



การคัดแยกบาซิลลัสจากดินป่าชายเลนที่เป็นสารควบคุมทางชีวภาพสำหรับยับยั้งราก่อโรคพืช
Isolation of *Bacillus* species from mangrove soil as biocontrol agent
against plant pathogenic fungi

สุรัญญา ใหม่ทอง
Sutanya Maitong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Agricultural Science and Technology
Prince of Songkla University

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การคัดแยกบาซิลลัสจากดินป่าชายเลนที่เป็นสารควบคุมทางชีวภาพสำหรับยับยั้งราก่อโรคพืช
Isolation of *Bacillus* species from mangrove soil as biocontrol agent
against plant pathogenic fungi

สุรัญญา ใหม่ทอง
Sutanya Maitong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Agricultural Science and Technology
Prince of Songkla University

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดแยกบาซิลลัสจากดินป่าชายเลนที่เป็นสารควบคุมทางชีวภาพสำหรับ
ยับยั้งราก่อโรคพืช

ผู้เขียน นางสาวสุธัญญา ไหมทอง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปฐมา เพิ่มพูนพัฒนา)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีร ศรีสวัสดิ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรัสลักษณ์ เพชรวัง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(ดร.รพีวรรณ ไสวรรณปรีชา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปฐมา เพิ่มพูนพัฒนา)

.....กรรมการ
(ดร.รพีวรรณ ไสวรรณปรีชา)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานัน เรืองสำราญ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีการเกษตร

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้างู๋สง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปฐิมา เพิ่มพูนพัฒนา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(ดร. รพีวรรณ โสวรรณปรีชา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....

(นางสาวสุธัญญา ใหม่ทอง)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อนและ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวสุธิษฎา ใหม่ทอง)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกบาซิลลัสจากดินป่าชายเลนที่เป็นสารควบคุมทางชีวภาพสำหรับยับยั้งราก่อโรคราพืช
ผู้เขียน	นางสาวสุธัญญา ใหม่ทอง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร
ปีการศึกษา	2564

บทคัดย่อ

โรคราพืชจัดเป็นภัยคุกคามที่ร้ายแรงที่สุด ซึ่งเป็นสาเหตุของความเสียหายก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตร ดังนั้นการควบคุมโรคราจึงสำคัญเป็นอย่างมาก วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อคัดแยก *Bacillus* sp. จากดินป่าชายเลนที่ผลิตสารควบคุมทางชีวภาพในการต้านราโรคราพืช ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สารควบคุมทางชีวภาพจากแบคทีเรียมีศักยภาพในการยับยั้งราโรคราพืช พบแบคทีเรียทั้งหมด 98 ไอโซเลต จากดินป่าชายเลน มีแบคทีเรีย 36 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบไปด้วยรูปร่างแท่งสั้น หรือ แท่งยาว หลังการทดสอบทางชีวเคมี พบว่ามีแบคทีเรีย 18 ไอโซเลต ที่คล้าย *Bacillus* sp. นำแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลต ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรค *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *P. palmivora* และ *C. gloeosporioides* โดยวิธี Dual culture จากผลการทดลองพบว่า 6 ไอโซเลต สามารถยับยั้งราก่อโรคได้ หลังจากนั้นทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรค โดยใช้ Culture filtrate พบว่า VIMSH06 สามารถยับยั้ง *F. solani* ได้ 71.62 ± 2.21 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรีย VIMSH06 มีความคล้ายคลึงกับหลายสปีชีส์ในสกุล *Bacillus* มากถึง 99.93 เปอร์เซ็นต์ โดยสภาวะที่เหมาะสมของ VIMSH06 สำหรับการยับยั้ง *F. solani* ได้ดีที่สุด คือ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใน Nutrient Broth (NB) pH 7 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง การทดสอบความเสถียรของ pH และอุณหภูมิ แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ใน culture filtrate มีความเสถียรเป็นเวลานานอย่างน้อย 20 นาที ที่ pH 2 ถึง 10 และที่อุณหภูมิ 20 ถึง 121 องศาเซลเซียส โดยเส้นใย และปลายของรา *F. solani* แสดงความผิดปกติ เมื่อทดสอบด้วย culture filtrate ของ VIMSH06 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จากการทดสอบยับยั้งราก่อโรคราพืช แสดงผลให้เห็นว่ารากของต้นกล้าข้าวโพดติดเชื้อจากโคนินทรีย์ของ *F. solani* และ culture filtrate ของ VIMSH06 สามารถป้องกันต้นกล้าข้าวโพดติดเชื้อจาก *F. solani* ได้ ดังนั้นแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 อาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางใหม่สำหรับการยับยั้งเชื้อราโรคราพืชในการเกษตรแบบยั่งยืนได้

คำสำคัญ: บาซิลลัส, สารควบคุมทางชีวภาพ, ยับยั้งราก่อโรค, ดินป่าชายเลน

Thesis Title	Isolation of <i>Bacillus</i> species from mangrove soil as biocontrol agent against plant pathogenic fungi
Author	Miss Sutanya Maitong
Major Program	Agricultural Science and Technology
Academic Year	2021

ABSTRACT

Plant diseases are among the most serious threats that cause preharvest and postharvest losses of agricultural products. Therefore, the control of disease is very important. The aim of this study is to isolate *Bacillus* sp. from mangrove soil that produces biocontrol agent against phytopathogenic fungi under optimal conditions. A biological agent from bacteria has the potential to inhibit plant pathogenic fungi. Out of 98 isolated bacteria from the mangrove soil, 36 isolated bacteria are gram positive bacteria that include rod or bacilli shape. After the biochemical test, it was found that there were only 18 isolated bacteria similar to *Bacillus* species. All of 18 isolated bacteria were also tested for antifungal activity against *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *P. palmivora* and *C. gloeosporioides* by dual culture method. The results showed that 6 isolated can inhibit fungal pathogens. After the antifungal activity test by using culture filtrate, found that VIMSH06 can inhibit *F. solani* at $71.62 \pm 2.21\%$. VIMSH06 was highly similar to *Bacillus* at the pairwise similarity 99.93%. The appropriate conditions of VIMSH06 for the best inhibition of *F. solani* was to culture bacteria in Nutrient Broth (NB) pH 7 at 37°C for 21 h. The pH and temperature stability test demonstrated that the active substance in the culture filtrate was stable for at least 20 min at pH 2 to 10 and at 20 to 121°C. The hypha and tip of *F. solani* showed the abnormality when treated with culture filtrate of VIMSH06 under microscopy. In vivo test, the result revealed that the corn seedling roots were infected with conidia of *F. solani* and culture filtrate of VIMSH06 can protect the corn seedling from *F. solani*. Thus, the bacterial isolate VIMSH06 may be applied to a new approach for inhibition of fungal plant pathogens in sustainable agriculture.

Keywords: *Bacillus* sp, biocontrol agent, antifungal activity, mangrove soil

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านห้องปฏิบัติการ ครุภัณฑ์ และวัสดุอุปกรณ์ และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2563 และทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ประจำปีงบประมาณ 2563 จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปฎิมา เพิ่มพูนพัฒนา และ ดร. รพีวรรณ โสวรรณปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้คำปรึกษามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อีร์ ศรีสวัสดิ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรัสลักษณ์ เพชรวัง และรองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ ที่ช่วยให้คำแนะนำ และข้อเสนอต่าง ๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้อง และมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น รวมถึงให้ความช่วยเหลือ และมีส่วนที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ นางสาวอรทัย แดงสวัสดิ์ และนายนพดล พัวพันธ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ และอนุเคราะห์วัสดุวิทยาศาสตร์ ในการทำวิจัย

สุธัญญา ใหม่ทอง

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	(5)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(6)
กิตติกรรมประกาศ.....	(7)
สารบัญ.....	(8)
รายการตาราง.....	(12)
รายการตารางภาคผนวก.....	(13)
รายการภาพประกอบ.....	(15)
รายการภาพภาคผนวก.....	(16)
สัญลักษณ์คำย่อ และตัวย่อ.....	(17)
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ตรวจสอบเอกสาร.....	2
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	32
บทที่ 2 วิธีการวิจัย.....	32
2.1 วิธีดำเนินการ.....	32
2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง.....	32
2.1.2 การตัดแยกแบคทีเรีย การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี.....	32
2.1.2.1 การเก็บตัวอย่างดิน และการตัดแยกเชื้อ.....	32
2.1.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี.....	35
2.1.2.2.1 การทดสอบการย่อยแป้ง.....	35
2.1.2.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส.....	35
2.1.2.2.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส.....	36
2.1.2.2.4 การทดสอบการเคลื่อนที่.....	36
2.1.3 การทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในห้องปฏิบัติการ (<i>in vitro</i>).....	36
2.1.3.1 การเลี้ยงราก่อโรคพืช.....	36

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2.1.3.2 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคโดยวิธี Dual culture.....	36
2.1.3.3 การเตรียมส่วนใสปราศจากเซลล์ (Culture filtrate).....	36
2.1.3.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคด้วยส่วนใสปราศจากเซลล์.....	37
2.1.3.5 การวิเคราะห์ 16s rDNA เพื่อระบุจีโนส สปีชีส์ของแบคทีเรีย.....	37
2.1.3.6 การหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช.....	38
2.1.3.6.1 การหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม.....	38
2.1.3.6.2 การหาสถานะกรด-เบส ที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	38
2.1.3.6.3 การหาสถานะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการบ่มเชื้อ.....	38
2.1.3.6.4 การหาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม.....	38
2.1.3.7 การทดสอบความเสถียรของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรีย.....	39
2.1.3.7.1 การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบส.....	39
2.1.3.7.2 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ.....	39
2.1.4 การศึกษาเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	39
2.1.5 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคบนพืช (<i>In vivo</i>).....	40
2.1.5.1 การเตรียมเมล็ดข้าวโพด.....	40
2.1.5.2 การเตรียมสารแขวนลอยโคโคเดียของราก่อโรค.....	40
2.1.5.3 การเตรียมแบคทีเรีย.....	40
2.1.5.4 การทดสอบการก่อโรคของรา <i>F. solani</i> ในข้าวโพด.....	40
2.1.5.4.1 การทดสอบในจานเพาะเลี้ยง.....	40
2.1.5.4.2 การทดสอบในกล่องปลูก.....	41
2.1.6 การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	41
2.2 วัสดุและอุปกรณ์.....	42
2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	42
2.2.2 สารเคมี.....	42

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2.2.3 เครื่องมือวิทยาศาสตร์.....	42
2.2.4 อุปกรณ์.....	42
2.2.5 ภา.....	43
2.3 สถานที่ทำวิจัย.....	43
บทที่ 3 ผลการทดลอง.....	44
3.1 การคัดแยกแบคทีเรีย การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี.....	44
3.2 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคโดยวิธี Dual culture.....	49
3.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคด้วยส่วนใสปราศจากเซลล์ (Culture filtrate)	50
3.4 การวิเคราะห์ 16s rDNA เพื่อระบุจีโนส สปีชีส์ของแบคทีเรีย	51
3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช.....	52
3.5.1 การหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม.....	52
3.5.2 การหาสภาวะกรด-เบส ที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	52
3.5.3 การหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการป่มเชื้อ.....	53
3.5.4 การหาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม.....	54
3.6 การทดสอบความเสถียรของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรีย.....	55
3.6.1 การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบส.....	55
3.6.2 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ.....	55
3.7 การศึกษาเส้นใยร่างกายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	56
3.8 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคบนพืช (<i>In vivo</i>)	57
3.8.1 การทดสอบในงานเพาะเลี้ยง.....	57
3.8.2 การทดสอบในกล่องปลูก.....	59
บทที่ 4 บทวิจารณ์.....	63
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	68
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	68

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	69
บรรณานุกรม.....	70
ภาคผนวก.....	81
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	82
ภาคผนวก ข การเตรียมทดสอบทางชีวเคมี.....	86
ภาคผนวก ค ผลการทดลอง.....	90
ประวัติผู้เขียน.....	128

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 เชื้อบาซิลลัสที่ผลิตไลโปเปปไทด์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช.....	21-28
ตารางที่ 2 ลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหาร NA.....	34
ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่งที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน.....	45-47
ตารางที่ 4 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน.....	48
ตารางที่ 5 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยวิธี Dual culture.....	50
ตารางที่ 6 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วย Culture filtrate.....	51
ตารางที่ 7 การหาความเหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	52
ตารางที่ 8 การหาความเหมาะสมของความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	53
ตารางที่ 9 การหาความเหมาะสมที่อุณหภูมิต่าง ๆ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	53
ตารางที่ 10 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคบนเมล็ดข้าวโพดในจานเพาะเลี้ยง.....	58-59
ตารางที่ 11 การวัดการเจริญของต้นกล้าข้าวโพดในชุดการทดลองต่าง ๆ.....	61

รายการตารางภาคผนวก

ตาราง	หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน.....	91-110
ตารางภาคผนวกที่ 2 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน.....	111
ตารางภาคผนวกที่ 3 ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต VIMSH06.....	112-113
ตารางภาคผนวกที่ 4 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยวิธี Dual culture.....	114-115
ตารางภาคผนวกที่ 5 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วย Culture filtrate.....	116-117
ตารางภาคผนวกที่ 6 การหาความเหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	118
ตารางภาคผนวกที่ 7 การหาความเหมาะสมของความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	119-120
ตารางภาคผนวกที่ 8 การหาความเหมาะสมที่อุณหภูมิต่าง ๆ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	121
ตารางภาคผนวกที่ 9 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของแบคทีเรีย สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	122
ตารางภาคผนวกที่ 10 การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบส ของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06	123
ตารางภาคผนวกที่ 11 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ ของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	123
ตารางภาคผนวกที่ 12 การทดสอบการก่อโรคของรา <i>F. solani</i> ในข้าวโพด.....	124-125

รายการภาพประกอบ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะรา <i>F. proliferatum</i> ที่เจริญบนอาหาร PDA และ macroconidia.....	3
ภาพที่ 2 โรคเน่าแห้ง และโรคเหี่ยว และโรคฝักเน่า.....	4
ภาพที่ 3 ลักษณะรา <i>F. solani</i> ที่เจริญบนอาหาร PDA และ macroconidia.....	4
ภาพที่ 4 โรครากเน่า โรคโคนเน่า และโรคต้นเหี่ยว	5
ภาพที่ 5 ลักษณะรา <i>F. moniliforme</i> ที่เจริญบนอาหาร PDA และ macroconidia และ microconidia ของรา <i>F. solani</i>	6
ภาพที่ 6 โรครากเน่า โรคก้านเน่า และโรคใบไหม้.....	6
ภาพที่ 7 ลักษณะรา <i>P. palmivora</i> ที่เจริญบนอาหาร PDA และ Sporangia.....	7
ภาพที่ 8 โรคฝัก และผลเน่าในโกโก้.....	8
ภาพที่ 9 โรครากเน่า และโคนเน่าในต้นทุเรียน.....	8
ภาพที่ 10 โรคใบไหม้เหี่ยวเฉา ในแก้วมังกร.....	8
ภาพที่ 11 โรคเน่าดำหรือโรคเน่าเข้าไส้ ในกล้วยไม้.....	9
ภาพที่ 12 ลักษณะรา <i>C. gloeosporioides</i> ที่เจริญบนอาหาร PDA และ Conidia.....	10
ภาพที่ 13 โรคแอนแทรคโนสบนพริก.....	10
ภาพที่ 14 โรคแอนแทรคโนสบนมะม่วง.....	10
ภาพที่ 15 โรคแอนแทรคโนสบนแก้วมังกร.....	11
ภาพที่ 16 โรคแอนแทรคโนสบนมะละกอ.....	11
ภาพที่ 17 โครงสร้างของฟูโมนิซิน.....	12
ภาพที่ 18 โครงสร้างของโมนิลิฟอร์มิน.....	13
ภาพที่ 19 โครงสร้างฟูซาริน.....	13
ภาพที่ 20 โครงสร้างกรดฟูซาริก.....	14
ภาพที่ 21 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i>	18
ภาพที่ 22 เอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i>	18
ภาพที่ 23 การควบคุมทางชีวภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อพืช.....	29

รายการภาพประกอบ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 24 ลักษณะการเจริญของโคโลนี บนอาหาร NA.....	35
ภาพที่ 25 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคด้วยส่วนใสปราศจากเซลล์.....	37
ภาพที่ 26 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของแบคทีเรีย สำหรับการสร้างสารในการยับยั้ง ราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	54
ภาพที่ 27 การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบส ของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้ง ราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	55
ภาพที่ 28 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ ของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งราก่อโรคพืช ของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	56
ภาพที่ 29 ลักษณะของเส้นใยรา <i>F. solani</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จากชุด ทดสอบที่กำลังขยาย 5,000 เท่า และ 10,000 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุด ควบคุม.....	56-57
ภาพที่ 30 เพอร์เซ็นต์การงอก และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ดข้าวโพดในชุดการ ทดลองต่าง ๆ.....	62

รายการภาพภาคผนวก

ภาพ	หน้า
ภาพภาคผนวกที่ 1 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วย Culture filtrate.....	126
ภาพภาคผนวกที่ 2 การหาความเหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	126
ภาพภาคผนวกที่ 3 การหาความเหมาะสมของความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	127
ภาพภาคผนวกที่ 4 การหาความเหมาะสมที่อุณหภูมิต่าง ๆ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06.....	127

สัญลักษณ์คำย่อ และตัวย่อ

NA	=	Nutrient Agar
NB	=	Nutrient Broth
PDA	=	Potato Dextrose Agar
PDB	=	Potato Dextrose Broth
LB	=	Luria Bertani Broth
TSB	=	Soyabean Casein Digest Medium (Tryptone Soya Broth)
%	=	เปอร์เซ็นต์ (อัตราร้อยละ)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเกษตร เป็นอาชีพที่มีการประกอบกันมายาวนาน และช่วยสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรชาวไทยได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งผลผลิตทางการเกษตรของไทยถือเป็นที่ยอมรับในตลาดต่างประเทศเป็นอย่างมาก ทั้งผัก ผลไม้ เครื่องเทศ เป็นต้น แต่ปัญหาที่พบระหว่างการทำเกษตรทั้งก่อน และหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต มีทั้งโรคระบาดซึ่งเกิดได้จากแมลงศัตรูพืช แบคทีเรีย ไวรัส และรา ก่อโรคบางสายพันธุ์ ได้แก่รา *Fusarium* sp. นับว่าเป็นราโรคพืชสำคัญที่สร้างความเสียหายให้แก่พืชหลายชนิด เช่น ข้าวโพด จะก่อให้เกิดโรคใบเหลือง ใบไหม้ โรคเหี่ยว และโรครากเน่าโคนเน่า ทำให้ส่งผลกระทบต่ออัตราผลผลิตที่ลดลง (อภิรัชต์ และคณะ 2557) รา *Phytophthora palmivora* จะสร้างความเสียหายให้ทุเรียน และกล้วยไม้ โดยจะก่อให้เกิดโรครากเน่าโคนเน่า โรคเน่าดำ หรือเน่าเข้าไส้ ทำให้ไม่สามารถปลูกทุเรียน และกล้วยไม้ที่มีคุณภาพเพื่อการส่งออกได้ และรา *Colletotrichum gloeosporioides* ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก มะม่วง แก้วมังกร ในระยะผลสุกทำให้ผลผลิตก่อนการเก็บเกี่ยวลดลงเป็นอย่างมาก (Meera et al., 2016) จากอัตราการเกิดโรคเหล่านี้เกษตรกรมักใช้วิธีที่รวดเร็วในการกำจัดราก่อโรคพืช โดยใช้สารเคมี เช่น เมทาแลกซิล จะใช้คลุกกับเมล็ดก่อนการปลูกเพื่อป้องกันการเกิดโรคในระยะเมล็ด สารฉีดพ่น ได้แก่ แมนโคเซบ คาร์เบนดาซิม คลอโรทาโลนิล โพรคลอราส และแคปแทน เป็นต้น (อภิรัชต์ และคณะ 2557) แต่การใช้สารเคมีเหล่านี้ อาจก่อให้เกิดการตกค้างบนผลผลิต และอาจส่งผลกระทบต่อเกษตรกรและผู้บริโภคได้ อีกทั้งยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อมทั้งน้ำ อากาศ ดินปลูก และการใช้สารเคมีในปริมาณมาก ก่อให้เกิดการสะสมของสารเคมีในร่างกาย ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง โรคในระบบทางเดินหายใจทั้งตัวเกษตรกร และผู้บริโภค อีกทั้งยังทำให้เราเกิดการติดต่อสารเคมีที่ฉีดพ่นได้อีกด้วย (Xiang et al., 2017)

จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นทำให้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ เพื่อช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคที่เกิดจากราโรคพืชมากยิ่งขึ้น โดยใช้จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืช ซึ่งเป็นวิธีที่มีความปลอดภัย เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มบาซิลลัส ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่ง สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลายเนื่องจากการสร้างเอนโดสปอร์ ซึ่งสามารถทนต่อความร้อน ความเค็ม ความเป็นกรดหรือสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ (Euzéby, 2010) ดังนั้นการคัดแยกบาซิลลัสจากดินบริเวณป่าชายเลน ถือเป็นแหล่งที่น่าสนใจ

เนื่องจากมีความหลากหลายทางชีวภาพ และอาจพบแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่สามารถผลิตสารชีวภาพที่ช่วยในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ (Eldeen et al., 2015)

แบคทีเรียแต่ละชนิดมีการเจริญ และสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แตกต่างกัน ซึ่งสถานะที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้ผลิตสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช มีหลายปัจจัย เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Shakeel et al., 2016) เป็นต้น ในการศึกษาปัจจัยสำคัญเหล่านี้ คำนี้ถึงแนวทางการเลี้ยงเชื้อให้มีการผลิตสารออกมาให้ได้ อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อยับยั้งการเจริญของราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสจากดินบริเวณป่าชายเลน เพื่อหาสถานะที่เหมาะสม ความเสถียรของแบคทีเรีย และศักยภาพต่อการยับยั้งราก่อโรคในต้นข้าวโพด และศึกษาลักษณะเส้นใยร่างกายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการทดแทนหรือลดการใช้ยา และสารเคมีในการผลิตพืช ส่งผลให้มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม เกษตรกร และผู้บริโภค และอาจเป็นที่ยอมรับในกลุ่มเกษตรกรที่ปลูกพืชในอนาคตได้อีกด้วย

1.2 ตรวจสอบเอกสาร

1.2.1 ราสาเหตุโรคพืช

Fusarium spp. เป็นสาเหตุโรคพืชหลายชนิด มักพบได้ส่วนใหญ่ในดิน ซึ่งราจะเข้าทำลายระบบท่อน้ำเลี้ยง ก่อให้ส่งผลกระทบต่อระบบรากของพืชที่ติดเชื้อเป็นหลัก (Parikh et al., 2018) เมื่ออาการรุนแรงจะส่งผลให้พืชเกิดอาการลำต้นเหี่ยวแห้ง ใบเหี่ยวเหลืองอย่างกะทันหัน จึงก่อให้เกิดการตายเป็นลำดับถัดมา มักพบอาการติดเชื้อโดยส่วนใหญ่ในพืชไร่ พืชหัว พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผลทั้งก่อน และหลังการเก็บเกี่ยว (Yadav et al., 2021)

อนุกรมวิธานของรา *Fusarium* spp.

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Order: Hypocreaceae

Family: Hypocreaceae

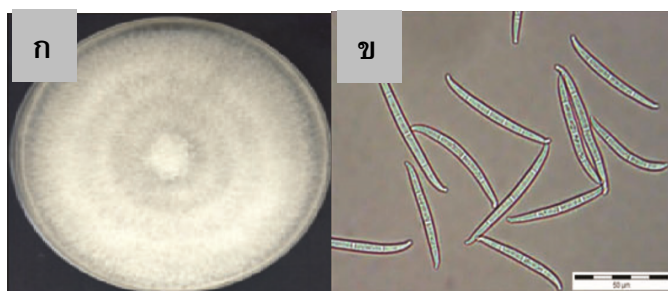
Genus: *Fusarium*

Fusarium spp. เป็นราที่สร้างความเสียหายให้กับการเกษตรเป็นจำนวนมาก เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีการแพร่ระบาดของโรคในพื้นที่ได้อย่างรวดเร็ว และสร้างความเสียหายต่อพืชที่เพาะปลูกภายในระยะเวลาอันสั้น ทำให้ผู้ปลูกต้องสูญเสียผลผลิตอย่างมหาศาล (Yadav et al., 2021)

นอกจากปัญหาผลผลิตที่ลดลงแล้ว ยังมีกลุ่มสารพิษจากเชื้อราที่เป็นแหล่งปนเปื้อนสำคัญบนผลผลิตได้เช่นกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ (Rodríguez et al., 2007)

1. *Fusarium proliferatum*

ลักษณะของราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) จะมีเส้นใยสีขาวฟู เจริญเป็นวงแหวน (ภาพที่ 1ก) ลักษณะของโคนิเดีย (conidia) จะมีขนาดของมาโครโคนิเดีย (macroconidia) ประมาณ $29.97\text{--}86.88 \times 2.53\text{--}3.55$ ไมโครเมตร (Hawa et al., 2013) (ภาพที่ 1ข) รา *F. proliferatum* จะพบทั่วไปในดิน (Rodríguez et al., 2007) ราชนิดนี้สามารถก่อโรคในพืชได้หลายชนิด เช่น โรคเน่าแห้ง โรคเหี่ยวในกล้วยไม้ และข้าวโพด เป็นต้น โดยราจะเข้าทำลายระบบท่อลำเลียงน้ำ และท่อลำเลียงอาหารของราก และลำต้นพืชจนได้รับความเสียหาย ทำให้พืชได้รับน้ำอาหารไม่พอเพียง (ภาพที่ 2ก) และโรคฝักเน่าที่เกิดจากรา จะทำให้ฝักของข้าวโพดเน่า เนื่องจากการเข้าทำลายของรา (ภาพที่ 2ข) นอกจากนี้ยังมีการปล่อยสารพิษจำพวก Fumonisin ซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็งออกมาหากผู้บริโภคได้รับเข้าไปจะก่อให้เกิดอันตรายได้ (Marín et al., 2010) นอกจากนี้รา *F. proliferatum* ยังก่อให้เกิดโรคเน่าแห้ง โรคเหี่ยวในข้าว ข้าวโพด หน่อไม้ฝรั่ง กระเทียม หัวหอม และต้นหอม (Kushiro et al., 2012) และยังก่อโรคต้นเน่าในกล้วยไม้หลายสายพันธุ์ โดยเชื้อจะเข้าทำลายตั้งแต่ราก และค่อย ๆ ลุกลามไปสู่ยอด (Kim et al., 2002)



ภาพที่ 1(ก) ลักษณะรา *F. proliferatum* ที่เจริญบนอาหาร PDA และ (ข) macroconidia

ที่มา: Hawa et al. (2013)



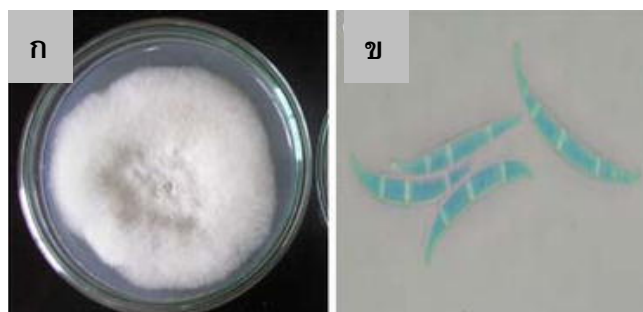
ภาพที่ 2(ก) โรคเน่าแห้ง และโรคเหี่ยว และ (ข) โรคฝักเน่า

ที่มา: https://www.arda.or.th/kasetinfo/north/plant/corn_disease.html

(วันที่สืบค้น 17 กรกฎาคม 2564)

2. *Fusarium solani*

ลักษณะของราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะมีเส้นใยสีขาวฟู เจริญเป็นวง ตรงกลางจะแสดงเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 3ก) มีการเจริญ 0.46 เซนติเมตรต่อวัน ลักษณะของโคนิเดีย จะมีขนาดของ มาโครโคนิเดีย $30.4-41.3 \times 4.4-5.4$ ไมโครเมตร และมีขนาดของไมโครโคนิเดีย (microconidia) $6.7-15.6 \times 3.1-4.7$ ไมโครเมตร (Ingle et al., 2008) (ภาพที่ 3ข) แหล่งอาศัยทั่วไปมักพบในดิน ราชชนิดนี้สามารถก่อโรคในพืชได้หลายชนิด เช่น โรครากเน่า โรคโคนเน่า บริเวณเมล็ด ลำต้นพืช ส่งผลให้ต้นกล้าพืชมีอาการเน่าเสียก่อน และหลังงอก จากอัตราการเกิดโรคจึงทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในต้นพืชพันธุ์ที่อ่อนแอ และยังทำให้เกิดโรคต้นเหี่ยวในข้าวโพด ถั่วเหลือง และข้าวสาลีในหลายภูมิภาค พืชที่ติดเชื้อจะแสดงอาการรากเน่า โคนต้นเน่า ใบเหลือง มีแผลบริเวณใบ และการติดเชื้อจะลุกลามขยายเป็นวงกว้าง ตลอดจนทำให้ใบร่วง และอาการรุนแรงจนพืชล้มตายได้ (ภาพที่ 4) (Parikh et al., 2018)



ภาพที่ 3(ก) ลักษณะรา *F. solani* ที่เจริญบนอาหาร PDA และ (ข) macroconidia

ที่มา: Ingle et al. (2008)



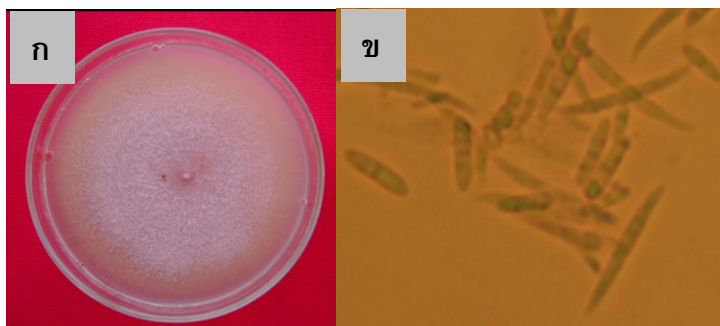
ภาพที่ 4 โรครากเน่า โรคโคนเน่า และโรคต้นเหี่ยว

ที่มา: https://www.arda.or.th/kasetinfo/north/plant/corn_disease.html

(วันที่สืบค้น 17 กรกฎาคม 2564)

3. *Fusarium moniliforme*

ลักษณะของราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะมีเส้นใยสีขาว เมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีลักษณะสีม่วง (ภาพที่ 5ก) ขนาดของมาโครโคนิเดีย เท่ากับ $25-60 \times 2.5-4$ ไมโครเมตร และมีขนาดของไมโครโคนิเดีย เท่ากับ $5-12 \times 1.5-2.5$ ไมโครเมตร (ภาพที่ 5ข) (Huerta and Huamán 2017) แหล่งอาศัยทั่วไปมักพบในดิน ราชนิดนี้สามารถก่อโรคในพืชได้หลายชนิดได้ เช่น โรคต้นเน่า เป็นโรคที่สร้างความเสียหายแก่ข้าวโพด หากมีการติดเชื้อจะมีอาการก้านเน่า รากเน่า ส่วนในเมล็ดข้าวโพดจะแสดงอาการเมล็ดเน่า หากติดเชื้อในระยะรุนแรงอาจส่งผลให้พืชตายได้ (ภาพที่ 6ก) โดยรา *F. moniliforme* พบระบาดทั่วไปในแหล่งที่มีการปลูกข้าวโพด มักพบระบาดในระยะที่ข้าวโพดออกดอก และมีอาการรุนแรงมากขึ้นเมื่อข้าวโพดติดฝัก อาการจะพบบริเวณราก และลำต้นส่วนล่างทำให้พืชตายก่อนแก่ ฝักเล็กเมล็ดลีบ และยังพบอาการของโรคใบไหม้ในข้าวโพดเมื่อมีการงอกของระยะใบแท้ได้อีกด้วย (ภาพที่ 6ข) (ชุตินันต์ และคณะ 2547) รา *F. moniliforme* ยังสามารถผลิตกรดฟิวซาริก (fusaric acid) ซึ่งเป็นพิษต่อข้าวโพด และยับยั้งการงอกของเมล็ดได้อีกด้วย (Bacon and Williamson 1992)



ภาพที่ 5 (ก) ลักษณะรา *F. moniliforme* ที่เจริญบนอาหาร PDA และ
(ข) macroconidia และ microconidia ของรา *F. solani*
ที่มา: Huerta and Huamán (2017)



ภาพที่ 6 (ก) โรครากเน่า โรคก้านเน่า และ (ข) โรคใบไหม้
ที่มา: https://www.arda.or.th/kasetinfo/north/plant/corn_disease.html
(วันที่สืบค้น 17 กรกฎาคม 2564)

4. *Phytophthora palmivora*

รา *P. palmivora* จะมีลักษณะเส้นใยราที่เจริญบนอาหาร PDA เส้นใยสีขาวฟูเหมือนฝ้าย (ภาพที่ 7ก) มีขนาดของสปอร์เรเนเจอร์ (Sporangia) เท่ากับ 30-60x20-53 ไมโครเมตร (ภาพที่ 7ข) (Umayah and Purwantara 2016)

อนุกรมวิธานของรา *P. palmivora*

Kingdom: Fungi chromista

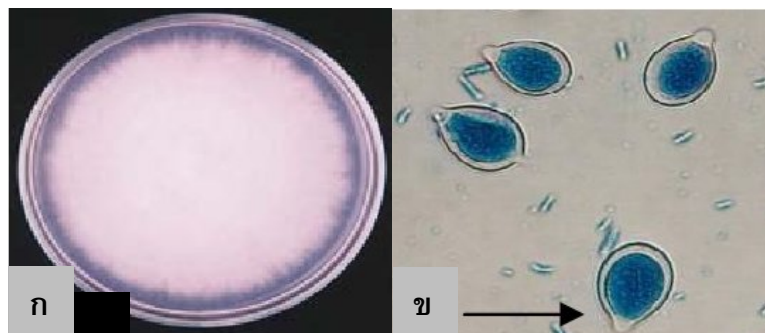
Phylum: Oomycota

Order: Peronosporales

Family: Pythiaceae

Genus: *Phytophthora*

รา *P. palmivora* จัดเป็นกลุ่มของราน้ำ (water mold) ซึ่งจำเป็นที่จะดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำเพื่อช่วยในการเคลื่อนที่แพร่ระบาดจากพืชต้นหนึ่งไปสู่พืชอีกต้นหนึ่ง ราชนิดนี้เป็นราที่ก่อให้เกิดโรคพืชได้หลายชนิดในเขตร้อนชื้น (Zentmyer, 1973) เป็นราสาเหตุโรคที่สร้างความเสียหายแก่ ผลโกโก้ ทุเรียน แก้วมังกร โดยจะทำให้เกิดอาการ ฝักเน่า, โคนเน่า, โรคใบไหม้เหี่ยวเฉา (ภาพที่ 8, 9 และ 10) (Umayah and Purwantara 2016) และยังเป็นสาเหตุโรคเน่าดำหรือโรคเน่าเข้าไส้ ในกล้วยไม้หลายสายพันธุ์ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*), กล้วยไม้สกุลเอสโคเซนดา (*Ascocenda*), กล้วยไม้สกุลบรัสซาโวลา (*Brassavola*), กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*), กล้วยไม้สกุลกอนโกรา (*Gongora*), กล้วยไม้สกุลเอื้อง (*Maxillaria*) เป็นต้น (Orlikowski and Szkuta, 2006) โรคเน่าดำ หรือเน่าเข้าไส้ จะพบการระบาดได้ง่ายในช่วงฤดูฝนในสภาพอากาศที่มีความชื้นสูงสปอร์ของราจะแพร่ กระจายไปกับน้ำที่ไชรดต้นไม้



ภาพที่ 7(ก) ลักษณะรา *P. palmivora* ที่เจริญบนอาหาร PDA และ (ข) Sporangia

ที่มา: Umayah and Purwantara (2016)



ภาพที่ 8 โรคฝัก และผลเน่าในโกโก้

ที่มา: <https://www.flickr.com/photos/iita-media-library/4729834020>

(วันที่สืบค้น 17 กรกฎาคม 2564)



ภาพที่ 9 โรครากเน่า และโคนเน่าในต้นทุเรียน

ที่มา: <https://www.palangkaset.com>

(วันที่สืบค้น 17 กรกฎาคม 2564)



ภาพที่ 10 โรคใบไหม้เหี่ยวเฉา ในแก้วมังกร

ที่มา: <https://www.facebook.com/kowkaset/posts/1138624923008291/>

(วันที่สืบค้น 17 กรกฎาคม 2564)



ภาพที่ 11 โรคเน่าดำหรือโรคเน่าเข้าไส้ ในกล้วยไม้

ที่มา: <http://pickanorchid.com/vanda-orchid-fungal-rots/>

(วันที่สืบค้น 17 กรกฎาคม 2564)

5. *Colletotrichum gloeosporioides*

ลักษณะของราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะมีเส้นใยสีขาวจนถึงเทาอมดำ เชื้อสามารถเจริญได้เต็มที่ในระยะเวลา 7 วัน (ภาพที่ 12ก) มีลักษณะของโคนิเดียเซลล์เดี่ยว ๆ ขนาดเล็ก เป็นรูปทรงกระบอกตรงปลายมนมีผนังเรียบใสไม่มีสี (hyaline) มีขนาด $2.59-5.18 \times 10.36-18.13$ ไมครอน (ธารทิพย์ และคณะ, 2548) (ภาพที่ 12ข)

อนุกรมวิธานของรา *C. gloeosporioides* (Gautam, 2014)

Kingdom: Fungi

Subdivision: Ascomycota

Class: Sordariomycetes

Order: Phyllachorales

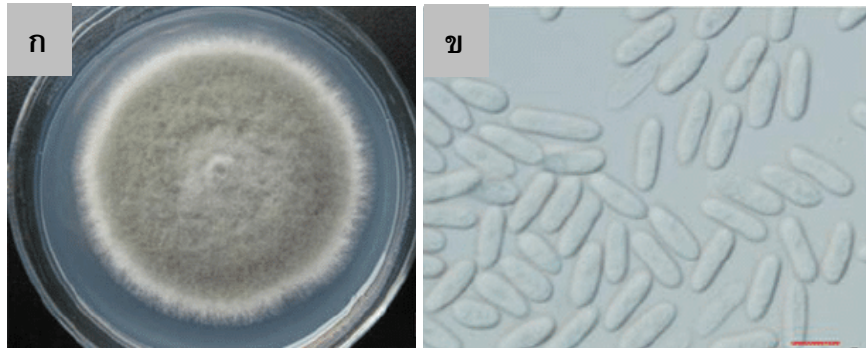
Family: Phyllachoraceae

Genus: *Colletotrichum*

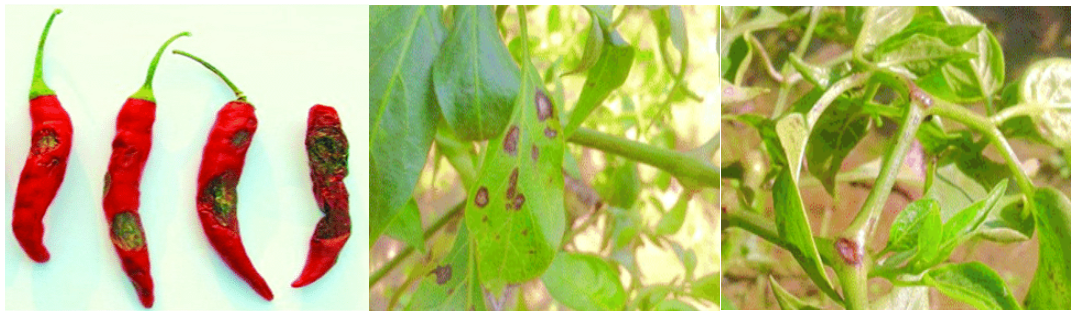
Species: *gloeosporioides*

รา *C. gloeosporioides* แหล่งอาศัยทั่วไปมักพบในดิน และอาจพบโคนิเดียลอยไปตามอากาศได้เช่นกัน ราชนิดนี้สามารถก่อโรคในพืชได้หลายชนิด เช่น โรคแอนแทรคโนส ในพริก มะม่วง แก้วมังกร และมะละกอ เป็นต้น พืชที่ติดเชื้อจะแสดงอาการเป็นแผลไหม้ดำ เป็นจุดวงกว้าง บนใบ ช่อดอก และผล เมื่อมีอาการรุนแรงจะทำดอกร่วงก่อนการติดผล ส่วนในผลจะมีอาการเน่าทั้งผล และผลร่วงจากต้นได้เมื่อระยะรุนแรง (Tovar-Pedraza et al., 2020) ซึ่งรานี้สามารถดำรงชีวิตโดยอาศัยอยู่

