281-292.
- Boas, V.L.A., Vilas-Boas, G.F.L.T., Saridkis, H.O., Lemos, M.V.F., Lereclus B. and Arantes, O.M.N. 2000. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. *FEMS Microbiology Ecology*. 31: 255-259.
- Brennan, R.F. 1992. The role of manganese and nitrogen nutrition in the susceptibility of wheat plants to take all in western Australia. *Fertilizer Research*. 31: 35-41.
- Bucio, L.J., Cruz-Ramirez, A. and Estrella, H.H. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Plant Biology*. 6: 280-287.
- Cazorla, F.M., Romero, D., Perez-Garcia, A., Lugtenberg, B.J.J., de Vicente, A. and Bloem-berg, G. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Applied Microbiology*. 103: 1950-1959.
- Chamswang, C., Intanoo, W. and Noisai, B. 2018. Efficacy of biological products of *Bacillus siamensis* RRK1-Rif for reducing sheath blight and dirty panicle of rice. *Thai Journal of Agricultural Science*. 49(1): 1-14.
- Chuang, J.J., Huang, Y.Y., Lo, H.S., Hsu, F.T., Huang, Y.W., Huang, L.S. and Lin, S.Y. 2017. Effects of pH on the shape of alginate particles and its release behavior. *Polymer Science*. 1-9.
- Chumthong, A., Wiwattanapatapee, R., Viernstein, H., Pengnoo, A., Kanjanamaneesathian, M. 2016. Spray-dried powder of *Bacillus megaterium* for control of rice sheath blight disease: Formulation protocol and efficacy testing in laboratory and greenhouse. *Cereal Research Communications*. 44(1): 131-140.
- Dzyadevych, S. and Renault, J.N. 2014. Conductometric biosensors. *Biological Identification*. 153-193.

- Ferreira, L.H.P.L., Suzuki, M.T., Itano, E.N., Ono, M.A. and Arantes, O.M.N. 2003. Ecological aspects of *Bacillus thuringiensis* in an oxisol. *Scientia Agricola*. 60: 19-22.
- Gang, L.X., Zhang, L.T., Wang, X.X., Hua, K., Zhao, L. and Han, Z. 2013. The composition of root exudates from two different resistant peanut cultivars and their effects on the growth of soil-borne pathogen. *Biological Sciences*. 9 (2): 164-173.
- Gao, D., Liu, L., Liang, H. and Wu, M.W. 2011. Aerobic granular sludge: characterization, mechanism of granulation and application to wastewater treatment. *Biotechnology*. 31(2): 137-152.
- Garcia, L.R. 2017. Microbial Community Assembly During Aerobic Granulation. Department of Civil and Environmental Engineering. Chalmers University of Technology Gothenburg, Sweden.
- Goldman, P.R. and Travisano, M. 2011. Experimental evolution of ultraviolet radiation resistance in *Escherichia Coli*. *Evolution*. 65(12): 3486-3498.
- Henner, D.J. and Hoch, J. A. 1980. The *Bacillus subtilis* chromosome. *Microbiol Reviews*. 44: 57-82.
- Ho, N.Y., Mathew, C.D. and Huang, C.C. 2017. Plant-microbe ecology: Interactions of plants and symbiotic microbial communities. *Plant Ecology*. 13: 93-119.
- Inglis, G.D., Johnson, D.L. and Goettel, M.S. 2010. Effect of bait substrate and formulation on infection of grasshopper nymphs by *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*. 6(1): 35-50.
- Jayasinghe, C. K. 2010. White root disease of rubber tree: An overview. Proceedings of international workshop on white root rot disease of *Hevea* rubber. Colombo, Sri-Lanka. 1-8.

- Jongjeen, J. and Aoki, S.K. 2010. Screening of proteolytic and chitinolytic *Bacillus* spp. isolated from soil. *Agricultural Science Journal*. 41(3): 317-320.
- Juan, C.M.A., Claudia, C.M., Pedro, S.P., Roberto, G.D. and Ignacio, E.M.M. 2016. Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. *Microbiology and Biotechnology*. 32(5): 1-10.
- Kaewchai, S. and Soyong, K. 2010. Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees. *Agricultural Technology*. 6: 349-363.
- Kamilova, F., Kravchenko, V.L., Shaposhnikov, I.A., Azarova, T., Makarova, N. and BLugtenberg, B. 2006. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19(3): 250-266.
- Khan, S., Bagwan, N.B., Iqbal, A.M. and Tamboli, R.R. 2011. Mass multiplication and shelf life of liquid fermented final product of *Trichoderma viride* in different formulations. *Advances in Biological Research*. 2(1): 178-182.
- Khedherab, S.B., Trabelsib, B.M. and Tounsia, S. 2021. Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control*. 152: 104-144.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. and Stalpers, J.A. 2008. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10<sup>th</sup> ed. Wallingford, UK: CAB International Press.
- Kositsup, B., Montpied, P., Kasemsap, P., Thaler, P., Ameglio, T. and Dreyer, E. 2009. Photosynthetic capacity and temperature responses of photosynthesis of rubber trees (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.) acclimate to changes in ambient temperatures. *Trees*. 23: 357-365.

- Kpindou, D.O.K., Godonou, I. and Houssou, A. 1995. Control of *Zonocerus variegatus* by ultra-low volume application of an oil formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Bioscience and Technology*. 5: 131-139.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Godonou, I., Kpindou, D., Shah, P.A., Paraiso, A. and Prior, C. 1993. Field infection of *Zonocerus variegatus* following application of an oil-based formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Science and Technology*. 3: 337-346.
- Mark, A.J., Shasha, B.S. and Schisler, D.A. 1996. Formulation of *Collectotrichum truncatum* microsclerotia for improved biocontrol of the weed hemp sesbania (*Sesbania exaltata*). *Biocontrol*. 7: 107-113.
- McKenney, P.T., Driks, A., and Eichemberger, P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*. 11: 33-44.
- Mcmahon, D.G., Iuvone, P.M. and Tosini, G. 2014. Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*. 39-58.
- Modugno, C., Paterson, A.H.J., McLeod, J. 2015. Lactose caking: influence of the particle size distribution and the water content. *Procedia Engineering*. 102: 114-122.
- Moore, W.C., McKoy, J., Valle, R.D., Armstrong, D., Bernard, M.E., Katz, M., and Gordon, E.R. 2003. Fungal cell wall septation and cytokinesis are inhibited by bleomycins. *Chemotherapy*. 47(10): 3281-3289.
- Morton, D.J. and Stroube, W.H. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 45: 417-420.
- Nam, H.M., Park, S.M., Kim, G.H. and Yoo, J.S. 2009. Biological control of strawberry fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation. *Microbiology and Biotechnology*. 19(5): 520-524.

- Nandris, D., Nicole, M. and Geiger, J.P. 1987. Root rot disease of rubber trees. *Plant Disease*. 71: 298-306.
- Nannan, C., QuynhVu, H., Gillis, A., Caulier, S., ThiNguyen, T.T. and Mahillon, J. 2021. Bacilysin within the *Bacillus subtilis* group: gene prevalence versus antagonistic activity against gram-negative foodborne pathogens. *Journal of Biotechnology*. 327(10): 28-35.
- Navarrete, S.J., Perez, R.J.N., Trejo, G.A. and Garibay, T.D.J. 2020. Simplified modeling of *E. coli* mortality after genome damage induced by UV-C light exposure. *Scientific Reports*. 1-15.
- Omorusi, V.I. 2012. Effects of white root rot disease on *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.) challenges and control approach. *Plant Science* 1: 139-152.
- Omorusi, V.I., Eguavoen, O.I., Ogbebor, N.O., Bosah, B.O., Orumwense, K. and Ijie, K. 2014. Control of white root rot disease in rubber plantations in Nigeria. *International Journal of Microbiology and Immunology Research*. 3: 046-051.
- Pengnoo, A., Kusongwiriawong, C., Nilratana, L. and Kanjanamaneesathian, M. 2000. Greenhouse and field trials of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*. 45: 245-256.
- Pengnoo, A., Winattanapattapee, R., Chumthong, A. and Kanjanamaneesathian, M. 2006. Bacterial antagonist as seed treatment to control leaf blight disease of bambara groundnut (*Vigna subterranea*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 9-14.
- Pereira, R.V., Bicalho, M.L., Machado, V.S., Lima, S., Teixeira, A.G., Warnick, L.D. and Bicalho, R.C. 2015. Evaluation of the effects of ultraviolet light on bacterial contaminants inoculated into whole milk and colostrum, and on colostrum immunoglobulin. *Dairy Science*. 97(5): 2866-2875.
- Perrenoud, Ph. 1990. *La construcción del éxito y el fracaso escolar*. Madrid: Morata