กับเศษซากพืชที่ตายแล้วได้ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมช่วงฤดูฝนที่มีความชื้นสูง และอุณหภูมิที่เหมาะสม ระหว่าง 24-32 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการแพร่ระบาดได้ดี



ภาพที่ 12 (ก) ลักษณะรา *C. gloeosporioides* ที่เจริญบนอาหาร PDA และ (ข) Conidia
ที่มา: Huang et al. (2013)



ภาพที่ 13 โรคแอนแทรกคโนสบนพริก
ที่มา: Saxena et al. (2016)



ภาพที่ 14 โรคแอนแทรกคโนสบนมะม่วง
ที่มา: Tovar-Pedraza et al. (2020)



ภาพที่ 15 โรคแอนแทรคโนสบนแก้วมังกร

ที่มา: <https://www.semanticscholar.org/paper/DRAGON-FRUIT>

(วันที่สืบค้น 17 กรกฎาคม 2564)



ภาพที่ 16 โรคแอนแทรคโนสบนมะละกอ

ที่มา: Viera et al. (2019)

1.2.2 สารพิษที่ผลิตโดยราก่อโรคพืช

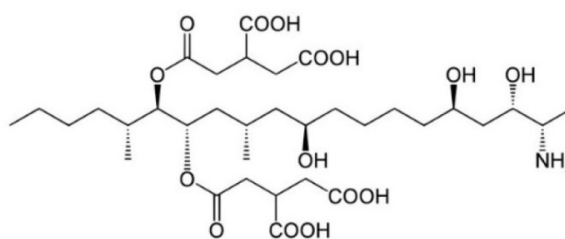
ตัวอย่างสารพิษที่ผลิตโดยรา *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *P. palmivora* และ *C. gloeosporioides* ได้แก่ ฟุโมนิซิน โมนิลิฟอร์มิน ฟุซาริน และ กรดฟุซาริก เป็นต้น โดยรา *Fusarium* spp. จะสังเคราะห์สารพิษทุติยภูมิที่เรียกว่าไมโคทอกซิน (mycotoxins) ออกมา ซึ่งสารพิษเหล่านี้ล้วนเป็นพิษต่อพืชหรือเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ และสัตว์ได้ การผลิตสารพิษของรานั้นมีสาเหตุมาจากความเครียดทางโภชนาการ ความเครียดจากแสง และปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ เช่น ค่าความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ การได้รับน้ำ สารฆ่าเชื้อรา และสารทุติยภูมิที่ได้จากพืช เป็นต้น (Perincherry et al., 2016)

สารพิษของรา สามารถแบ่งออกได้หลายชนิด เช่น พอลิคีไทด์ (Polyketides) ได้แก่ อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins) และฟุโมนิซิน (fumonisins) เทอร์ปีน (Terpenes) ได้แก่ ทอกซิน T-2 (T-2 toxin) ดีออกซีนิวาเลนอล-DON (deoxynivalenol-DON) เทอร์ปีนอินโดล (Indole terpenes) ได้แก่ แพกซิลลิน (Paxilline) และ โลลิเทร็ม (lolitrems) เปปไทด์ที่ไม่ได้สังเคราะห์โดยไรโบโซม (non-ribosomal peptides) ได้แก่ ซีโรเดสมิน (Sirodesmin) เอนเนียดิน (Enniatins) และ

บิวเวอริซิน (beauvericins) อัลคาร์ลอยด์ (Alkaloids) ได้แก่ เพลามีน (peramine) ซิเตอร์โรฟลอ (Siderophores) ได้แก่ เฟอร์โรโครซิน (ferricrocin) มักมีบทบาทในการกระตุ้นอาการติดเชื้อในพืช (Perincherry et al., 2016)

1.2.2.1 ฟูโมนิซิน

เป็นกลุ่มของสารพิษจากเชื้อราประเภทโพลีคีไทด์ ที่ผลิตโดยรา *F. proliferatum* (Perincherry et al., 2016) และ *F. moniliforme* (Garcia et al., 2018) กลุ่มสารพิษนี้ได้รับการรับรองว่าเป็นสาเหตุของมะเร็งเม็ดเลือดขาวในม้า ปอดบวมน้ำในสุกร และมะเร็งหลอดอาหารในมนุษย์ (Smith, 2018) Fumonisin เป็นพิษต่อพืช และ fumonisin B1 (ภาพที่ 17) จะสร้างความเสียหายให้กับธัญพืช และพืชผลที่สำคัญ เมล็ดธัญพืชที่ปนเปื้อนด้วย fumonisin B1 จะมีการเสื่อมสภาพของเมล็ดอย่างรวดเร็ว (Perincherry et al., 2016)



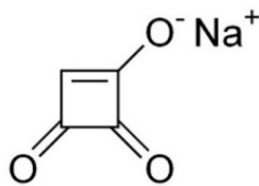
Fumonisin B1

ภาพที่ 17 โครงสร้างของฟูโมนิซิน

ที่มา: Perincherry et al., (2016)

1.2.2.2 โมนิลิฟอร์มิน

เป็นสารพิษปนเปื้อนที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในเมล็ดธัญพืช ที่ผลิตโดยรา *F. proliferatum* โมนิลิฟอร์มิน (ภาพที่ 18) มีพิษน้อยกว่าสารพิษ T-2, fumonisins, butenolide และกรด dihydrofusaric และมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช โดยการลดประสิทธิภาพการงอกของเมล็ด และลดเมล็ดที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของพืช สารพิษสามารถยับยั้งการพัฒนาของใบ และยังสามารถลดมวลในต้นกล้าพืชได้อีกด้วย (Perincherry et al., 2016)



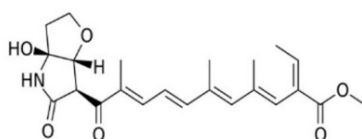
Moniliformin

ภาพที่ 18 โครงสร้างของโมนิลฟอร์มิน

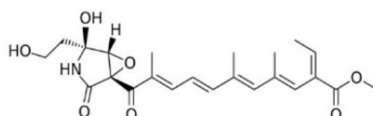
ที่มา: Perincherry et al. (2016)

1.2.2.3 ฟุซาริน

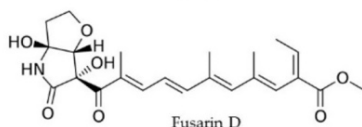
เป็นสารประกอบโพลีคีไทด์ ที่มี 2-pyrrolidone แทนที่บน polyenic chromophore โดยทั่วไปผลิตโดยรา *F. solani* ฟุซารินบางชนิด เช่น ฟุซาริน A, B, C และ D (ภาพที่ 19) ยังเป็นสารก่อกลายพันธุ์เมื่อทดสอบกับ Ames Salmonella fusarin C ยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยจะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเอสโตรเจน และก่อให้เกิดมะเร็งหลอดอาหารของมนุษย์ได้อีกด้วย (Sondergaard et al., 2011)



Fusarin A



Fusarin C



Fusarin D

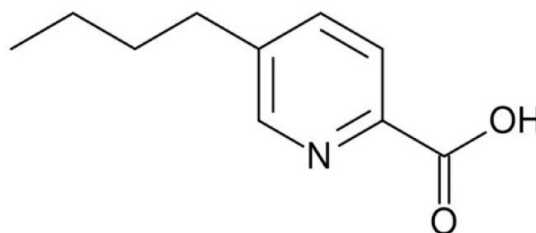
ภาพที่ 19 โครงสร้างฟุซาริน

ที่มา: Perincherry et al. (2016)

1.2.2.4 กรดฟุซาริก

กรดฟุซาริก (FA) (ภาพที่ 20) ผลิตโดยรา *F. moniliforme* (Perincherry et al., 2016) ขึ้นชื่อในเรื่องความเป็นพิษต่อพืช และเป็นหนึ่งในรายงานเกี่ยวกับไฟโตทอกซิน (Phytotoxin) ในอาการเหี่ยวของพืช เช่น มะเขือเทศ แม้ว่าสารพิษจะไม่มีบทบาทในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ แต่ก็มีส่วนสำคัญต่อกระบวนการพัฒนาการเป็นโรคในขั้นต่อไป โดยสารพิษยังสามารถเพิ่มระดับของ

ปฏิกิริยาออกซิเจน (Reactive oxygen species; ROS) ลดการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น catalase และ ascorbate peroxidase และทำให้เซลล์ใบมะเขือเทศที่งอกออกมาตาย ลดอัตราการสังเคราะห์แสง ลดกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ และทำให้โครงสร้างเซลล์หยุดชะงักนำไปสู่การเหี่ยวแห้ง (Perincherry et al., 2016)



Fusaric acid

ภาพที่ 20 โครงสร้างกรดฟูซาริก

ที่มา: Perincherry et al. (2016)

1.2.3 การป้องกัน และการกำจัดราก่อโรคพืช

การกำจัดราโรคพืชในดิน อาจทำได้หลากหลายวิธี เช่น การใช้วัสดุปลูกที่ปราศจากโรค หรือใช้สารกำจัดเชื้อราเคลือบเมล็ดพืช โดยสารฆ่าเชื้อราที่มีความหลากหลายทางเคมีที่มีการใช้ทั่วไป ได้แก่ thiram (Thiram 70 S), benomyl (Benlate), Dithane M-45 (Mancozed) และ Captafol (Difolatan) ซึ่งสารฆ่าเชื้อราดังกล่าวสามารถต่อต้าน โรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. (Fusarium root rot; FRR) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Eke et al., 2020)

จากงานวิจัยของ Becker และคณะ (2021) กล่าวว่า การผลิตผลไม้เชิงพาณิชย์ อย่างเช่น กล้วย โดยส่วนใหญ่จะใช้สารเคมีฆ่าเชื้อราที่มีราคาแพง และใช้บ่อยครั้งในการควบคุมโรคใน คอสตาริกา ซึ่งคิดเป็นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของการใช้สารกำจัดศัตรูพืชทั้งหมดในประเทศ โครงการกำจัดเชื้อราโรคพืชเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายประมาณ 1,500 ดอลลาร์สหรัฐฯ ต่อเฮกตาร์ต่อปี ในพื้นที่อื่น ๆ ของโลก ค่าใช้จ่ายจะอยู่ที่ประมาณ 500 ดอลลาร์สหรัฐฯ ต่อเฮกตาร์ต่อปี นอกจากนี้ ค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นสำหรับการกำจัดเชื้อราด้วยสารเคมี ยังมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่พึงประสงค์ ตามมา รวมถึงความเสี่ยงของเกษตรกรที่เพิ่มขึ้นจากการสัมผัสสารเคมี นอกจากนี้ ความต้านทานของ เชื้อโรคต่อสารฆ่าเชื้อราในระบบต่าง ๆ ยังเพิ่มขึ้นอีกด้วย

1.2.4 การใช้วิธีทางชีวภาพ (Biological control)

การควบคุมทางชีวภาพ เป็นการใช้จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อควบคุมศัตรูพืช ซึ่งจุลินทรีย์จะมีกระบวนการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary Metabolite) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่สังเคราะห์ขึ้นโดยแบคทีเรีย เชื้อรา และพืชเป็นหลัก เป็นโมเลกุลที่มีน้ำหนักต่ำ มีโครงสร้างทางเคมี และกิจกรรมทางชีววิทยาที่หลากหลาย

เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ คือสารประกอบที่ไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการเผาผลาญ การเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปแล้วจะมีหน้าที่ออกฤทธิ์เพื่อปกป้องสิ่งมีชีวิตจากสภาวะความเครียดจากสิ่งแวดล้อม และผู้ล่า (Srivastava et al., 2020)

ปัจจุบันเกษตรกรหันมานิยมใช้สารกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพกันมากขึ้น เนื่องจากเป็นทางเลือกที่ทดแทนการใช้ยาฆ่าแมลงเคมี เพื่อลดความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าสารเคมีกำจัดเชื้อรา และเป็นที่ยอมรับสำหรับใช้ในการเกษตรอินทรีย์ (Quiroz et al., 2019)

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วิธีทางชีวภาพ เช่น Haddoudi et al. (2021) พบว่า *Bacillus* spp. มียีน *fenD*, *bmyB*, *spaS*, *dfnM*, *ituA*, *mycA*, *srfAA* ซึ่งเป็นยีนที่ผลิตไลโปเปปไทด์ ชนิด iturins, fengycins และ surfactin ส่งผลให้สามารถควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจาก *Fusarium equiseti* ในถั่วปากอ้า (*Vicia faba*) ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ 82 เปอร์เซ็นต์ และ Mendoza and Velandia (2022) ได้วิจัยเรื่องความสามารถของส่วนใย และเซลล์จาก *Bacillus velezensis* ที่ช่วยลดการเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากรา *Fusarium* เป็นต้น

1.2.5 แหล่งที่มาของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ประกอบด้วยกลุ่มที่อาศัยอยู่ในดิน ผิวดิน ในอากาศ ในน้ำ ตลอดจนสภาวะแวดล้อมรุนแรง เช่น ดินภูเขาไฟ ดินและน้ำในบ่อน้ำพุร้อน บางสายพันธุ์พบปนเปื้อนอยู่ในอาหาร เครื่องดื่ม ตลอดจนระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต

ดินเป็นแหล่งที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ต่าง ๆ จำนวน และชนิดของจุลินทรีย์ในดินขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดิน ความเป็นกรด ปริมาณความชื้น และปัจจัยต่าง ๆ โดยทั่วไปจุลินทรีย์มักอาศัยอยู่ตามผิวดินของดิน ยิ่งลึกลงไปยิ่งมีจุลินทรีย์น้อย โดยจุลินทรีย์ในดินที่มีประโยชน์ ได้แก่ จุลินทรีย์ในดินที่เป็นประโยชน์ เช่น *Glomeromycota*, *Mortierellomycota*, *Humicola* และ *Bacillus* sp. (Pu et al., 2022)

บาซิลลัสจัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ ซึ่งประกอบด้วยหลายสปีชีส์ที่แตกต่างกัน อยู่ในตระกูล *Bacillaceae* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และฟีโนไทป์ สามารถอยู่รอดในระบบนิเวศที่หลากหลายทั้งแหล่งน้ำ แม่น้ำ บ่อน้ำพุร้อน อากาศ พืช สิ่งแวดล้อมทางทะเล

และระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ แต่โดยส่วนใหญ่พบมากในดินเหนียว ดินทราย ดินตะกอนทะเล เป็นต้น การสร้างสปอร์ของบาซิลลัสจะช่วยให้มีชีวิตรอดในการเปลี่ยนแปลงทางสิ่งแวดล้อมได้ดี ความสามารถในการสร้างสปอร์ของบาซิลลัสถือเป็นข้อได้เปรียบสำหรับการนำไปใช้งานหลาย ๆ ด้าน เนื่องจากมีความสามารถทนต่อความร้อนทำให้การนำไปแปรรูป หรือใช้เป็นผลิตภัณฑ์ โดยสามารถเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิห้องในรูปแบบผงให้แห้งโดยไม่มีผลเสียต่อการดำรงชีวิต อีกทั้งสปอร์ของบาซิลลัสยังสามารถอยู่รอดได้ในค่าความเป็นกรดต่ำทั้งในสภาวะแวดล้อมและกระเพาะอาหารของมนุษย์ และสัตว์ (Achi and Halami, 2016)

การมีอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลายของบาซิลลัสทำให้นักวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นคัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณป่าชายเลน (mangrove forest หรือ intertidal forest) เนื่องจากเป็นระบบนิเวศที่อยู่ในแนวเชื่อมต่อระหว่างพื้นดินกับพื้นน้ำ มีที่ตั้งอยู่แถบภูมิภาคเขตร้อน และกึ่งเขตร้อนของโลก เป็นระบบนิเวศที่มีความเฉพาะตัวมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง เนื่องจากมีกระแสน้ำขึ้น น้ำลงเป็นระยะ ซึ่งทำให้ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น ความเค็ม และความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารมีความแปรปรวนอย่างมาก จึงทำให้เป็นแหล่งกำเนิดของห่วงโซ่อาหารให้กับสิ่งมีชีวิต รวมไปถึงจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณป่าชายเลนจะมีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนสารอาหารในดิน โดยบางกลุ่มเป็นทั้งผู้ย่อยสลาย และผู้สังเคราะห์ สารอาหารของป่าชายเลน (Huergo et al., 2018) จุลินทรีย์ในป่าชายเลนจะเปลี่ยนสารอาหารจากพืชในป่าชายเลนที่ตายแล้วให้เป็นแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และสารอาหารอื่น ๆ ที่ให้พืชชนิดอื่นสามารถนำมาใช้งานได้ ความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์จากระบบนิเวศเหล่านี้จะช่วยในการแยก และระบุจุลินทรีย์ชนิดใหม่ และมีศักยภาพที่มีความจำเพาะสูง ระบบนิเวศป่าชายเลนจึงมีจุลินทรีย์จำนวนมากซึ่งสามารถปรับให้เข้ากับน้ำเค็มปานกลาง และสภาพแวดล้อมที่ผันผวนได้ จุลินทรีย์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนสารอาหารเช่น คาร์บอน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส และควบคุมสภาพแวดล้อมทางเคมีของระบบนิเวศป่าชายเลน (Alongi et al., 1993) การศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วยความหลากหลายของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และ แอคติโนมัยซิส จากระบบนิเวศป่าชายเลน (Sahoo and Dhal, 2009)

ในป่าชายเลนจะประกอบไปด้วยแบคทีเรีย 91 เปอร์เซ็นต์ (Alongi et al. 1998) แบคทีเรียและยีสต์มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเศษซากในระบบนิเวศป่าชายเลน (Maria and Sridhar, 2002) กลุ่มแบคทีเรียในป่าชายเลน ได้แก่ (Kathiresan and Bingham, 2001)

1. แบคทีเรียรีดิวซ์ซัลเฟต (Sulfate-reducing bacteria) เช่น *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfosarcina* และ *Desulfococcus* sp

2. แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (N_2 -fixing bacteria) เช่น *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium* และ *Klebsiella* sp

3. แบคทีเรียสังเคราะห์แสงแต่ไม่มีออกซิเจนเกิดขึ้น (Photosynthetic anoxygenic bacteria) เช่น *Chloronema*, *Chromatium*, *Beggiatoa*, *Thiopedia* และ *Leucothiobacteria* sp.

4. แบคทีเรียที่ดำรงชีวิตภายใต้สภาวะไร้อากาศ (Methanogenic bacteria) เช่น *Methanococcus methylutens* sp.

5. แบคทีเรียที่ย่อยสลายฟอสเฟต (Phosphate-solubilizing bacteria) เช่น *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Xanthobacter*, *Vibrio proteolyticus*, *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Chryseomonas* และ *Pseudomonas* sp.

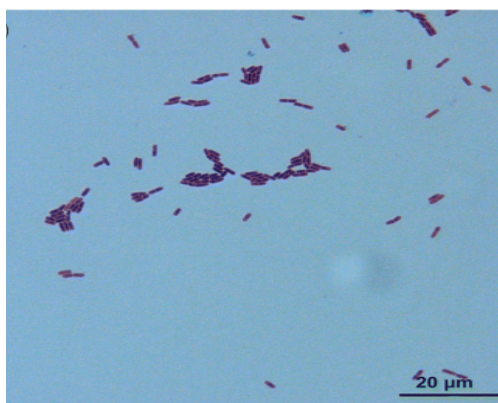
จุลินทรีย์ป่าชายเลนมีศักยภาพในการผลิตสารที่สำคัญหลายชนิด เช่น สารต้านจุลชีพ สารฆ่าแมลง รวมถึงเอนไซม์ที่สามารถต้านมะเร็ง วิตามินที่ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันและสารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน (Thatoi et al., 2012) เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลน สามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์สำหรับใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพในการยับยั้งโรคเหี่ยวในพริก (Hu et al., 2010) โดย *B. amyloliquefaciens* ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลน สามารถผลิตสารควบคุมทางชีวภาพได้ เช่น สารจำพวกแบคเทอริโอซิน (bacteriocins) ซึ่งเป็นสารควบคุมทางชีวภาพที่สำคัญในการควบคุมโรคพืช (Márcia et al., 2006)

จากงานวิจัยเรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพและศักยภาพของจุลินทรีย์จากระบบนิเวศป่าชายเลน ซึ่งได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบนิเวศป่าชายเลน ได้แก่ แบคทีเรีย รา และ แอคติโนมัยซิส จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์เหล่านี้มีความสำคัญต่อระบบนิเวศป่าชายเลนเป็นอย่างมาก เป็นทั้งผู้ย่อยสลาย ผู้ผลิตสารทางชีวภาพ และผู้สร้างสมดุลภายในระบบนิเวศป่าชายเลน (Thatoi et al., 2012) และการคัดแยก *Bacillus solimangrovi* sp. จากดินบริเวณป่าชายเลนใกล้ชายทะเลของเกาะเวนู รัฐซูก ประเทศไมโครนีเชีย ซึ่งพบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลต คือ GH2-4T และ GH2-5 ที่คาดว่า จะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus solimangrovi* (Lee et al., 2014)

1.2.6 แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส (*Bacillus* sp.)

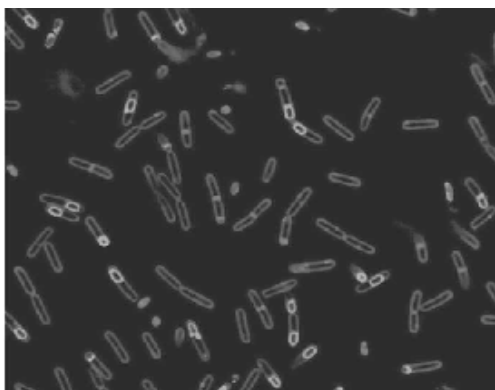
แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่ง (Rod-shape) ย้อมติดแกรมบวก (Gram positive) (ภาพที่ 21) อยู่ในวงศ์ *Bacillaceae* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (Facultative anaerobic) และเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า (flagella)

Bacillus sp. เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) เนื่องจากมีการสร้างเอนโดสปอร์ (spore forming bacteria) (ภาพที่ 22) โดยเอนโดสปอร์ (Endospore) โดยเกิดขึ้นภายในเซลล์ และสร้างได้เพียง 1 สปอร์ต่อ 1 เซลล์ ซึ่งจัดเป็นโครงสร้างที่ทำให้แบคทีเรียมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เอนโดสปอร์สามารถทนต่อความแห้งแล้ง สีย้อมสารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อ รังสี และความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้ดี แต่ส่วนใหญ่ทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 80 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 10 นาที (บัญญัติ, 2534)



ภาพที่ 21 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

ที่มา : Tan et al. (2018)



ภาพที่ 22 เอนโดสปอร์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

ที่มา : Daniel and John (2008)

แบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสเหล่านี้ล้วนมีความสำคัญ และบทบาทที่แตกต่างกันออกไป บางชนิดเป็นแบคทีเรียที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant growth promoting rhizobacteria) อีกทั้งสร้างสารปฏิชีวนะ และสารควบคุมทางชีวภาพเพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีรายงานว่า *Bacillus amyloliquefaciens* ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลน

ในประเทศจีน สามารถยับยั้งโรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากรา *Ralstonia solanacearum* ได้ (Hu et al., 2010) *B. subtilis* สามารถหลั่งสารต้านเชื้อราหลายชนิด เช่น bacitracin, subtilin, bacillin และ bacillomycin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราหลายชนิด และยังระบุด้วยว่า *B. subtilis* ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของ *F. solani* (Al-Fadhal et al. 2018)

1.2.7 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส

แบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายรูปแบบ ทั้งการสังเคราะห์ทางชีวเคมี เช่น กระบวนการเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ได้แก่ เปปไทด์ (Peptides) สารประกอบโพลีคีไทด์ (Polyketide) และไลโปเปปไทด์ (Lipopeptides) เป็นต้น โดยส่วนใหญ่มักพบสารกลุ่มไลโปเปปไทด์ ซึ่งกลไกการผลิตมีความซับซ้อนโดยเริ่มปฏิกิริยาของการสังเคราะห์เปปไทด์ โดยเอนไซม์เปปไทด์ซินทีเทสที่ไม่ใช้ไรโบโซม (non-ribosomal peptide synthetases :NRPSs) ซึ่งเป็นเอนไซม์เชิงซ้อนขนาดใหญ่ที่มีโครงสร้างแบบแยกส่วน โดยแต่ละโมเลกุลจะรวมตัวกับกรดอะมิโนเฉพาะ โดยสารไลโปเปปไทด์จะมีฤทธิ์ในการยับยั้ง แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในพืช ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะประกอบไปด้วย iturin, fengycin และ surfactin ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อก่อโรคพืช

อิทูลิน (Iturin) จัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของราก่อโรค ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการพัฒนาของสปอร์ และเส้นใยราได้หลากหลายสายพันธุ์ เช่นจากงานวิจัยของ Thasana et al. (2010) รายงานว่า *Bacillus subtilis* SSE4 สามารถผลิตอิทูลิน เพื่อต่อต้านราก่อโรค *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้ (Kim et al., 2010) รายงานว่า *Bacillus subtilis* CMB32 สามารถผลิตไลโปเปปไทด์ ได้ทั้งสามชนิด ได้แก่ iturin A, fengycin และ surfactin A เพื่อต้านรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส iturin A เป็นกลุ่มย่อยของ iturins เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของราก่อโรค เช่น *Aspergillus carbonarius* โดยจะทำให้เกิดการออสโมติกขึ้นภายในเซลล์รา เมื่อภายในเซลล์ไม่มีความสมดุล จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการสร้างพลังงาน การขนส่ง และ เมตาบอลิซึมแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ลง (Tunsagool et al., 2021)

เฟนจิงซิน (Fengycin) จัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการควบคุมราโรคพืชได้ เช่น *Fusarium* และ *Colletotrichum* โดยเฟนจิงซินจะเข้าไปสลายเยื่อหุ้มผนังเซลล์รา ทำให้สารและองค์ประกอบภายในเกิดการรั่วไหล และการสลายออกมาภายนอกเซลล์ (Tunsagool et al., 2021)

เซอแฟกติน (Surfactin) จัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการชะลอการเจริญเติบโตของรา *Fusarium* sp. เช่น *F. moniliforme* ซึ่งเกี่ยวข้องกับ mycotoxicosis ในสัตว์และมนุษย์ (Tunsagool et al., 2021)

นอกจากนี้สารควบคุมทางชีวภาพที่ผลิตโดยแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสยังมีอีกหลากหลายชนิดดังแสดงใน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เชื้อบาซิลลัสที่ผลิตไลโปเปปไทด์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

แบคทีเรียกลุ่ม <i>Bacillus</i>	ไลโปเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	เชื้อราก่อโรคพืช	โรคพืช
<i>Bacillus subtilis</i>	Iturin/Fengycin	<i>Pythium ultimum</i> ; <i>Botrytis cinerea</i>	Damping-off of bean; Gray mold of apple
	Iturin/Fengycin	<i>Podosphaera fusca</i>	Powdery mildew of cucurbits
	Iturin A/Fengycin	<i>Penicillium digitatum</i>	Green mold postharvest disease in mandarin fruit
	Bacillomycin Ls/ Fengycin	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fusarium wilt
	Iturin A/Surfactin	<i>Pestalotiopsis eugeniae</i>	Pestalotiopsis apple fruit rot
	Iturin/Surfactin	<i>Phomopsis phaseoli</i> ; <i>Botrytis cinerea</i> and <i>Bremia lactucae</i>	Pod and stem blight of soybeans; Gray mold disease of tomato and downy mildew of lettuce
	Iturin A/Subtulene A	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> and <i>Sclerotium rolfsii</i>	Anthracnose disease and Southern blight on vegetables
	Fengycin	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fusarium wilt of cucumber

ที่มา : Fira et al, (2018)

ตารางที่ 1 (ต่อ) เชื้อบาซิลลัสที่ผลิตไลโปเปปไทด์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

แบคทีเรียกลุ่ม <i>Bacillus</i>	ไลโปเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	เชื้อราก่อโรคพืช	โรคพืช
	Fengycin	<i>Fusarium graminearum</i>	Wheat and barley head blight and corn ear rot
	Fengycin	<i>Fusarium culmorum</i>	Fusarium foot rot of wheat
	Fengycin	<i>Fusarium moniliforme</i>	Corn seedling blight, stalk and ear rot
<i>Bacillus subtilis</i>	Fengycin	<i>Monilinia laxa</i> and <i>Monilinia fructicola</i>	Peach brown rot
	Fengycin	<i>Rhizoctonia solani</i>	Cotton damping-off disease
	Fengycin	<i>Botrytis cinerea</i>	Gray mold disease of apple
	Fengycin C	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Black leaf streak of banana
	Iturin A	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i> ; <i>Rosellinia necatrix</i>	Fusarium crown and root rot of tomato; Avocado root rot
	Iturin A	<i>Gloeosporium gloeosporioides</i>	Anthraco-nose disease in fruits and vegetables

ที่มา : Fira et al, (2018)

ตารางที่ 1 (ต่อ) เชื้อบาซิลลัสที่ผลิตไลโปเปปไทด์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

แบคทีเรียกลุ่ม <i>Bacillus</i>	ไลโปเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	เชื้อราก่อโรคพืช	โรคพืช
	Iturin A	<i>Gloeosporium gloeosporioides</i>	Anthracnose disease in fruits and vegetables
<i>Bacillus subtilis</i>	Iturin A	<i>Rhizoctonia solani</i> and <i>Phomopsis</i> sp.	Damping-off of tomato seedlings and Phomopsis root rot of cucumber
	Bacillomycin D/ Surfactin	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. flavus</i> and <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Aflatoxin-producing and the citrus anthracnosis agents
	Mycosubtilin	<i>Pythium aphanidermatum</i> ; <i>Botrytis cinerea</i> and <i>Fusarium oxysporum</i>	Damping-off of tomato; Gray mold disease of apple; Fusarium wilt
<i>Bacillus</i> sp.	Iturin A	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Pythium irregulare</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Wheat scab; Rice sheath blight; Watermelon wilt
<i>Bacillus circulans</i>	Iturin A	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fusarium crown and root rot of tomato

ที่มา : Fira et al, (2018)

ตารางที่ 1 (ต่อ) เชื้อบาซิลลัสที่ผลิตไลโปเปปไทด์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

แบคทีเรียกลุ่ม <i>Bacillus</i>	ไลโปเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	เชื้อราก่อโรคพืช	โรคพืช
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Kurstakin	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Anthracnose disease in fruits
<i>Bacillus pumilus</i>	Pumilacidin	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> and <i>Sclerotium rolfsii</i>	Damping-off of soybean; Damping off, root and stem rots, and blights of fruit; Southern blight on peanut, tomato, watermelon, cowpea, sugar beet, rice and wheat
<i>Bacillus vallismortis</i>	Bacillomycin D	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Cryphonectria parasitica</i> and <i>Phytophthora capsici</i>	Several pre- and postharvest wheat and vegetable diseases
<i>Bacillus licheniformis</i>	Surfactin	<i>Magnaporthe grisea</i>	Rice seedling blight
<i>Bacillus mojavensis</i>	Surfactin	<i>Fusarium verticillioides</i>	Maize rotting and wilting
<i>Bacillus mojavensis</i>	Mojavensin A	<i>Valsa mali</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i> , and <i>Fusarium verticillioides</i>	Infection of apple shoot pruning wounds; Fusarium wilt of cucumber; Maize rotting and wilting

ที่มา : Fira et al, (2018)

ตารางที่ 1 (ต่อ) เชื้อบาซิลลัสที่ผลิตไลโปเปปไทด์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

แบคทีเรียกลุ่ม <i>Bacillus</i>	ไลโปเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	เชื้อราก่อโรคพืช	โรคพืช
	Iturin/Fengycin	<i>Aspergillus phoenicis</i> , <i>Bipolaris sorokiniana</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>licopersici</i>	Food spoilage of fruits and wheat; Seedling diseases, common root rot and spot blotch of wheat; <i>Fusarium</i> crown and root rot of tomato
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Iturin/Surfactin	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Botryosphaeria obtusa</i> , <i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. nygamai</i> , <i>F. polyfalidicum</i> , <i>Monilinia fructigena</i> , <i>Mucor</i> sp. and <i>Penicillium expansum</i>	Several pre- and postharvest diseases in fruits and vegetables as well as on the medicinal plants
	Iturin/Surfactin	<i>Rhizoctonia solani</i>	Damping-off of soybean
	Bacillomycin D/ Fengycin	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>spinaciae</i>	<i>Fusarium</i> wilt on spinach

ที่มา : Fira et al, (2018)

ตารางที่ 1 (ต่อ) เชื้อบาซิลลัสที่ผลิตไลโปเปปไทด์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

แบคทีเรียกลุ่ม <i>Bacillus</i>	ไลโปเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	เชื้อราก่อโรคพืช	โรคพืช
	Surfactin/Fengycin	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Sclerotinia stem rot disease
	Surfactin/Fengycin	<i>Penicillium italicum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> and <i>Erysiphe graminis hordei</i>	Apple rot; Fusarium foot rot of wheat; Tomato rot; Rice blast and sheath slight; Powdery mildew on cereals
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Iturin A	<i>Alternaria citri</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> and <i>Penicillium crustosum</i>	Postharvest fungal diseases in fruits
	Bacillomycin D	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Fusarium wilt of cucumber
	Bacillomycin L/D	<i>Rhizoctonia solani</i>	Damping-off of soybean
	Surfactin	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> and <i>Fusarium solani</i>	Sclerotinia stem rot of oil seed rape; Cucumber <i>Rhizoctonia</i> rot; Pepper root rot

ที่มา : Fira et al, (2018)

ตารางที่ 1 (ต่อ) เชื้อบาซิลลัสที่ผลิตไลโปเปปไทด์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรครพืช

แบคทีเรียกลุ่ม	<i>Bacillus</i>	ไลโปเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	เชื้อราก่อโรครพืช	โรครพืช
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Fengycin	<i>Verticillium dahliae</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> and <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>		Verticillium wilt, Fusarium wilt of cucumber; Pepper root rot; Back shank, a severe root and crown rot of tobacco
	Surfactin	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>		Root and foliar diseases of soybeans
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactin	<i>Pseudomonas syringae</i>		Arabidopsis root infection
	Iturin	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i> ; <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>		Bacterial leaf spot and soft rot on melon leaves
	Iturin/Surfactin	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> and <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>		Citrus canker

ที่มา : Fira et al, (2018)

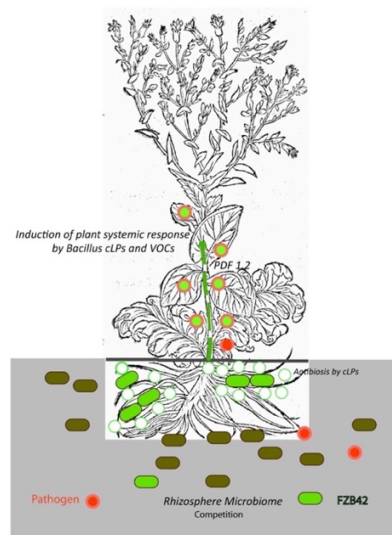
ตารางที่ 1 (ต่อ) เชื้อบาซิลลัสที่ผลิตไลโปเปปไทด์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

แบคทีเรียกลุ่ม <i>Bacillus</i>	ไลโปเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	เชื้อราก่อโรคพืช	โรคพืช
	Iturin/Surfactin	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Walnut blight
	Iturin	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	Sugar beet blight
	Iturin A2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ; <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> ; <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> and <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Crown gall; Several bacterial wilt and rot plant diseases
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Surfactin/Fengycin	<i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>fragariae</i> , <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Several bacterial wilt and rot plant diseases
	Fengycin	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Bacterial wilt and canker of tomato
	Surfactin	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Bacterial leaf spot and soft rot on plant leaves
	Bacillomycin L	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Crown gall disease
	Iturin	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Rice blight

ที่มา : Fira et al, (2018)

1.2.8 กลไกการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยบาซิลลัส

การควบคุมโรคพืชโดยใช้แบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส เป็นแนวทางใหม่ และมีความปลอดภัยสำหรับการเกษตรที่ยั่งยืนมากขึ้น ที่นอกจากไม่ส่งผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อมโดยรอบแล้ว ยังไม่ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์บริเวณรากพืชด้วย Choudhary et al. (2015) วิจัยเรื่องกลไกการควบคุมทางชีวภาพโดย *B. amyloliquefaciens* FZB42 ที่เกี่ยวข้องกับรากพืช มีการใช้แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* FZB42 (สีเขียวอ่อน) (ภาพที่ 23) ที่แสดงปฏิสัมพันธ์กับเชื้อราโรคพืช *R. solani* (แสดงสัญลักษณ์วงกลมสีแดง) และพืชผักกาดหอม (*Lactuca sativa*) ที่สามารถอธิบายได้ว่า *B. amyloliquefaciens* FZB42 มีชีวิตอยู่บริเวณที่ผิวรากพืช และสามารถผลิตไลโปเปปไทด์ที่ไม่ใช่ไรโบโซม ในกลุ่มของ surfactin และ bacillomycin D และ fengycin ได้ อีกทั้งยังพบการผลิตสาร Volatile Organic Compounds (VOCs) เช่น acetoin, 2,3-butandiol และเปปไทด์ขนาดเล็ก เช่น plantazolicin, amylocyclicin ได้สูง และยังสามารถผลิตขึ้นในบริเวณใกล้เคียงกับรากพืช การใช้ยาปฏิชีวนะ และการแข่งขันแย่งแย่งสารอาหาร เช่น ธาตุเหล็ก จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในพืชได้ เมื่อพืชมีการติดเชื้อรา หรือเกิดการบุกรุก ยังมีการส่งสัญญาณให้ *B. amyloliquefaciens* FZB42 ให้สร้างสารควบคุมโรค และป้องกันพืชได้อีกด้วย และการฉีดเชื้อ *B. amyloliquefaciens* FZB42 ถือเป็นแบคทีเรียที่ดีในการนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืช เนื่องจากเป็นมิตร และไม่ส่งผลกระทบต่อชุมชนจุลินทรีย์รอบรากพืช ดังนั้น การยับยั้งราก่อโรคในพืชให้มีประสิทธิภาพอาจเกิดจากการยับยั้งการเจริญของราจากหลายกลไกร่วมกัน



ภาพที่ 23 การควบคุมทางชีวภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อพืช
ที่มา Choudhary et al. (2015)

1.2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Thatoi และคณะ (2012) รายงานว่าป่าชายเลนล้วนมีความหลากหลายทางชีวภาพ และจุลินทรีย์จากระบบนิเวศป่าชายเลนยังมีศักยภาพในการเป็นผู้ผลิต ผู้ย่อยสลาย และผู้สร้างสมดุลภายในระบบนิเวศป่าชายเลน ซึ่งจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบนิเวศป่าชายเลนโดยส่วนใหญ่ ได้แก่ แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซิส แต่จุลินทรีย์ที่อยู่ในป่าชายเลนนี้จะมีการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดได้เป็นอย่างดี เพราะมีการเปลี่ยนแปลงของกระแส น้ำ ค่าความเค็ม pH อุณหภูมิอยู่ตลอดเวลา นอกจากการดำรงชีวิตแล้วจุลินทรีย์ยังมีการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ phytase, phosphatase, amylase, protease, esterase และ lipases สร้างโปรตีน ได้แก่ Lipopeptides และ glycolipids และสร้างยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Enalin A และ B และ 2-Pyrone derivative เป็นต้น