- Rabbee, M.F., Ali, M., Choi, J., Hwang, B.S., Jeong, S.C. and Baek, K.H. 2019. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*. 24(6): 1046-1059.
- Prabhu, A.S., Fageria, N.K. and Huber, D.M. 2007. Potassium nutrition and plant diseases. In: Datnoff, L.E., Elmer, W.H., Huber, D.M., editors. *Mineral nutrition and Plant Disease*. American Phytopathological Society; Saint Paul, MN, USA. 57-78.
- Rastogi, P., Richa, R., Kumar, A., Tyagi, B.M. and Sinha, P.R. 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Nucleic Acids*. 1-32.
- Ring, D.T., Oliveira, J.C.O. and Crean, A. 2011. Evaluation of the influence of granulation processing parameters on the granule properties and dissolution characteristics of a modified release drug. *Advanced Powder Technology*. 22(2): 245-252.
- Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I. and Chambliss, G.H. 1998. *Bacillus*. In: Balows, A and duerden, BI (Eds.), *Systematic bacteriology*. (9<sup>th</sup> Edn.), London, Arnold Press. 709-720.
- Saelim, S., Nakkanong, K. and Nualsri, C. 2015. Monitoring genetic variation in RRIM 600 and RRIT 251 rubber clones by HAT-RAPD marker. *Songklanakarin Journal of Plant Science*. 2(1): 34-37.
- Satinder, K. B., Verma, M., Tyagi, R. D. and Valero, J.R. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*. 41: 323-342.
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W. and Jackson, M.A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*. 94: 1267-1271.
- Segale, L., Giovannelli, L., Mannina, P. and Pattarino, F. 2016. Calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads containing celecoxib solubilized in a self-emulsifying phase. *Scientifica*. 1-8.

- Setlow, P. 2014. Germination of spores of *Bacillus* Species: What we know and do not know. *Bacteriol.* 196(7): 1297-1305.
- Shanmugam, S. 2015. Granulation techniques and technologies: recent progresses. *BiolImpacts.* 5(1): 55-63.
- Song, M., Yun, Y.H. and Kim, H.Y. 2014. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium cf. incarnatum*. *Journal of Ginseng Research.* 38: 136-145.
- Stephane, C., Brion, D., Jerzy, N., Christophe, C. and Essaid, A.B. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases : Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied Environmental Microbiology.* 10: 4951-4959.
- Stoeckel, M., Westermann, C.A., Atamer, Z. and Hinrichs, J. 2013. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores in infant formula under shear conditions. *Dairy Science and Technology.* 93: 163-175.
- Stojanovic, S.S., Karabegovic, I., Beskoski, V., Nikolic, N. and Lazic, M. 2019. *Bacillus* based microbial formulations: Optimization of the production process. *Hemijaska Industrija.* 73(3): 169-182.
- Szekalska, M., Pucibowska, A., Szymanska, E., Ciosek, P. and Winnicka, K. 2016. Alginate: Current use and future perspectives in pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Polymer Science.* 8: 1-17.
- Takada, A., Matsushita, K., Horioka, S., Furuichi, Y. and Sumi, Y. 2017. Bactericidal effects of 310 nm ultraviolet light-emitting diode irradiation on oral bacteria. *BioMed Central Oral Health.* 1-10.
- Takeuchi, H., Yasuji, T., Yamamoto, H. and Kawashima. Y. 2000. Spray-dried lactose composite particles containing an ion complex of alginate-chitosan for designing a dry-coated tablet having a time-controlled releasing function. *Pharmacy Research.* 17: 4-99.