Lee และคณะ (2014) ได้คัดแยก *Bacillus solimangrovi* sp. จากดินบริเวณป่าชายเลนใกล้ชายทะเลของเกาะเวนู รัฐชุก ประเทศไมโครนีเซีย พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลต คือ GH2-4T และ GH2-5 ที่คาดว่าจะแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus solimangrovi* sp. เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าโคโลนีมีลักษณะเป็นวงกลม นูน สายพันธุ์ GH2-4T มีสีเหลืองใส และสายพันธุ์ GH2-5 มีสีขาวขุ่น เซลล์ย้อมติดสีแกรมบวก มีการเคลื่อนที่ได้ รูปร่างแท่ง มีการสร้างเอนโดสปอร์ สามารถเจริญได้ดีระหว่าง pH 5 ถึง pH 12 แต่สภาวะที่เหมาะสมสามารถเจริญได้ดีที่สุด pH 9 อุณหภูมิที่ 10 ถึง 40 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิเหมาะสมที่สุด 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส

Kurniawan และคณะ (2019) ได้คัดแยก *Bacillus* จากน้ำทะเล และทรายบริเวณทะเล พบว่าให้ผลทดสอบ คاتاเลส การย่อยแป้ง ให้ผลบวก มีสภาพการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่สุดอยู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 7 ถึง pH 8 และสามารถเติบโตได้ด้วยความเข้มข้นของเกลือ 0 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบยับยั้งการเจริญเติบโตของราพบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ B26 มีศักยภาพการยับยั้งรา *Fusarium solani* และ *Penicillium chrysogenum* ถึง 69 เปอร์เซ็นต์ และ 46.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Sowanpreecha และ Rerngsamran (2018) ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีน Catalase และ Protease ของ *Pseudomonas aeruginosa* RS1 สร้างได้เมื่ออยู่ในสภาวะอาหาร LB ที่ค่า pH 7 อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 21 ชั่วโมง โดยโปรตีนเหล่านี้จะไปยับยั้งรา *Phytophthora palmivora* ที่ทำให้เกิดโรคในกล้วยไม้ได้

Guevara และคณะ (2019) ได้จำแนกชนิดสารอินทรีย์ระเหย (volatile organic compounds: VOCs) ที่สามารถผลิตได้จากแบคทีเรีย *Bacillus* และ *Pseudomonas* ซึ่งคัดแยกได้จากบริเวณรากต้นอะโวคาโด มีผลต่อต้านการเจริญของรา *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. และ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุของโรค ได้ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์เพื่อแยกชนิดของสารระเหยด้วยวิธี Solid phase microextraction (SPME) และ

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) พบว่าเป็น คีโตน ไพราซีน และสารประกอบที่มีกำมะถัน ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ลักษณะเส้นใยราก่อโรคผิดปกติ และไม่สามารถเจริญได้

Cavaglieri และคณะ (2005) ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ Fumonisin B1 ที่สร้างโดย *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้งรา *Fusarium verticillioides* สาเหตุของโรครากเน่าข้าวโพด และยังเป็นแบคทีเรียที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวโพดได้เมื่อใช้ในปริมาณเซลล์เหมาะสมที่ 10^7 ถึง 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

Joo และคณะ (2015) ได้คัดแยก *Brevibacillus reuszeri* จากดินที่ปลูกข้าว พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Fusarium* spp. ที่ก่อโรคในฝักข้าวโพด ได้สูงสุดถึง 21 เปอร์เซ็นต์ โดยมีระยะเวลาการยับยั้งนานถึง 21 วัน

Riaz และคณะ (2021) ศึกษาศักยภาพของ *Bacillus subtilis* FZV-1 และ *B. halotolerans* สามารถสร้าง siderophores, protease, glucanases, surfactin และ fengycin ที่ยับยั้งรา *Fusarium solani* สาเหตุโรครากเน่าในถั่ว (*Pisum sativum* L.) และแบคทีเรียยังช่วยเพิ่มความยาวต้นถั่วได้ถึง 29 ถึง 64 เปอร์เซ็นต์ ความยาวราก 23 ถึง 78 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักสด 28 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียยังลดความรุนแรงของโรครากเน่าที่เกิดจากรา *F. solani* ได้ถึง 25 ถึง 89 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งแบคทีเรียยังช่วยในการเจริญเติบโตของพืชได้อีกด้วย

Bhattacharya และคณะ (2016) ศึกษาศักยภาพของ *Bacillus pumilus* JUBCH08 ที่สามารถผลิตไคตินเนส และสามารถทนต่อความร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และทนต่อเบสที่ pH 8 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และสารควบคุมทางชีวภาพยังสามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ถึง 45 เปอร์เซ็นต์

Arrebola และคณะ (2010) ศึกษาศักยภาพของ *Bacillus amyloliquefaciens* ที่สามารถผลิตสาร fengycin, iturin และ surfactin ที่ยับยั้งราก่อโรคทั้ง 7 สายพันธุ์ได้ ได้แก่ *Alternaria citri*, *Botryosphaeria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusicoccum aromaticum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Penicillium crustosum* และ *Phomopsis perseae* ได้ โดยทำให้ลักษณะเส้นใยผิดปกติ มีการบวมของสปอร์ทำให้เกิดความไม่สมดุลขึ้น และไม่สามารถเจริญได้

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. จากดินบริเวณป่าชายเลนที่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืช
2. เพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของ *Bacillus* sp. ที่แยกได้ และทดสอบความเสถียรของน้ำเลี้ยงเชื้อ
3. เพื่อทดสอบศักยภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ในการป้องกันหรือยับยั้งราก่อโรคพืชในต้นข้าวโพด

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วิธีดำเนินการ

2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

โดยคัดเลือกแหล่งที่มีการเข้าถึงน้ำทะเล มีสภาวะทั้งน้ำเค็ม และน้ำกร่อย โดยมีพืชที่เจริญในพื้นที่โดยส่วนใหญ่เป็นไม้ยืนต้น เช่น โกงกางใบเล็ก โกงกางใบใหญ่ ต้นจาก ตีนเป็ดทะเล ลำพู แสมทะเล เป็นต้น โดยมีสภาพดินโดยส่วนใหญ่เป็นดินเลน เก็บดินเป็นจุดระยะห่าง 100 ถึง 150 เมตร และเลือกเก็บเฉพาะใต้ต้นไม้เพื่อจะได้พบแบคทีเรียได้

2.1.1.1 ดินจากป่าชายเลนแหลมตะลุมพุก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช

2.1.1.2 ดินจากป่าชายเลนศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลน และป่าชายฝั่ง
อำเภอขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช

2.1.1.3 ดินจากป่าชายเลน อำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช

2.1.1.4 ดินจากป่าชายเลนท่าทอง อำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี

2.1.1.5 ดินจากป่าชายเลนบางไปไม้ อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี

2.1.1.6 ดินจากป่าชายเลนลีเล็ด อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี

2.1.2 การคัดแยกแบคทีเรีย การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี

2.1.2.1 การเก็บตัวอย่างดิน และการคัดแยกเชื้อ

เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ป่าชายเลน โดยเก็บตัวอย่างดินแบบสุ่ม 5 ตำแหน่งที่ระดับความลึก 15 เซนติเมตร นำดินที่ได้ใส่ในถุงซิปล็อคพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ แล้วใส่กล่องเพื่อเก็บรักษาตัวอย่างในระหว่างที่ขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างดินบริเวณป่าชายเลนมาชั่ง 5 กรัม แล้วแขวนลอยด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดที่หนึ่งนำสารแขวนลอยมาเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-2} - 10^{-6} และนำสารแขวนลอยตัวอย่างที่ความเจือจาง 10^{-4} - 10^{-6} มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) โดยแต่ละความเข้มข้นทดลอง 2 ซ้ำ ชุดการทดลองที่สองนำสารแขวนลอยมาเจือจางที่ความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-3} นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที (ดัดแปลงจาก Ashwini and Srividya, 2013) หลังจากนั้นนำมาเกลี่ย (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยแต่ละความเจือจางทดลอง 2 ซ้ำ นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการบ่มตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร และคำนวณหาปริมาณเชื้อดัง สูตรที่ 1

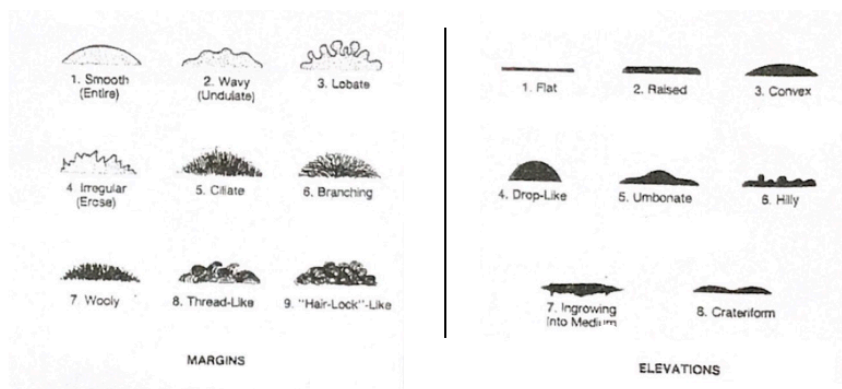
สูตรที่ 1 คำนวณหาปริมาณเชื้อ

จำนวนแบคทีเรีย (CFU/มิลลิลิตร หรือกรัม) = (จำนวนโคโลนี x 1/ค่าการเจือจาง)/ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

การเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะโคโลนี และการเก็บ Stock เชื้อ โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ด้วยวิธีการ Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จนได้เป็นโคโลนีเดี่ยว บันทึกลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 2) (ภาพที่ 24) และนำเชื้อที่ได้เก็บ Stock เชื้อ โดยแยกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในเหลว Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 600 ไมโครลิตร มาใส่ลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อในกลีเซอรอล เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2 ลักษณะการเจริญของโคโลนี บนอาหาร NA

ลักษณะการเจริญของโคโลนี บนอาหาร NA			
ลักษณะการยกตัวของโคโลนี		ลักษณะขอบของโคโลนี	
Effuse	โคโลนีบางมาก แผ่นบนผิววุ้น	Smooth (Entire)	ขอบเรียบ
Flat	โคโลนีแบนราบ	Undulate (Wavy)	ขอบเว้าโค้งเป็นคลื่น
Raised	โคโลนีราบแต่มีความหนา	Lobate	ขอบหยักโค้งมน
Convex	โคโลนีนูนโค้ง	Erose (Irregular)	ขอบหยักเป็นฟันเลื่อย
Pulvinate (drop-link)	โคโลนีนูนมาก	Filamentous (branching)	ขอบเป็นเส้น filament
Umbonate	โคโลนีจุกตรงกลาง	Curled	ขอบเป็นเส้นคลื่นขนาดกัน
Ingrowing into medium	โคโลนีเจริญเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ	Wooly	ขอบเป็นปุย



ภาพที่ 24 ลักษณะการเจริญของโคโลนี บนอาหาร NA
ที่มา : สุชาติดา และ กาญจนา (2556)

2.1.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี

การย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ได้จากการแยกให้บริสุทธิ์ ทดสอบการติดสีแกรม เพื่อดูรูปร่างของเซลล์ โดยใช้ชุดย้อมแกรม และนำเฉพาะแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก ลักษณะรูปร่างแท่งสั้น และแท่งยาว ไปทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ การย่อยแป้ง (Starch hydrolysis), การสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase test), การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) และการเคลื่อนที่ (Motility test) (Navinchandran et al., 2014)

2.1.2.2.1 การทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) นำเข็มเขี่ยเชื้อไปแตะเชื้อ แล้วนำเชื้อมาขีดลงบนอาหารแข็ง Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการบ่มหยดด้วย Iodine solution จนทั่วผิวหน้าอาหาร สังเกตผลการทดลอง ผลบวกจะเกิดโซนใสของอาหาร ซึ่งแบคทีเรียสามารถย่อยแป้งได้ ผลลบอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จะไม่เกิดโซนของการย่อยแป้ง (ศุภยางค์, 2547)

2.1.2.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase test) นำห้วงถ่ายเชื้อไปแตะเชื้อจากอาหาร NA แล้วนำเชื้อมาแตะลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเชื้อที่อยู่บนกระจกสไลด์ สังเกตผลการทดลอง โดยผลบวกจะเกิดฟองก๊าซทันที ผลลบจะไม่เกิดฟอง (ศุภยางค์, 2547)

2.1.2.2.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) หยดสาร Kovac's oxidase reagent ลงบนแผ่นกระดาษกรอง นำห่วงถ่ายเชื้อไปแตะเชื้อ แล้วนำเชื้อมาขีดลงบนแผ่นกระดาษกรอง สังเกตผลการทดลอง ผลบวกแบคทีเรียจะสามารถผลิตเอนไซม์ cytochrome oxidase จะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีม่วงหรือ สีน้ำเงินเข้มบนแผ่นกระดาษกรอง ภายใน 10 - 15 นาที ผลลบจะไม่มี การเปลี่ยนสี (ศุภยางค์, 2547)

2.1.2.2.4 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test) นำเข็มเย็บเชื้อไปแตะเชื้อ แล้วนำมาสแตป (Stab) ลงในอาหาร Motility test medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยป้ายเชื้อให้มีความสูงประมาณ 2 ใน 3 ของส่วนสูงอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อ ผลบวกแบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้ จึงเห็นการเจริญของเชื้อออกมาจากรอยป้าย หรือจะมีรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณรอยป้ายแต่อาหารทั้งหมดจะขุ่นกว่าเดิม ผลลบจะไม่เห็นการเจริญของเชื้อภายในหลอดอาหาร (ศุภยางค์, 2547)

2.1.3 การทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*)

2.1.3.1 การเลี้ยงราก่อโรคพืช

ราก่อโรคพืช *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*, *Phytophthora palmivora* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้รับการอนุเคราะห์จาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องจนครบระยะเวลา 7 วัน

2.1.3.2 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคโดยวิธี Dual culture

นำราที่เลี้ยงไว้บนอาหารแข็ง PDA ระยะเวลา 7 วัน มาเจาะด้วย Cork borer และนำไปวางตรงกลางบนอาหาร PDA จานเพาะเชื้อใหม่ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการบ่มนำแบคทีเรียมาขีดบนผิวหน้าอาหาร PDA ทั้งสองข้าง โดยมีระยะห่างจากรา 2 เซนติเมตร โดยขีดเชื้อข้างละไอโซเลต ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ ตรวจสอบวัดการเจริญของรา และการยับยั้ง ทุกวันจนครบ 7 วัน และรายงานผลเป็นโซนการยับยั้งในหน่วยมิลลิเมตร โดยเป็นระยะจากขอบโคโลนีของราถึงขอบโคโลนีของแบคทีเรีย (Ashwini and Srividya, 2013)

2.1.3.3 การเตรียมส่วนใสปราศจากเซลล์ (Culture filtrate)

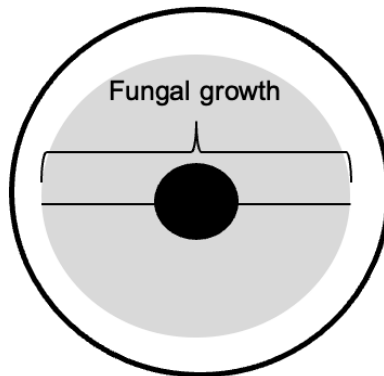
เตรียมหัวเชื้อโดยนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB บ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดการเจริญของเชื้อ

ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 และลงเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 99 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ เป็น เวลา 15 นาที นำส่วนใสมากรองด้วย Syringe membrane filter ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร จะได้ส่วนใสปราศจากเซลล์

2.1.3.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งร่ากอโรคด้วยส่วนใสปราศจากเซลล์

นำส่วนใสปราศจากเซลล์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมในอาหารเหลว PDB ที่มี การ เต็ม 2 เท่าของวุ้น (Agar) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเทลงในจานเพาะเชื้อ ตั้งไว้จนอาหาร แข็ง แล้ววางร่ากอโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *P. palmivora* และ *C. gloeosporioides* ไว้กลางจานเพาะเชื้อ (ภาพที่ 25) โดยทำการทดลอง ทั้งหมด 4 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรที่ 2 (Ashwini and Srividya, 2013) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงบนอาหาร PDA

สูตรที่ 2 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $[1 - (\text{การเจริญของราในชุดทดลอง} / \text{การเจริญของราในชุด ควบคุม})] \times 100$



ภาพที่ 25 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งร่ากอโรคด้วยส่วนใสปราศจากเซลล์

2.1.3.5 การวิเคราะห์ 16s rDNA เพื่อระบุจีโนส สปีชีส์ของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียมา Streak plate ลงบนผิวหน้าอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อได้เป็นโคโลนีเดียวจึงส่งไปวิเคราะห์ที่ สำนักงานพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (BIOTEC)

2.1.3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของร่ากอโรคพืช

2.1.3.6.1 การหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

เตรียมส่วนใสปราศจากเซลล์โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Nutrient Broth (NB), Luria Bertani Broth (LB) และ Tryptic Soy Broth (TSB) สำหรับทดสอบความสามารถในการยับยั้งร่ากอโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ ดังวิธีที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรที่ 2 (Ashwini and Srividya, 2013) เพื่อหาอาหารที่แบคทีเรียสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของร่ากอโรคได้ดีที่สุด โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

2.1.3.6.2 การหาสภาวะกรด-เบส ที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมส่วนใสปราศจากเซลล์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียในชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสม ที่มีค่าความเป็นกรด-เบส ต่าง ๆ ได้แก่ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งร่ากอโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ ดังวิธีที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรที่ 2 (Ashwini and Srividya, 2013) เพื่อหาค่าความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่แบคทีเรียสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของร่ากอโรคได้ดีที่สุด โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

2.1.3.6.3 การหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการบ่มเชื้อ

เตรียมส่วนใสปราศจากเซลล์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียในชนิดของอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-เบส ที่เหมาะสม นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งร่ากอโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ ดังวิธีที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรที่ 2 เพื่อหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการบ่มเชื้อที่แบคทีเรียสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของร่ากอโรคได้ดีที่สุด โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

2.1.3.6.4 การหาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

เตรียมส่วนใสปราศจากเซลล์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียในสภาวะที่เหมาะสม โดยเก็บผลทุก ๆ 3 ชั่วโมง จนครบเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งร่ากอโรค ดังวิธีที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

ตามสูตรที่ 2 (Ashwini and Srividya, 2013) เพื่อหาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่แบคทีเรียสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคที่ดีที่สุด โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

2.1.3.7 การทดสอบความเสถียรของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรีย

2.1.3.7.1 การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบส

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสม แล้วนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสไปปรับค่าความเป็นกรด-เบส ต่าง ๆ ได้แก่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับค่าความเป็นกรดเบสตามที่ค่าเริ่มต้น และนำมากรองด้วย Syringe membrane filter ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร นำส่วนใสปราศจากเซลล์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมในอาหารเหลว PDB ที่มีการเติม 2 เท่าของวุ้น (Agar) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเทลงในจานเพาะเชื้อ ตั้งไว้จนอาหารแข็ง แล้ววางราก่อโรคเพื่อทดสอบความเสถียรของสารควบคุมทางชีวภาพต่อสภาวะกรด-เบสต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

2.1.3.7.2 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในสภาวะที่เหมาะสม แล้วนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 20, 40, 60, 80, 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นตั้งไว้ให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง และนำมากรองด้วย Syringe membrane filter ขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตร นำส่วนใสปราศจากเซลล์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมในอาหารเหลว PDB ที่มีการเติม 2 เท่าของวุ้น (Agar) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเทลงในจานเพาะเชื้อ ตั้งไว้จนอาหารแข็ง แล้ววางราก่อโรคเพื่อทดสอบความเสถียรของสารควบคุมทางชีวภาพต่อสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

2.1.4 การศึกษาเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งราก่อโรคได้ดีที่สุดมาทดสอบดังข้อ 2.1.3.4 โดยนำแบคทีเรียมาทำให้ได้ส่วนใสปราศจากเซลล์ ทดสอบกับราก่อโรคพืช ส่วนการทดลองชุดควบคุมจะเลี้ยงราก่อโรคพืช บนผิวหน้าอาหาร PDA จนครบระยะเวลา 7 วัน และนำตัวอย่างส่งไปวิเคราะห์ที่ สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2.1.5 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคบนพืช (*In vivo*)

2.1.5.1 การเตรียมเมล็ดข้าวโพด

เตรียมเมล็ดข้าวโพดหวานสายพันธุ์ชั้นสวีท-05 ที่ไม่มีการคลุกเมล็ดด้วยยากันรา โดยนำมาฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ เมอร์คิวรีคลอไรด์ เป็นระยะเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำกระดาษทิชชูที่ปราศจากเชื้อมาซับเมล็ดให้แห้ง

2.1.5.2 การเตรียมสารแขวนลอยโคโคนิเดียของราก่อโรค

นำรา *F. solani* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ระยะเวลา 7 วัน เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อที่มีส่วนผสมของ Tween20 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) ขูดเส้นใยของราจนทั่วจานเพาะเชื้อ นำสารแขวนลอยโคโคนิเดียที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น นำสารแขวนลอยโคโคนิเดียมานับด้วย Haemocytometer ให้ได้จำนวน 5×10^4 โคโคนิเดียต่อมิลลิลิตร

2.1.5.3 การเตรียมแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ด้วยวิธีการ Streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จนได้เป็นโคโลนีเดี่ยว นำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงใน NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดการเจริญของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 และลงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 99 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.5.4 การทดสอบการก่อโรคของรา *F. solani* ในข้าวโพด

2.1.5.4.1 การทดสอบในจานเพาะเลี้ยง

นำแบคทีเรียมาทดสอบการยับยั้งต่อการเข้าทำลายของรา *F. solani* ในต้นข้าวโพด ดังนี้ โดยนำเมล็ดที่มีการฟอกฆ่าเชื้อดังข้อ 2.1.5.1 มาแช่ในการทดลองทั้งหมด 8 ชุด โดยระยะเวลาการแช่เมล็ดข้าวโพดกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เซลล์แบคทีเรีย และส่วนใสปราศจากเซลล์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และแช่เมล็ดข้าวโพดกับโคโคนิเดีย ระยะเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ดังนี้

ชุดที่ 1 เมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

ชุดที่ 2 เมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับโคโคนิเดีย

ชุดที่ 3 เมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับเซลล์แบคทีเรีย

- ชุดที่ 4 เมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับส่วนไฮปราศจากเซลล์
- ชุดที่ 5 เมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับโคนิเดีย และเซลล์แบคทีเรีย
- ชุดที่ 6 เมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับโคนิเดีย และส่วนไฮปราศจากเซลล์
- ชุดที่ 7 เมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับเซลล์แบคทีเรีย และโคนิเดีย
- ชุดที่ 8 เมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับส่วนไฮปราศจากเซลล์ และโคนิเดีย

หลังจากการแช่ในแต่ละชุดนำเมล็ดข้าวโพดจำนวน 5 เมล็ด มาปลูกในงานเพาะเชื้อ นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่มีแสงสว่างส่องถึง โดยแต่ละชุดการทดลองทำจำนวน 3 ซ้ำ เก็บผลการทดลองเมื่อต้นข้าวโพดมีระยะเวลา 4 วัน โดยตัดส่วนปลายรากมาย้อมด้วยสี Lactophenol cotton blue และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อดูลักษณะของรากต้นข้าวโพด (Pal et al., 2022)

2.1.5.4.2 การทดสอบในกล่องปลูก

นำแบคทีเรียมาทดสอบการยับยั้งต่อการเข้าทำลายของรา *F. solani* ในต้นข้าวโพด โดยนำเมล็ดที่มีการฟอกฆ่าเชื้อดังข้อ 2.1.5.1 มาแช่ในการทดลองทั้งหมด 8 ชุด ดังข้อ 2.1.5.4.1 หลังจากการแช่ในแต่ละชุดนำเมล็ดข้าวโพดจำนวน 10 เมล็ด มาปลูกในกล่องที่มีขนาดกว้าง 11.5 เซนติเมตร ยาว 17 เซนติเมตร สูง 6.8 เซนติเมตร ที่มีวัสดุเพาะภายในกล่องผสม พีทมอส ต่อเพอร์ไลท์ต่อทราย ในอัตราส่วน 1:2:1 แล้วคลุมกล่องเพาะด้วยถุงใส นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่มีแสงสว่างส่องถึง โดยแต่ละชุดการทดลองทำจำนวน 5 ซ้ำ เก็บผลการทดลองเมื่อต้นข้าวโพดมีระยะเวลา 14 วัน โดยเก็บผลค่าเปอร์เซ็นต์การงอกเมล็ด เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ ชั่งน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นข้าวโพด

เปอร์เซ็นต์การงอกเมล็ด = (จำนวนเมล็ดที่งอกในชุดทดสอบ/จำนวนเมล็ดทั้งหมด) × 100

เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ = (จำนวนต้นที่เกิดโรค/จำนวนต้นทั้งหมด) × 100

2.1.6 การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลที่ได้แต่ละกลุ่มการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16 โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า $P < 0.05$ จะพิจารณาว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

2.2 วัสดุและอุปกรณ์

2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Agar (NA)
2. Nutrient Broth (NB)
3. Potato Dextrose Agar (PDA)
4. Potato Dextrose Broth (PDB)
4. Luria Bertani Broth (LB)
5. Tryptic Soy Broth (TSB)

2.2.2 สารเคมี

1. แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
2. โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์
3. กลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์
4. น้ำกลั่น (Distilled water)
5. 1 โมลาร์ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก
6. 1 นอร์มัล สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.2.3 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิทัล
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator)
3. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
4. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)
5. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot-air sterilizing oven)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
7. กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
8. เครื่องวัด pH (pH meter)
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

2.2.4 อุปกรณ์

1. ปิเปต
2. แห้งแก้ว spreader
3. เข็มเขี่ยเชื้อและห่วงถ่ายเชื้อ (Transfer or Inoculating Needle and Loop)
4. ชุดไฟแช็คและตะเกียงแอลกอฮอล์

5. สำลี และ อะลูมิเนียมฟอยด์
6. ปีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
7. หลอดทดลอง (Test tube)
8. จุกยาง
9. จานเพาะเชื้อ (Plate)
10. ไมโครปิเปต (Micropipette)
11. หลอดไมโครเซนตริฟัลจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
12. หลอดเซนตริฟัลจ์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.2.5 รา

1. *Fusarium solani*
2. *Fusarium moniliforme*
3. *Fusarium proliferatum*
4. *Phytophthora palmivora*
5. *Colletotrichum gloeosporioides*

2.3 สถานที่ทำวิจัย

ห้องโครงการวิจัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

บทที่ 3 ผลการทดลอง

3.1 การคัดแยกแบคทีเรีย การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณป่าชายเลนทั้ง 6 แหล่ง พบว่าสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 98 ไอโซเลต โดยคัดแยกจากดินจากป่าชายเลนแหลมตะลุมพุก จังหวัดนครศรีธรรมราช ได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต ดินจากป่าชายเลนศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนและป่าชายฝั่ง อำเภอนจอม จังหวัดนครศรีธรรมราช ทั้งหมด 27 ไอโซเลต ดินจากป่าชายเลน อำเภอลิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช ได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต ดินจากป่าชายเลนท่าทอง จังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลต ดินจากป่าชายเลนบางโป้ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลต และดินจากป่าชายเลนลีเล็ด จังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้ทั้งหมด 34 ไอโซเลต ผลการทดลองที่หนึ่งที่ได้รับความร้อน นำตัวอย่างดินแต่ละบริเวณมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส ที่ส่วนใหญ่สามารถทนต่อความร้อนได้ โดยอาศัยการสร้างเอนโดสปอร์ โดยคัดแยกจากดินจากป่าชายเลนแหลมตะลุมพุก จังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่ามี 2 ไอโซเลต ได้แก่ LMSH01 และ LMSH02 ดินจากป่าชายเลนศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนและป่าชายฝั่ง อำเภอนจอม จังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่ามี 15 ไอโซเลต ได้แก่ VIMSH01, VIMSH02, VIMSH03, VIMSH04, VIMSH05, VIMSH06, VIMSH07, VIMSH08, VIMSH09, VIMSH10, VIMSH11, VIMSH12, VIMSH13, VIMSH14 และ VIMSH15 ดินจากป่าชายเลน อำเภอลิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่ามี 5 ไอโซเลต ได้แก่ SIMSH01, SIMSH02, SIMSH03, SIMSH04 และ SIMSH05 ดินจากป่าชายเลนท่าทอง จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบว่ามี 11 ไอโซเลต ได้แก่ TMSH19, TMSH20, TMSH21, TMSH22, TMSH23, TMSH24, TMSH25, TMSH26, TMSH27, TMSH28 และ TMSH29 ดินจากป่าชายเลนบางโป้ จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบว่ามี 6 ไอโซเลต ได้แก่ BMSH06, BMSH07, BMSH08, BMSH09, BMSH10 และ BMSH11 และดินจากป่าชายเลนลีเล็ด จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบว่ามี 19 ไอโซเลต ได้แก่ LEMSH01, LEMSH02, LEMSH03, LEMSH04, LEMSH05, LEMSH06, LEMSH07, LEMSH08, LEMSH09, LEMSH10, LEMSH11, LEMSH12, LEMSH13, LEMSH14, LEMSH15, LEMSH16, LEMSH17, LEMSH18 และ LEMSH19

ผลของชุดการทดลองที่สอง ซึ่งไม่ได้รับความร้อน โดยคัดแยกจากดินจากป่าชายเลนแหลมตะลุมพุก จังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่ามี 3 ไอโซเลต ได้แก่ LMST03, LMST04 และ LMST05 ดินจากป่าชายเลนศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนและป่าชายฝั่ง อำเภอนจอม จังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่ามี 12 ไอโซเลต ได้แก่ VIMST16, VIMST17, VIMST18, VIMST19,

VIMST20, VIMST21, VIMST22, VIMST23, VIMST24, VIMST25, VIMST26 และ VIMST27 ดินจากป่าชายเลน อำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่ามี 3 ไอโซเลต ได้แก่ SIMST06, SIMST07 และ SIMST08 จากดินบริเวณป่าชายเลนท่าทองไม่พบไอโซเลตเนื่องจากแบคทีเรียที่เจริญมีจำนวนน้อย และมีลักษณะโคโลนีคล้ายกับที่ได้รับความร้อน ดินจากป่าชายเลนบางใบไม้ จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบว่ามี 6 ไอโซเลต ได้แก่ BMST12, BMST13, BMST14, BMST15, BMST16, BMST17 และ BMST18 และดินจากป่าชายเลนลีเล็ด จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบว่ามี 15 ไอโซเลต ได้แก่ LEMST20, LEMST21, LEMST22, LEMST23, LEMST24, LEMST25, LEMST26, LEMST27, LEMST28, LEMST29, LEMST30, LEMST31, LEMST32, LEMST33 และ LEMST34

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 98 ไอโซเลตมาแยกแอมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ผลดังแสดงในตารางภาคผนวก ค1 พบว่ามีเพียง 36 ไอโซเลตที่ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่ง ได้แก่ LMSH01, LMSH02, LMST03, LMST04, VIMSH02, VIMSH03, VIMSH06, VIMSH11, VIMSH13, SIMSH05, TMSH20, TMSH22, TMSH23, TMSH24, TMSH25, TMSH26, TMSH28, TMSH29, BMSH06, BMSH07, BMSH08, BMSH09, BMSH10, BMST13, BMST14, BMST16, BMST17, BMST18, LEMSH01, LEMSH05, LEMSH07, LEMSH10, LEMSH14, LEMSH18, LEMST20 และ LEMST28 ดังแสดงใน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่งที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

สถานที่	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
		การยกตัว	ขอบ	สี		
Leam Talumphuk	LMSH01	Convex	Wooly	White	+	Bacilli
	LMSH02	Raised	Smooth (Entire)	White	+	Bacilli
	LMST03	Convex	Wooly	White	+	Bacilli
	LMST04	Raised	Smooth (Entire)	White	+	Bacilli
Khanom	VIMSH02	Raised	Smooth (Entire)	White	+	Rod
	VIMSH03	Raised	Wooly	White	+	Rod

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ + หมายถึง แบคทีเรียย้อมติดสีแกรมบวก

ตารางที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่งที่คัดแยกได้จากดิน
ป่าชายเลน

สถานที่	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี			การติด สีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา
		การยกตัว	ขอบ	สี		
Khanom	VIMSH06	Raised	Smooth (Entire)	White	+	Rod
	VIMSH11	Convex	Undulate (Wavy)	White	+	Rod
	VIMSH13	Flat	Wooly	White	+	Rod
Sichon	SIMSH05	Flat	Smooth (Entire)	Cream	+	Rod
Tha Thong	TMSH20	Flat	Wooly	Cream	+	Rod
	TMSH22	Effuse	Smooth (Entire)	Cream	+	Rod
	TMSH23	Raised	Undulate (Wavy)	White	+	Rod
	TMSH24	Flat	Undulate (Wavy)	White	+	Rod
	TMSH25	Flat	Smooth (Entire)	White	+	Rod
	TMSH26	Raised	Wooly	Cream	+	Rod
	TMSH28	Effuse	Smooth (Entire)	Cream	+	Bacilli
	TMSH29	Flat	Smooth (Entire)	Cream	+	Rod
Bang Bai	BMSH06	Umbonate	Undulate (Wavy)	White	+	Rod
Mai	BMSH07	Raised	Smooth (Entire)	Cream	+	Rod

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ + หมายถึง แบคทีเรียย้อมติดสีแกรมบวก

ตารางที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่งที่คัดแยกได้จากดิน
ป่าชายเลน

สถานที่	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี			การติด สีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา
		การยกตัว	ขอบ	สี		
Bang Bai Mai	BMSH08	Umbonate	Undulate (Wavy)	White	+	Bacilli
	BMSH09	Flat	Wooly	White	+	Rod
	BMSH10	Raised	Smooth (Entire)	White	+	Rod
	BMST13	Umbonate	Undulate (Wavy)	Cream	+	Rod
	BMST14	Raised	Wooly	Cream	+	Rod
	BMST16	Raised	Undulate (Wavy)	White	+	Rod
	BMST17	Flat	Wooly	White	+	Rod
	BMST18	Flat	Wooly	White	+	Bacilli
Lilet	LEMSH01	Raised	Smooth	Cream	+	Rod
	LEMSH05	Raised	Undulate (Wavy)	Cream	+	Rod
	LEMSH07	Flat	Smooth (Entire)	Cream	+	Rod
	LEMSH10	Flat	Wavy	White	+	Rod
	LEMSH14	Raised	Undulate (Wavy)	Cream	+	Rod
	LEMSH18	Effuse	Smooth (Entire)	White	+	Rod
	LEMST20	Effuse	Smooth (Entire)	Cream	+	Rod
	LEMST28	Raised	Smooth (Entire)	Yellow	+	Rod

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ + หมายถึง แบคทีเรียย้อมติดสีแกรมบวก

นำแบบที่เรียห้ทั้ง 36 ไอโซเลต มาทดสอบทางชีวเคมีได้แก่ การทดสอบการสร้างเอนไซม์อะตาเลส การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิดีส การทดสอบการย่อยแป้ง และการทดสอบการเคลื่อนที่ พบว่ามีเพียง 18 ไอโซเลตที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีคล้ายกับแบบที่เรียห้กลุ่มบาซิลลัส (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การทดสอบทางชีวเคมีของแบบที่เรียห้กลุ่มบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

ไอโซเลต	การทดสอบทางชีวเคมี			
	อะตาเลส	ออกซิดีส	การย่อยแป้ง	การเคลื่อนที่
LMSH01	+	-	+	+
LMST03	+	-	+	+
LMST04	+	-	+	+
BMSH06	+	-	+	+
BMST14	+	-	+	+
BMST17	+	-	+	+
BMST18	+	-	+	+
TMSH23	+	-	+	+
TMSH28	+	-	+	+
LEMSH01	+	-	+	+
LEMSH05	+	-	+	+
LEMSH10	+	-	+	+
LEMSH14	+	-	+	+
SIMSH05	+	-	+	+
VIMS02	+	-	+	+
VIMS03	+	-	+	+
VIMS06	+	-	+	+
VIMS13	+	-	+	+

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ + หมายถึง ผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นบวก

สัญลักษณ์ - หมายถึง ผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นลบ

ผลทดสอบทางชีวเคมีของแบบที่เรียห้กลุ่มบาซิลลัส คือ อะตาเลส การเคลื่อนที่ และการย่อยแป้ง ให้ผลเป็นบวก ส่วนการทดสอบออกซิดีส ให้ผลเป็นลบ

จากการทดสอบพบว่า มีแบคทีเรียเพียง 18 ไอโซเลต ได้แก่ LMSH01, LMST03, LMST04, BMSH06, BMST14, BMST17, BMST18, TMSH23, TMSH28, LEMSH01, LEMSH05, LEMSH10, LEMSH14, SIMSH05, VIMS02, VIMS03, VIMS06 และ VIMS13 ที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ การสร้างเอนไซม์อะไมเลส การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส การย่อยแป้ง และการเคลื่อนที่ ที่ตรงกับทดสอบแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส

นำทั้ง 18 ไอโซเลตไปทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคโดยวิธี Dual culture โดยใช้ราก่อโรคทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*, *Collectotrichum gloeosporioides* และ *Phytophthora palmivora*

3.2 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคโดยวิธี Dual culture

นำแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคโดยวิธี dual culture กับราก่อโรค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *C. gloeosporioides* และ *P. palmivora* พบว่ามีเพียงแบคทีเรีย 6 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ (ตารางภาคผนวก ค2) ได้แก่ VIMSH02, VIMSH03, VIMSH06, VIMSH13, LMSH01 และ TMSH10 ซึ่ง VIMSH06 ไอโซเลตเดียว ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ โดยมีบริเวณยับยั้ง *P. palmivora* ได้ดีที่สุดถึง 7.67 ± 2.08 มิลลิเมตร ไอโซเลต VIMSH02 และ VIMSH03 มีบริเวณยับยั้ง *P. palmivora* ได้เท่ากับ 4.67 ± 0.58 และ 4.33 ± 0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ ไอโซเลต VIMSH06, LMSH01, VIMSH13 และ TMSH10 มีบริเวณยับยั้ง *F. proliferatum* ได้เท่ากับ 7.0 ± 0.00 , 4.0 ± 0.08 , 1.8 ± 1.50 และ 1.0 ± 0.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ ไอโซเลต VIMSH06, LMSH01 และ TMSH10 มีบริเวณยับยั้ง *F. moniliforme* ได้เท่ากับ 4.0 ± 1.00 , 2.0 ± 0.22 และ 1.0 ± 0.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ ไอโซเลต VIMSH06, LMSH01 และ TMSH10 มีบริเวณยับยั้ง *F. solani* ได้เท่ากับ 3.0 ± 0.00 , 1.0 ± 0.06 และ 1.0 ± 0.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ และไอโซเลต VIMSH06 มีบริเวณยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้เท่ากับ 5.0 ± 0.00 มิลลิเมตร และ VIMSH02, VIMSH03, VIMSH13, LMSH01 และ TMSH10 ไม่สามารถยับยั้งราก่อโรคได้ ซึ่งการทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคโดยวิธี dual culture พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงใน (ตารางที่ 5) ดังนั้นจึงนำทั้ง 6 ไอโซเลตไปทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคด้วย culture filtrate การทดลองถัดไป

ตารางที่ 5 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยวิธี Dual culture

ไอโซเลต	โซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
VIMSH02	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	4.67±0.58 ^b	0.0±0.00
VIMSH03	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	4.33±0.58 ^b	0.0±0.00
VIMSH06	7.0±0.00 ^a	4.0±1.00 ^a	3.0±0.00 ^a	7.67±2.08 ^a	5.0±0.00 ^a
VIMSH13	1.8±1.50 ^c	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
LMSH01	4.0 ± 0.08 ^b	2.0 ± 0.22 ^b	1.0 ± 0.06 ^b	0.0±0.00	0.0±0.00
TMSH10	1.0 ± 0.10 ^c	1.0 ± 0.05 ^c	1.0 ± 0.05 ^b	0.0±0.00	0.0±0.00