- Ting, A.S.Y., Fang, M.T. and Tee, C.S. 2010. An *in vitro* assessment on the efficacy of clay-based formulated cells of *Pseudomonas* isolate UTAR EPA2 for petrol degradation. *American Journal of Applied Sciences*. 7(2): 178-184.
- Tjamos, E.C. and Fravel, D.R. 1995. Detrimental effects of sublethal heating and *Talaromyces flavus* on microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*. 85: 388-392.
- Viviana, Y.M., Houda, Z., Inmaculada, V., Rosario, T., Josep, U., Antonio, d.V., Alejandro, P.G. and Neus, T. 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*. 132(4): 609-619.
- Vries, D.P.Y. 2006. *Bacillus cereus* Spore Formation, Structure and Germination. Wageningen Universiteit.
- Vuyst, L. and Vin, F. 2007. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Chemistry to Systems Biology*. 2: 477-519.
- Wijayasinghe, R., Bogahawaththa, D., Huppertz, T., Chandrapala, J. and Vasiljevic, T. 2019. Influence of lactic, citric and phosphoric acids on the properties of concentrated lactose solutions. *Food Chemistry*. 247-253.
- Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A., Pengnoo, A., Kanjanamaneesathian, M. 2007. Effervescent fast-disintegrating bacterial formulation for biological control of rice sheath blight. *Controlled Release*. 119(2): 229-235.
- Zhang, J.X., Xue, A.G. and Tambong, J.T. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Disease*. 93: 1317-1323.
- Zhang, Y., Yu, W., Lv, G., Zhu, J., Wang, W., Ma, X. and Liu, X. 2011. The artificial organ: Cell Encapsulation. *Biomedical Sciences*. 5: 99-114.



ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. Nutrient agar (NA)

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

## 2. Potato dextrose agar (PDA)

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

### ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเจริญของแบคทีเรียปฏิชีวนอาหาร PDA ที่ผสมสารพา

สารพา	ปริมาณแบคทีเรียปฏิชีวน (โคโลนี ต่อมิลลิเมตร)		
	<i>B. subtilis</i> (SM1)	<i>B. subtilis</i> (LPDD3-2)	<i>B. amyloliquefaciens</i> (PT7)
control PDA (SM1)	$5.7 \pm 2.8 \times 10^7$ e	$9.7 \pm 2.4 \times 10^7$ c	$2.2 \pm 2.4 \times 10^4$ f
bentonite	$5.9 \pm 2.3 \times 10^{10}$ a	$8.6 \pm 1.3 \times 10^9$ a	$2.1 \pm 1.3 \times 10^7$ a
kaolin	$8.5 \pm 2.0 \times 10^9$ b	$6.7 \pm 2.1 \times 10^9$ a	$3.2 \pm 2.1 \times 10^4$ e
lactose	$5.5 \pm 2.1 \times 10^9$ c	$8.6 \pm 2.1 \times 10^9$ a	$1.7 \pm 1.0 \times 10^6$ c
modified starch	$5.7 \pm 1.5 \times 10^7$ e	$4.2 \pm 1.3 \times 10^6$ d	$4.2 \pm 1.2 \times 10^3$ g
rice starch	$8.9 \pm 2.3 \times 10^9$ b	$8.3 \pm 2.7 \times 10^9$ a	$3.3 \pm 2.1 \times 10^6$ b
cassava starch	$7.6 \pm 1.0 \times 10^8$ d	$7.6 \pm 1.0 \times 10^8$ b	$2.6 \pm 1.1 \times 10^5$ d
corn starch	$9.4 \pm 2.4 \times 10^9$ b	$8.1 \pm 2.0 \times 10^9$ a	$1.6 \pm 1.0 \times 10^6$ c
T-test	**	**	**
C.V. (%)	0.59	0.70	1.15

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางภาคผนวกที่ 2 ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD 3-2 สูตรละลายน้ำ ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในดินผสม

สูตรชีวภัณฑ์	การเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> (เซนติเมตร)						
	3 วัน	5 วัน	7 วัน	9 วัน	11 วัน	13 วัน	
1. ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 5 และ 11 ซม. (A)	ละลายน้ำ 1 SM1	0.87 a	1.68 a	2.47 a	3.13 a	3.69 ab	4.04 a
	ละลายน้ำ 2 SM1	1.12 b	1.89 ab	2.68 ab	3.45 a	3.57 a	4.17 ab
	ละลายน้ำ 3 SM1	1.19 bc	2.27 bc	3.17 bc	3.62 a	4.27 abc	4.90 bc
	ละลายน้ำ 1 LPDD 3-2	1.39 cd	2.32 bc	3.15 bc	3.51 a	3.78 ab	4.96 bc
	ละลายน้ำ 2 LPDD 3-2	1.27 bc	2.36 bc	3.46 c	3.87 a	4.38 bc	5.05 c
	ละลายน้ำ 3 LPDD 3-2	1.27 bc	2.56 c	3.76 cd	3.84 a	4.48 c	5.06 c
	ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	1.60 d	2.77 c	4.12 d	5.73 b	7.50 d	9.17 d
	C.V. (เปอร์เซ็นต์)	9.68	11.59	9.98	8.26	5.90	5.81
T-test	*	*	*	*	*	*	
2. ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความสูง 11 ซม. (B)	ละลายน้ำ 1 SM1	1.42 a	3.02 a	4.51 a	5.53 a	6.05 a	6.71 a
	ละลายน้ำ 2 SM1	1.50 a	3.35 ab	4.92 ab	5.63 a	6.15 a	6.88 bc
	ละลายน้ำ 3 SM1	1.54 a	3.34 ab	5.03 bc	5.95 ab	6.54 ab	7.19 bc
	ละลายน้ำ 1 LPDD 3-2	1.81 bc	3.68 bc	5.55 cd	6.59 c	7.16 b	7.87 b
	ละลายน้ำ 2 LPDD 3-2	1.90 cd	3.69 bc	5.33 bc	6.42 bc	6.74 ab	7.26 ab
	ละลายน้ำ 3 LPDD 3-2	1.64 ab	3.55 b	5.40 bcd	6.47 bc	7.10 b	7.87 b
	ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	2.07 d	4.04 c	5.91 d	7.12 d	8.27 c	10.74 c
	C.V. (เปอร์เซ็นต์)	7.94	6.33	5.61	4.76	5.81	5.84
T-test	*	*	*	*	*	*	

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.05$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวกที่ 3 ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และ LPDD 3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในดินผสม

สูตรชีวภัณฑ์	การเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i> (เซนติเมตร)					
	3 วัน	5 วัน	7 วัน	9 วัน	11 วัน	
1. ใช้ชีวภัณฑ์ผสมตุ๊กเต้ กับดิน (A)	ไม่ละลายน้ำ 1 SM1	1.14 b	1.81 c	2.24 bc	2.57 ab	3.12 ab
	ไม่ละลายน้ำ 2 SM1	1.40 c	2.36 d	2.82 d	3.38 c	3.87 bc
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1	0.90 a	1.25 a	1.95 a	2.26 a	2.65 a
	ไม่ละลายน้ำ 1 LPDD 3-2	1.17 b	1.84 c	2.40 c	2.83 b	3.65 bc
	ไม่ละลายน้ำ 2 LPDD 3-2	1.50 d	2.48 d	2.96 d	3.51 c	4.29 c
	ไม่ละลายน้ำ 3 LPDD 3-2	1.10 b	1.56 b	2.02 ab	2.45 ab	3.17 ab
	ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	2.29 e	4.47 e	6.12 e	8.42 d	11.00 d
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	2.76	2.12	3.01	3.81	5.48	
T-test	*	*	*	*	*	
2. ใช้ชีวภัณฑ์ที่ระดับความ สูง 2, 5 และ 8 ซม. (B)	ไม่ละลายน้ำ 1 SM1	1.68 b	1.87 ab	1.96 abc	2.08 abc	2.53 ab
	ไม่ละลายน้ำ 2 SM1	1.80 c	1.98 bc	2.09 bc	2.41 c	3.09 bc
	ไม่ละลายน้ำ 3 SM1	1.53 a	1.74 a	1.77 a	1.93 a	2.20 a
	ไม่ละลายน้ำ 1 LPDD 3-2	1.87 c	2.08 cd	2.13 c	2.31 bc	2.74 abc
	ไม่ละลายน้ำ 2 LPDD 3-2	1.88 c	2.16 d	2.37 d	2.80 d	3.14 c
	ไม่ละลายน้ำ 3 LPDD 3-2	1.65 bc	1.90 b	1.90 bc	1.99 ab	2.35 a
	ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	2.26 d	4.10 e	5.81 e	8.01 e	11.00 d
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	3.72	2.44	2.31	2.85	3.36	
T-test	*	*	*	*	*	