หมายเหตุ : ตัวอักษร abcdef ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm \text{Standard Error}$

3.3 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคด้วยส่วนใสปราศจากเซลล์ (Culture filtrate)

จากการทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคด้วย culture filtrate ของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH02, VIMSH03, VIMSH06, VIMSH13, LMSH01 และ TMSH10 กับการยับยั้งราก่อโรคพืชทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *C. gloeosporioides* และ *P. palmivora* พบว่าไอโซเลต VIMSH06 สามารถยับยั้งการเจริญของรา *F. solani* ได้ดีที่สุดถึง 71.62±2.21 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต LMSH01, TMSH10, VIMSH03, VIMSH02 และ VIMSH13 สามารถยับยั้งการเจริญของรา *F. solani* ได้เท่ากับ 63.69±1.15, 52.70±0.14, 28.04±0.68, 11.82±1.29 และ 4.01±0.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไอโซเลต LMSH01, VIMSH06, TMSH10, VIMSH03 และ VIMSH02 สามารถยับยั้งการเจริญของรา *F. proliferatum* ได้เท่ากับ 54.38±0.17, 44.29±0.14, 44.14±0.38, 22.50±0.71 และ 5.36±0.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ VIMSH13 ไม่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ ไอโซเลต TMSH10, LMSH01, VIMSH06, VIMSH02 และ VIMSH03 สามารถยับยั้งการเจริญของรา *F. moniliforme* ได้เท่ากับ 68.14±0.28, 66.97±0.29, 58.97±2.07, 15.17±0.80 และ 4.48±0.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ VIMSH13 ไม่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ ไอโซเลต VIMSH03, LMSH01, VIMSH02, VIMSH13, และ TMSH10 สามารถยับยั้งการเจริญของรา *P. palmivora* ได้เท่ากับ 34.57±2.14, 30.06±1.72, 28.24±1.77, 23.21±0.39 และ 21.48±0.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ VIMSH06 ไม่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ ไอโซเลต VIMSH06, TMSH10, VIMSH02, VIMSH03 และ VIMSH13 สามารถยับยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* ได้เท่ากับ 13.51±1.92, 10.86±0.90, 10.47±0.68,

8.78±3.22 และ 2.43±0.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ LMSH01 ไม่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ ซึ่งการทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคด้วยส่วนใสปราศจากเซลล์ พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตสามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 6) ดังนั้นจึงนำไอโซเลต VIMSH06 ไปศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชถัดไป

ตารางที่ 6 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วย Culture filtrate

ไอโซเลต	การยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)				
	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
VIMSH02	5.36±0.71 ^d	15.17±0.80 ^c	11.82±1.29 ^e	28.24±1.77 ^b	10.47±0.68 ^b
VIMSH03	22.50±0.71 ^c	4.48±0.69 ^d	28.04±0.68 ^d	34.57±2.14 ^a	8.78±3.22 ^b
VIMSH06	44.29±0.14 ^b	58.97±2.07 ^b	71.62±2.21 ^a	0.00±0.00 ^d	13.51±1.92 ^a
VIMSH13	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^e	4.01±0.47 ^f	23.21±0.39 ^c	2.43±0.41 ^c
LMSH01	54.38±0.17 ^a	66.97±0.29 ^a	63.69±1.15 ^b	30.06±1.72 ^b	0.00±0.00 ^c
TMSH10	44.14±0.38 ^b	68.14±0.28 ^a	52.70±0.14 ^c	21.48±0.85 ^c	10.86±0.90 ^{ab}

หมายเหตุ : ตัวอักษร abcdef ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm \text{Standard Error}$

3.4 การวิเคราะห์ 16s rDNA เพื่อระบุจีโนส สปีชีส์ ของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียส่งไปวิเคราะห์ที่ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (BIOTEC) เมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่า VIMSH06 มีความเหมือนกับหลายสปีชีส์ในสกุล *Bacillus* ที่ 99.93% ตารางภาคผนวก ค3

3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช

3.5.1 การหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

จากการทดสอบหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 กับการยับยั้งราทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า VIMSH06 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB สามารถยับยั้งการเจริญของรา *F. solani* ได้ดีที่สุดเท่ากับ 67.81 ± 0.41 เปอร์เซ็นต์ และในอาหาร NB, LB และ TSB ให้ค่าการยับยั้งรา *F. proliferatum*, *F. moniliforme*, *P. palmivora* และ *C. gloeosporioides* ได้น้อยกว่า โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การหาความเหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06

สภาวะ	การยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)				
	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
NB	36.27 ± 0.90^a	50.57 ± 0.31^b	67.81 ± 0.41^a	0.00 ± 1.01^c	23.47 ± 0.55^b
LB	29.45 ± 0.54^b	55.27 ± 0.41^a	59.60 ± 0.48^b	31.45 ± 0.90^a	37.40 ± 0.41^a
TSB	20.63 ± 1.28^c	28.00 ± 0.83^c	17.53 ± 0.32^c	29.50 ± 0.74^b	24.61 ± 1.27^b

หมายเหตุ : ตัวอักษร abc ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm \text{Standard Error}$

3.5.2 การหาสภาวะกรด-เบส ที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดสอบหาสภาวะกรด-เบส ที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารในการยับยั้งราทั้ง 5 สายพันธุ์ ของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 พบว่าอาหารเหลว NB ที่สภาวะ pH 7 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของรา *F. solani* ได้ดีที่สุด 76.81 ± 0.56 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับที่สภาวะกรด-เบส อื่น ๆ จะให้ค่าการยับยั้งที่น้อยกว่า จากผลการยับยั้งรา *F. moniliforme*, *F. solani*, *P. palmivora* และ *C. gloeosporioides* พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 ที่เลี้ยงในอาหาร NB สภาวะความเป็นกรด-เบส ต่าง ๆ ให้ค่าการยับยั้งราก่อโรค ที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อพิจารณาการยับยั้งรา *F. proliferatum* พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 ที่เลี้ยงในอาหาร NB สภาวะ pH 6 และ pH 7 มีค่าเท่ากับ 36.79 ± 0.77 และ 35.62 ± 0.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การหาความเหมาะสมของความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการสร้างสารใน การยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06

สภาวะ	การยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)				
	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
pH 4	3.58±0.66 ^d	9.91±0.42 ^e	1.19±0.48 ^e	58.80±0.27 ^a	7.27±0.63 ^f
pH 5	9.54±1.13 ^c	26.42±0.70 ^d	6.61±2.46 ^d	41.03±0.37 ^b	9.04±0.45 ^e
pH 6	36.79±0.77 ^a	33.79±0.52 ^c	62.02±0.55 ^b	22.72±0.53 ^c	18.21±0.19 ^d
pH 7	35.62±0.44 ^a	50.99±0.38 ^a	76.81±0.56 ^a	19.44±0.72 ^d	24.33±0.50 ^c
pH 8	32.41±0.64 ^b	38.30±0.47 ^b	56.68±0.28 ^c	8.47±0.55 ^e	37.07±0.42 ^b
pH 9	0.00±0.51 ^e	10.61±0.51 ^e	1.44±0.28 ^e	0.00±0.52 ^f	40.84±0.61 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษร abcdef ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความ เชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm \text{Standard Error}$

3.5.3 การหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการบ่มเชื้อ

จากการทดสอบสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการบ่มเชื้อ ต่อการสร้างสารในการ ยับยั้งราทั้ง 5 สายพันธุ์ ของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 พบว่าอาหารเหลว NB ที่สภาวะ pH 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *F. solani* ได้ดีที่สุด 73.00±0.20 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับที่สภาวะอุณหภูมิ อื่น ๆ จะให้ค่าการยับยั้งที่น้อยกว่า และจากผลการยับยั้งรา *F. proliferatum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *P. palmivora* และ *C. gloeosporioides* พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 ที่เลี้ยงแต่ละอุณหภูมิให้ค่าการยับยั้งราก่อโรคพืชที่มีความแตกต่างกัน ทางสถิติ (P<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 9

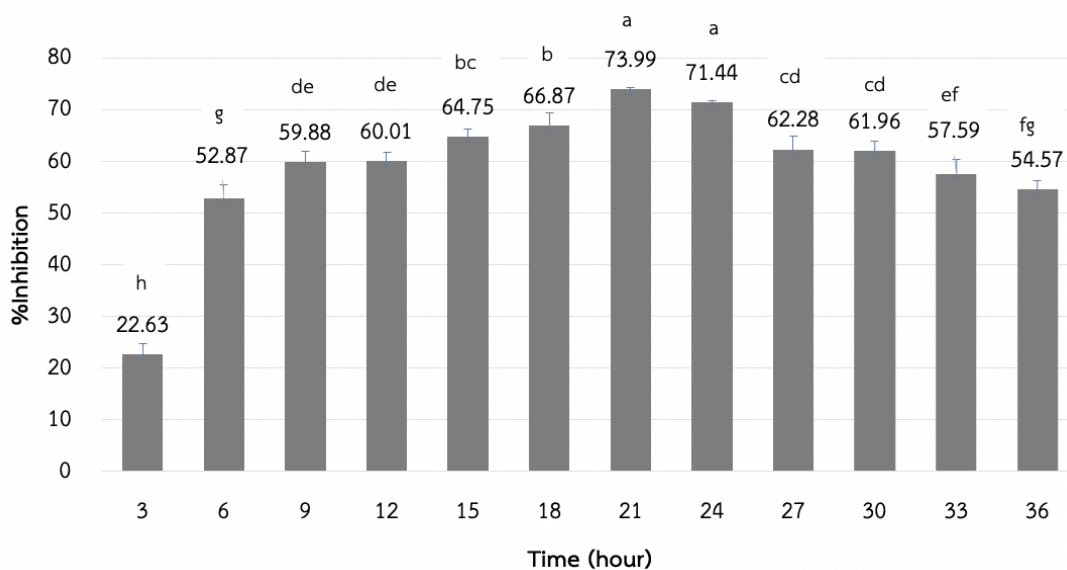
ตารางที่ 9 การหาความเหมาะสมที่อุณหภูมิต่าง ๆ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของ แบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06

สภาวะ	การยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)				
	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
30°C	51.46±0.45 ^b	50.33±0.19 ^c	66.89±0.48 ^c	29.43±0.31 ^a	58.40±0.40 ^a
37°C	45.32±0.28 ^c	51.68±0.19 ^b	73.00±0.20 ^a	12.05±0.27 ^b	23.84±0.48 ^c
40°C	61.63±0.42 ^a	67.26±0.26 ^a	69.83±0.24 ^b	0.00±0.53 ^c	54.53±0.35 ^b

หมายเหตุ : ตัวอักษร ^{abc} ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P < 0.05$) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm$ Standard Error

3.5.4 การหาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

จากการทดสอบหาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารในการยับยั้ง *F. solani* ของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 พบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่สภาวะ pH 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 21 ชั่วโมง สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *F. solani* ได้ดีที่สุดที่ 73.99 ± 0.42 เปอร์เซนต์ และสำหรับที่สภาวะอุณหภูมิอื่น ๆ จะให้ค่าการยับยั้งที่น้อยกว่า ดังแสดงในภาพที่ 29 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าชั่วโมงที่ 21 และ 24 ให้ผลการยับยั้งที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่ชั่วโมงที่ 21 จะใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่า ดังนั้นเมื่อประเมินความคุ้มค่าจึงได้เลือกชั่วโมงดังกล่าวนำไปใช้ในการทดลองถัดไป



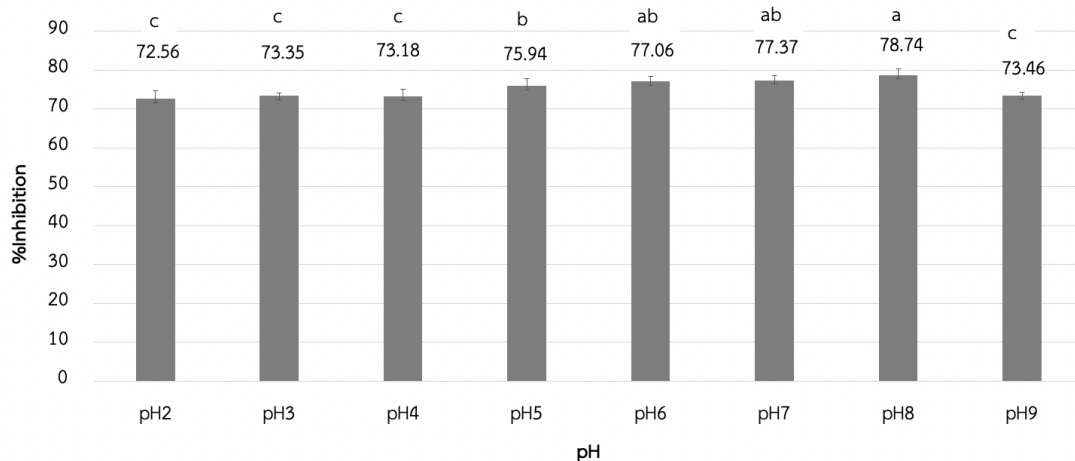
ภาพที่ 26 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของแบคทีเรีย สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06

หมายเหตุ : ตัวอักษร ^{abcdefgh} ที่แตกต่างกันในแท่งกราฟแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P < 0.05$) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm$ Standard Error

3.6 การทดสอบความเสถียรของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรีย

3.6.1 การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบส

จากการทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบส ของน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม มายับยั้งรา *F. solani* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียสามารถทนต่อสภาวะค่าความเป็นกรด-เบส ต่าง ๆ โดยยังมีศักยภาพในการยับยั้งได้ที่ pH2, pH3, pH4, pH5, pH6, pH7, pH8 และ pH9 มีค่าเท่ากับ 72.56 ± 2.06 , 73.35 ± 0.67 , 73.18 ± 1.92 , 75.94 ± 1.78 , 77.06 ± 1.32 , 77.37 ± 1.25 , 78.74 ± 1.65 และ 73.46 ± 0.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงใน (ภาพที่ 30)

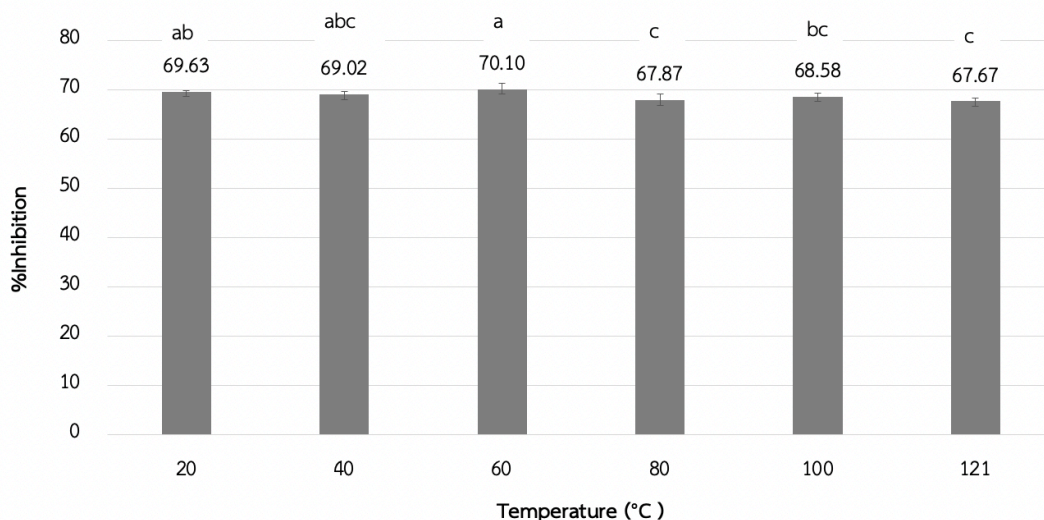


ภาพที่ 27 การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบส ของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06

หมายเหตุ : ตัวอักษร abc ที่แตกต่างกันในแท่งกราฟแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm \text{Standard Error}$

3.6.2 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ

จากการทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิของน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม มายับยั้งรา *F. solani* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียสามารถทนต่ออุณหภูมิ ต่าง ๆ ได้ โดยยังมีศักยภาพในการยับยั้งได้ที่อุณหภูมิ 20, 40, 60, 80, 100 และ 121 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 69.63 ± 0.17 , 69.02 ± 0.67 , 70.10 ± 1.22 , 67.87 ± 1.22 , 68.58 ± 0.74 และ 67.67 ± 0.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงในภาพที่ 31

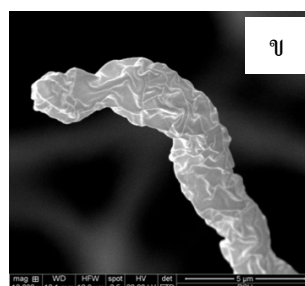
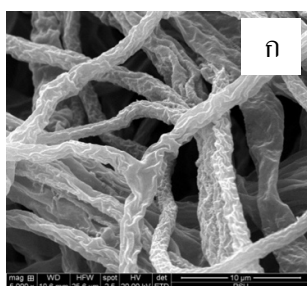


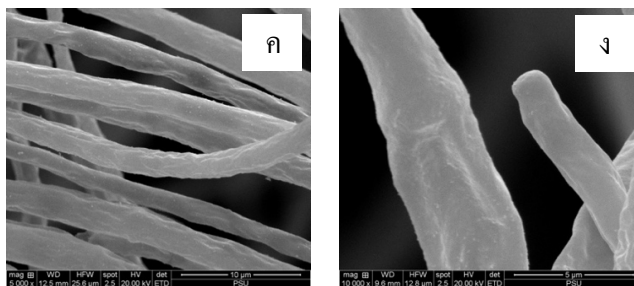
ภาพที่ 28 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ ของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06

หมายเหตุ : ตัวอักษร ^{abc} ที่แตกต่างกันในแท่งกราฟแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm \text{Standard Error}$

3.7 การศึกษาเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำเส้นใยรา *F. solani* จากการทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคด้วยส่วนไฮปราศจากเซลล์ และชุดควบคุม ดูตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าชุดทดสอบที่มีส่วนไฮปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 ทำให้ลักษณะเส้นใยราผิดปกติ เห็นแวบลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยชุดควบคุมกำลังขยาย 5,000 เท่า จะสังเกตเห็นผิวเส้นใยราเรียบปกติ (ภาพที่ 32ค) กำลังขยาย 10,000 เท่า จะพบว่าปลายเส้นใยปกติ ไม่มีการแพบตัว (ภาพที่ 32ง) ชุดทดสอบกำลังขยาย 5,000 เท่า พบการผิดปกติของเส้นใยราอย่างรุนแรง ได้แก่พับ ยับ เหี่ยว ผนัง เส้นใยฉีกขาด (ภาพที่ 32ก) กำลังขยาย 10,000 เท่า พบปลายเส้นใยยับ แพนอย่างรุนแรง (ภาพที่ 32ข)






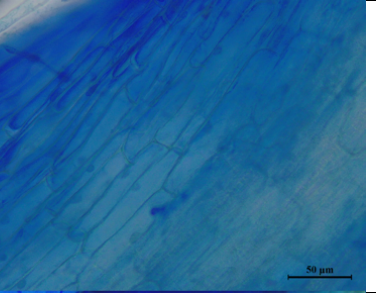

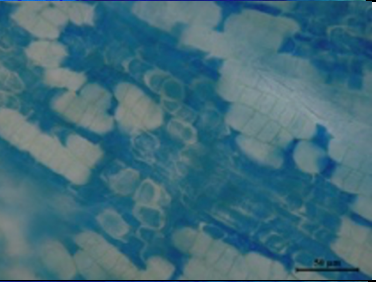

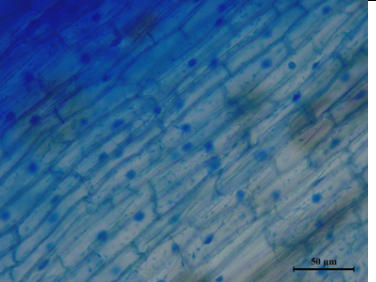

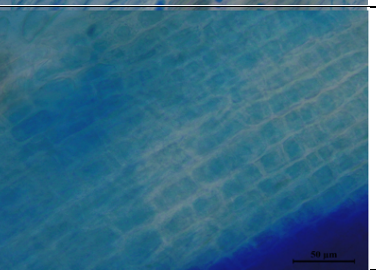
ภาพที่ 29 ลักษณะของเส้นใยรา *F. solani* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จากชุดทดสอบ (ก และ ข) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (ก และ ค) และ 10,000 เท่า (ข และ ง) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ค และ ง)