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ \* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.05$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางภาคผนวกที่ 4 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน

ชีวภัณฑ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microsporus</i>				
	0 (เดือน)	3 (เดือน)	6 (เดือน)	9 (เดือน)	12 (เดือน)
ละลายน้ำ 1 SM1	98.60±2.80	98.48±3.05	95.68±5.58	95.40±5.69	94.30±5.12
ละลายน้ำ 2 SM1	98.60±2.80	97.08±5.85	93.08±5.25	92.35±6.16	93.05±5.31
ละลายน้ำ 3 SM1	97.93±4.15	96.38±5.54	91.38±5.83	90.55±6.34	90.40±6.70
ละลายน้ำ 1 LPDD3-2	98.48±3.05	97.23±5.55	94.03±6.90	94.30±6.59	93.75±7.31
ละลายน้ำ 2 LPDD3-2	98.20±3.60	96.83±4.43	91.40±5.76	90.28±4.15	89.70±7.05
ละลายน้ำ 3 LPDD3-2	97.93±4.15	96.10±4.85	91.68±5.55	88.08±4.80	85.95±3.07
ชุดควบคุม	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T-test	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	3.82	5.53	6.78	6.19	6.52

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ  
 \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางภาคผนวกที่ 5 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microsporus* หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน

ชีวภัณฑ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microsporus</i>				
	0 (เดือน)	3 (เดือน)	6 (เดือน)	9 (เดือน)	12 (เดือน)
ละลายน้ำ 1 SM1	98.05±3.90	97.50±5.00	97.08±5.85	95.55±5.80	90.13±2.86a
ละลายน้ำ 2 SM1	97.93±4.15	97.23±5.55	92.23±5.51	90.53±2.90	88.08±1.65a
ละลายน้ำ 3 SM1	98.33±3.35	97.23±5.55	91.68±5.55	90.40±4.54	86.68±2.75ab
ละลายน้ำ 1 LPDD3-2	97.78±4.45	96.40±5.24	94.30±6.59	91.13±6.00	86.53±3.17ab
ละลายน้ำ 2 LPDD3-2	98.60±2.80	95.83±5.32	91.25±5.85	90.40±3.17	82.50±1.29b
ละลายน้ำ 3 LPDD3-2	97.65±4.70	96.13±5.24	94.15±6.76	90.25±4.75	82.48±2.35b
ชุดควบคุม	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T-test	ns	ns	ns	ns	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	4.02	5.50	6.46	5.12	2.83

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ  
 \*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางภาคผนวกที่ 6 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน

ชีวภัณฑ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i>				
	0 (เดือน)	3 (เดือน)	6 (เดือน)	9 (เดือน)	12 (เดือน)
ละลายน้ำ 1 SM1	98.33±3.35	96.25±4.60	97.20±3.23	90.00±3.76a	84.45±1.42
ละลายน้ำ 2 SM1	97.78±4.45	97.23±5.55	88.45±0.30	88.88±3.10ab	82.38±3.23
ละลายน้ำ 3 SM1	97.93±4.15	97.23±5.55	89.58±3.29	86.55±1.72ab	82.23±5.04
ละลายน้ำ 1 LPDD3-2	97.50±5.00	96.53±6.95	91.38±3.22	85.55±1.42ab	83.48±1.38
ละลายน้ำ 2 LPDD3-2	97.35±5.30	97.23±5.55	91.25±5.85	84.70±0.60b	81.68±2.08
ละลายน้ำ 3 LPDD3-2	98.05±3.90	96.53±6.95	91.25±5.85	86.25±0.68ab	81.93±1.65
ชุดควบคุม	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T-test	ns	ns	ns	**	ns
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	4.51	6.11	4.47	2.55	3.38

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางภาคผนวกที่ 7 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน

ชีวภัณฑ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i>				
	0 (เดือน)	3 (เดือน)	6 (เดือน)	9 (เดือน)	12 (เดือน)
ไม่ละลายน้ำ 1 SM1	98.75±2.50	96.10±5.05	92.20±6.27	91.78±5.51	85.00±2.77ab
ไม่ละลายน้ำ 2 SM1	97.23±5.55	95.98±5.27	92.93±6.67	87.38±2.37	84.03±3.45b
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1	98.60±2.80	96.53±6.95	94.03±6.93	94.30±6.59	89.33±1.67a
ไม่ละลายน้ำ 1 LPDD3-2	97.93±4.15	95.98±4.78	88.60±0.35	87.78±1.87	81.80±0.84b
ไม่ละลายน้ำ 2 LPDD3-2	98.05±3.90	97.23±5.55	89.30±5.62	87.65±4.65	83.45±0.68b
ไม่ละลายน้ำ 3 LPDD3-2	98.05±3.90	96.68±4.45	91.53±5.66	88.48±0.53	85.98±2.30ab
ชุดควบคุม	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T-test	ns	ns	ns	ns	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	4.00	5.60	6.25	4.66	2.58

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางภาคผนวกที่ 8 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ *B.subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน

ชีวภัณฑ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i>				
	0 (เดือน)	3 (เดือน)	6 (เดือน)	9 (เดือน)	12 (เดือน)
ไม่ละลายน้ำ 1 SM1	97.93±4.15	97.23±5.55	95.00±6.21	91.68±5.55	84.03±1.56ab
ไม่ละลายน้ำ 2 SM1	98.48±3.05	96.53±4.72	91.65±5.58	89.88±6.96	81.38±1.88b
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1	97.78±4.45	96.10±4.85	94.45±6.41	92.90±5.47	87.65±1.46a
ไม่ละลายน้ำ 1 LPDD3-2	98.75±2.50	95.83±5.32	91.68±5.55	91.25±6.32	83.60±1.32ab
ไม่ละลายน้ำ 2 LPDD3-2	97.93±4.15	95.00±5.94	90.28±6.68	90.40±2.76	80.43±2.51b
ไม่ละลายน้ำ 3 LPDD3-2	97.08±5.85	97.35±5.30	92.23±5.39	92.10±5.52	84.18±3.08ab
ชุดควบคุม	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T-test	ns	ns	ns	ns	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	4.25	5.50	6.47	6.11	2.48

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางภาคผนวกที่ 9 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท SM1 และไอโซเลท LPDD3-2 สูตรไม่ละลายน้ำ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน

ชีวภัณฑ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>R. microporus</i>				
	0 (เดือน)	3 (เดือน)	6 (เดือน)	9 (เดือน)	12 (เดือน)
ไม่ละลายน้ำ 1 SM1	98.05±3.90	97.23±5.55	91.10±5.94	89.98±3.10ab	82.93±1.14
ไม่ละลายน้ำ 2 SM1	97.50±5.00	91.25±5.89	90.68±6.37	86.80±1.23abc	81.65±3.66
ไม่ละลายน้ำ 3 SM1	97.65±4.70	93.05±5.31	91.38±5.76	90.28±2.75a	85.43±4.15
ไม่ละลายน้ำ 1 LPDD3-2	96.83±4.00	95.68±5.58	86.65±1.42	85.73±0.71c	83.20±1.73
ไม่ละลายน้ำ 2 LPDD3-2	97.50±5.00	91.68±5.55	86.80±0.52	86.13±0.45bc	82.53±2.44
ไม่ละลายน้ำ 3 LPDD3-2	97.23±5.55	96.25±5.79	88.33±0.45	87.90±0.84abc	84.05±3.94
ชุดควบคุม	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T-test	ns	ns	ns	**	ns
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	4.85	5.96	2.08	4.83	3.68

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*\* = มีความแตกต่างทางสถิติที่  $P \leq 0.01$  จากการตรวจสอบโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