3.8 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคบนพืช (*In vivo*)

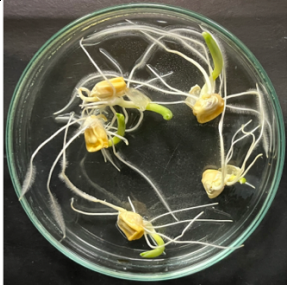
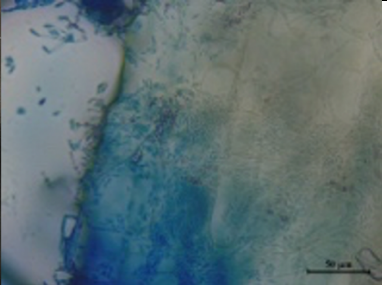

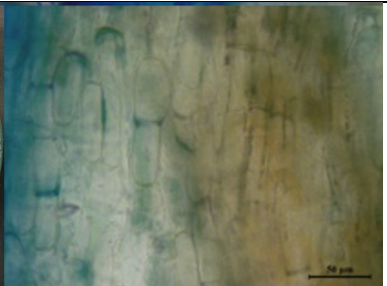

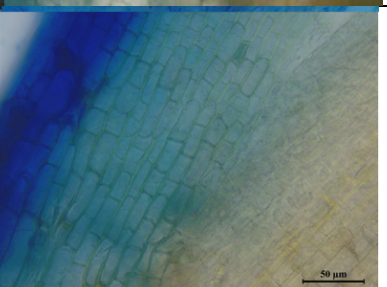

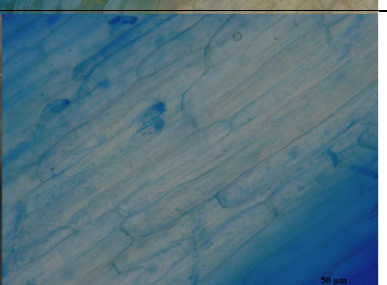
3.8.1 การทดสอบในจานเพาะเลี้ยง

จากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคบนพืชในจานเพาะเลี้ยง โดยนำเมล็ดข้าวโพด มาแช่ในการทดลองทั้งหมด 8 ชุด พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ชุดที่ 3 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับเซลล์แบคทีเรีย ชุดที่ 4 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับส่วนใสปราศจากเซลล์แบคทีเรีย ชุดที่ 7 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับเซลล์แบคทีเรียและโคนิเดีย และชุดที่ 8 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับส่วนใสปราศจากเซลล์แบคทีเรีย และสารแขวนลอยโคนิเดีย ของ *F. solani* ไม่พบราก่อโรคในเซลล์รากของต้นข้าวโพด แต่ชุดที่ 2 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับโคนิเดียชุดที่ 5 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับโคนิเดียและเซลล์แบคทีเรียและ ชุดที่ 6 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับโคนิเดียและส่วนใสปราศจากเซลล์แบคทีเรีย พบราก่อโรค โดยมีโคนิเดีย และเส้นใยรา เจริญอยู่ภายในเซลล์รากของต้นข้าวโพดอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่า เซลล์แบคทีเรียและส่วนใสปราศจากเซลล์แบคทีเรีย มีศักยภาพในการป้องกันรากพืช ก่อนการเข้าทำลายของราก่อโรค ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 10 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคบนเมล็ดข้าวโพดในจานเพาะเลี้ยง

ชุดการทดลอง	ภาพการทดลอง	
ชุดที่ 1 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ		
ชุดที่ 2 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับ โคโคนินเดี่ยว		
ชุดที่ 3 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับ แบคทีเรีย		
ชุดที่ 4 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับ ส่วนใสปราศจากเซลล์แบคทีเรีย		

ตารางที่ 10 (ต่อ) การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคบนเมล็ดข้าวโพดในจานเพาะเลี้ยง

ชุดการทดลอง	ภาพการทดลอง	
ชุดที่ 5 เมล็ดข้าวโพด แชร์ร่วมกับโคนินเดียและ แบคทีเรีย		
ชุดที่ 6 เมล็ดข้าวโพด แชร์ร่วมกับโคนินเดีย และส่วนใสปราศจากเซลล์ แบคทีเรีย		
ชุดที่ 7 เมล็ดข้าวโพด แชร์ร่วมกับแบคทีเรีย และโคนินเดีย		
ชุดที่ 8 เมล็ดข้าวโพด แชร์ร่วมกับส่วนใสปราศจาก เซลล์แบคทีเรีย และโคนินเดีย		

3.8.2 การทดสอบในกล่องปลูก

จากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคพืชในกล่องปลูก โดยนำเมล็ดข้าวโพด มาแช่ในการทดลองทั้งหมด 8 ชุด มาปลูกในกล่องที่มีวัสดุผสมปลูก พบว่าหลังจากการปลูกนำมาวัดความยาวต้น ความยาวราก และชั่งน้ำหนักสดต้น ชุดการทดลองที่ 4 เมล็ดข้าวโพด แชร์ร่วมกับส่วนใสปราศจากเซลล์แบคทีเรีย จะให้ค่ามากที่สุด เท่ากับ 30.11 ± 3.74 , 21.17 ± 1.09 เซนติเมตร และ 4.0849 ± 0.8280 กรัม ตามลำดับ เมื่อชั่งน้ำหนักสดราก พบว่า ชุดการทดลองที่ 6

เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับโคนิเดียและส่วนใสปราศจากเซลล์ จะให้ค่าน้ำหนักสดรากมากที่สุด เท่ากับ 0.7672 ± 0.4100 กรัม เมื่อชั่งน้ำหนักแห้งต้น พบว่าชุดการทดลองที่ 4 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับส่วนใสปราศจากเซลล์ จะให้ค่าน้ำหนักแห้งต้นมากที่สุด เท่ากับ 0.4552 ± 0.0684 กรัม และเมื่อชั่งน้ำหนักแห้งราก พบว่าชุดการทดลองที่ 3 เมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับเซลล์แบคทีเรียจะให้ค่าน้ำหนักแห้งรากมากที่สุด เท่ากับ 0.1574 ± 0.0120 กรัม (ตารางที่ 9)

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวโพด (ภาพที่ 33) พบว่าชุดการทดลองที่เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับแบคทีเรียเพียงอย่างเดียวจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ใกล้เคียงกับ เมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวโพดประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และเมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับโคนิเดีย จะทำให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงเหลือ 52 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับน้ำกลั่น และเมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับแบคทีเรีย

ชุดทดสอบเพื่อป้องกันการติดเชื้อของต้นกล้าข้าวโพด พบว่าเมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับแบคทีเรีย ก่อนโคนิเดียจะมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ และชุดทดสอบเพื่อยับยั้งการติดเชื้อเมล็ดข้าวโพดแช่ร่วมกับโคนิเดียก่อนแบคทีเรีย จะมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ 32 ถึง 43 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาการติดเชื้อของต้นกล้าข้าวโพด พบว่าชุดการป้องกันการติดเชื้อของเมล็ดข้าวโพด จะมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อที่น้อยกว่าชุดการยับยั้งการติดเชื้อของเมล็ดข้าวโพด เมื่อเทียบกับการแช่เมล็ดข้าวโพดกับโคนิเดียเพียงอย่างเดียว

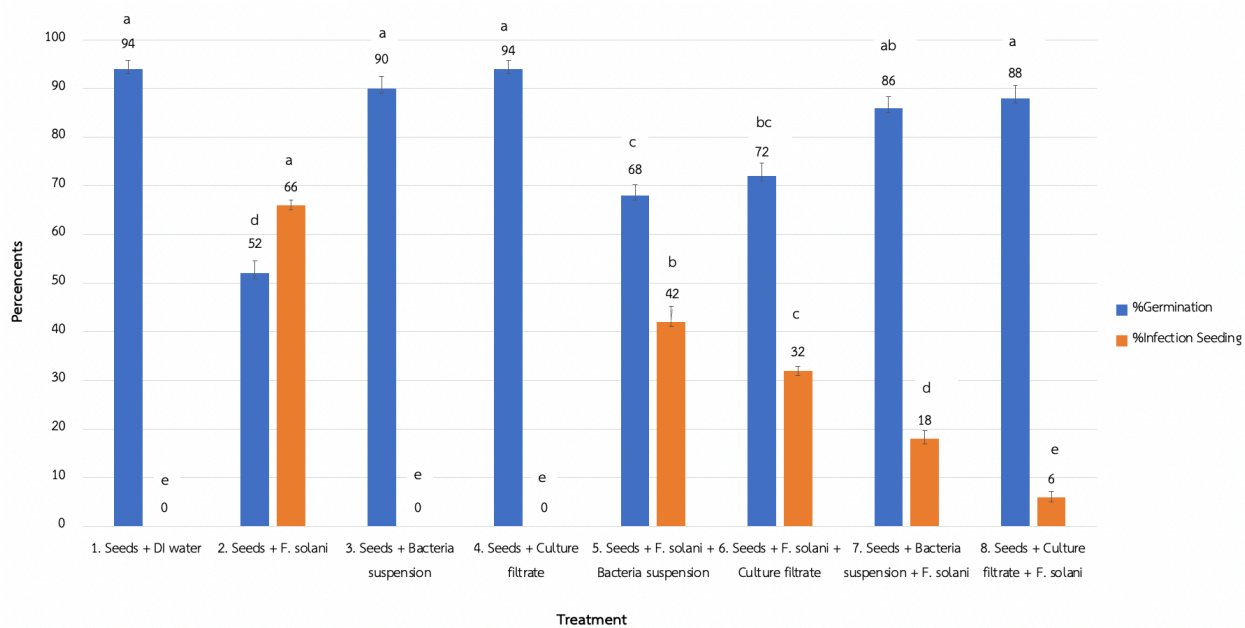
ดังนั้นการแช่เมล็ดข้าวโพดกับแบคทีเรียก่อนโคนิเดียจะช่วยป้องกันเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราก่อโรคก่อนการปลูกได้

ตารางที่ 11 การวัดการเจริญของต้นกล้าข้าวโพดในชุดการทดลองต่าง ๆ

ชุดที่	การทดสอบ	ความยาวต้น (cm.plant ⁻¹)	ความยาวราก (cm.plant ⁻¹)	น้ำหนักสด (g.plant ⁻¹)		น้ำหนักแห้ง (g.plant ⁻¹)	
				ต้น	ราก	ต้น	ราก
1	Seeds + DI water	25.58±1.31 ^c	18.16±1.47 ^b	2.6114±0.5823 ^{bc}	0.4519±0.2958 ^{bc}	0.3978±0.0434 ^a	0.1469±0.0328 ^{ab}
2	Seeds + <i>F. solani</i>	28.27±1.26 ^{ab}	20.81±3.02 ^a	1.7009±0.4591 ^c	0.2287±0.0591 ^c	0.2373±0.0552 ^b	0.0964±0.0246 ^c
3	Seeds + Bacteria suspension	25.07±3.81 ^{cd}	17.63±1.49 ^c	2.7405±1.0469 ^{bc}	0.3816±0.1665 ^{bc}	0.3976±0.0775 ^a	0.1574±0.0120 ^a
4	Seeds + Culture filtrate bacteria	30.11±3.74 ^a	21.17±1.09 ^a	4.0849±0.8280 ^a	0.4778±0.1453 ^{abc}	0.4552±0.0684 ^a	0.1440±0.0142 ^{ab}
5	Seeds + <i>F. solani</i> + Bacteria suspension	27.65±1.27 ^{ab}	18.19±1.97 ^b	1.9555±0.3100 ^c	0.2362±0.0240 ^c	0.2511±0.0261 ^b	0.0954±0.0107 ^c
6	Seeds + <i>F. solani</i> + Culture filtrate	24.35±1.85 ^d	17.79±1.23 ^c	2.3134±1.0327 ^{bc}	0.7672±0.4100 ^a	0.2661±0.0981 ^b	0.1198±0.0345 ^{bc}
7	Seeds + Bacteria suspension + <i>F. solani</i>	26.59±1.44 ^b	19.11±1.54 ^b	3.2967±0.9198 ^{ab}	0.3848±0.1249 ^{bc}	0.3668±0.0877 ^a	0.1257±0.1257 ^{abc}
8	Seeds + Culture filtrate bacteria + <i>F. solani</i>	27.70±0.68 ^{ab}	21.03±1.47 ^a	3.1658±0.5528 ^{ab}	0.5877±0.2454 ^{ab}	0.3660±0.0405 ^a	0.1281±0.1281 ^{ab}

หมายเหตุ : * : หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ P<0.05

ตัวอักษร ^{abcd} ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05) แสดงในตาราง เป็น $\bar{X} \pm$ Standard Error



ภาพที่ 30 เปอร์เซ็นต์การงอก และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ดข้าวโพดในชุดการทดลองต่าง ๆ

หมายเหตุ : ตัวอักษร abcde ที่แตกต่างกันในแท่งกราฟสีเขียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm \text{Standard Error}$

บทที่ 4

บทวิจารณ์

การใช้สารเคมีทางการเกษตรก่อให้เกิดผลเสียที่หลากหลายทั้ง สารเคมีตกค้างบนผลผลิต สิ่งแวดล้อมเกิดการปนเปื้อน อีกทั้งยังส่งผลให้ราก่อโรคพืชติดต่อยา และสารเคมีอีกด้วย ดังนั้นวิธีทางชีวภาพถือเป็นทางเลือกใหม่ที่มีความปลอดภัย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงไม่ก่อให้เกิดการตกค้างของสารอันตรายบนผลผลิต นำมาซึ่งความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพถือเป็นทางเลือกใหม่ที่มีความปลอดภัยมากกว่าการใช้สารเคมี จึงสนใจคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากป่าชายเลน เนื่องจากมีรายงานวิจัยว่าป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่สามารถพบแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมถึงแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* (Chatterjee and Abraham, 2020) ดินจากป่าชายเลนแหลมตะลุมพุก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช พบแบคทีเรียทั้งหมด 5 ไอโซเลต ดินจากป่าชายเลนศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลน และป่าชายฝั่ง อำเภอขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช พบแบคทีเรียทั้งหมด 27 ไอโซเลต ดินจากป่าชายเลน อำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช พบแบคทีเรียทั้งหมด 8 ไอโซเลต ดินจากป่าชายเลนท่าทอง อำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบแบคทีเรียทั้งหมด 11 ไอโซเลต ดินจากป่าชายเลนบางไผ่ อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบแบคทีเรียทั้งหมด 13 ไอโซเลต และ ดินจากป่าชายเลนลิเล็ด อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบแบคทีเรียทั้งหมด 34 ไอโซเลต ซึ่งการมีจำนวนของแบคทีเรียแต่ละแหล่งจะมีความแตกต่างกันโดยแหล่งที่คัดแยกแบคทีเรียได้จำนวนมากจะมีความหลากหลายของพันธุ์ไม้ที่หลากหลายชนิดกว่า การเข้าถึงของน้ำทะเล และลักษณะดินก็มีส่วนในการดำรงชีวิต หรือการอยู่รอดของแบคทีเรีย ในขณะที่แหล่งที่พบจำนวนน้อยจะมีพืชน้อยชนิด หรือมีเพียงชนิดเดียว

ดังนั้นทางผู้วิจัยได้เห็นความสำคัญของป่าชายเลน เพราะเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง อีกทั้งยังสามารถพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารควบคุมทางชีวภาพเพื่อยับยั้งราก่อโรคพืชได้ โดยชีววิทยาป่าชายเลนแต่ละแหล่งตัวอย่างมีความแตกต่างกันทั้งการเข้าถึงของน้ำทะเล และความหลากหลายของพืชในพื้นที่ ป่าชายเลนแหลมตะลุมพุก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช จะมีพืชโกงกางใบเล็ก และโกงกางใบใหญ่ เป็นจำนวนมากตลอดฝั่ง ลักษณะดินเลนมีพื้นที่ที่ติดชายฝั่งทะเลโดยส่วนใหญ่ ดินจากป่าชายเลนศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลน และป่าชายฝั่ง อำเภอขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช จะมีพืชโกงกางใบใหญ่เป็นจำนวนมาก ลักษณะดินเลน มีพื้นที่แนวแกวยาวตลอดชายฝั่งทะเล ดินจากป่าชายเลน อำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช จะมีพืชโกงกางใบเล็ก โกงกางใบใหญ่ ดินเบ็ดทะเล และแสม ลักษณะดินเลน มีพื้นที่เป็นป่าตลอดชายฝั่งมีสภาพน้ำเป็นกร่อย เนื่องจากมีการไหลผ่านของแม่น้ำ ดินจากป่าชายเลนท่าทอง อำเภอกาญจนดิษฐ์

จนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานีและ ดินจากป่าชายเลนบางใบไม้ อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี จะมีพืชต้นจาก ดินเลน ปนเหนียว มีพื้นที่โดยส่วนใหญ่เข้าถึงแหล่งน้ำจืด เนื่องจากเป็นลักษณะคลองปากน้ำ และดินจากป่าชายเลนลีเล็ด อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี จะมีพืชต้นโกงกางใบเล็ก โกงกางใบใหญ่ ต้นจากตีนเป็ดทะเล ลำพู และแสมทะเล ลักษณะดินเลน มีการเข้าถึงของน้ำทะเลและน้ำจืด เนื่องจากเป็นปากอ่าว

เมื่อนำแบคทีเรียมาย้อมแกรม และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบทางชีวเคมี พบแบคทีเรียติดสีน้ำเงินแกรมบวก รูปร่างแท่ง มีการย่อยแป้ง สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส และสามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Foysal and Lisa 2018; Tan et al., 2018; Navinchandran et al., 2014) เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลนทั้ง 6 แหล่ง ทั้งหมด 98 ไอโซเลต มาย้อมแกรม และทดสอบทางชีวเคมีพบว่า มี 18 ไอโซเลตที่ให้ผลการทดสอบคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp.

การทดสอบความสามารถของการยับยั้งร่ากอโรคพืชโดยวิธี Dual culture และ Culture filtrate มีความแตกต่างในส่วนการนำสารที่ได้จากแบคทีเรียมาใช้ โดยวิธี Dual culture จะใช้เซลล์แบคทีเรียมาทดสอบกับร่ากอโรคโดยตรง แต่ Culture filtrate จะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทำให้สารควบคุมทางชีวภาพถูกปล่อยออกมาสู่ภายนอกเซลล์ จากการทดสอบความสามารถของการยับยั้งร่ากอโรคพืชโดยวิธี Dual culture มีแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งร่ากอโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *C. gloeosporioides* และ *P. palmivora* ได้ เมื่อทดสอบความสามารถของการยับยั้งร่ากอโรคพืชโดยวิธี Culture filtrate พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลั่งออกนอกเซลล์ของ VIMSH06 แสดงศักยภาพในการยับยั้งรา *F. solani* ได้ดีที่สุดเท่ากับ 71.62 ± 2.21 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานวิจัยได้ทดสอบการยับยั้งร่ากอโรคด้วยวิธี Dual culture ด้วย *Bacillus subtilis* V26 พบว่าสามารถยับยั้งรา *F. sambucinum*, *F. oxysporum*, *F. solani* และ *F. graminearum* สาเหตุโรคหัวเน่า โรคเหี่ยวแห้งบนมันฝรั่งได้ โดยมีความการยับยั้งเท่ากับ 17.8, 16.7, 19.7 และ 10.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Khedher et al. 2021) และงานวิจัยการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของราโดยวิธี ใช้ส่วนใสปราศจากเซลล์ของแบคทีเรีย พบว่า *B. subtilis* V26 สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. sambucinum* ได้ดีที่สุดถึง 85.3 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้ง *F. graminearum*, *F. solani* และ *F. oxysporum* ได้ถึง 73.6, 72.8 และ 54.7 เปอร์เซ็นต์ ได้ตามลำดับ เมื่อศึกษาถึงชนิดของการสร้างยีน เพื่อผลิตสารควบคุมทางชีวภาพของเซลล์พบว่า *B. subtilis* V26 มียีน *ituC*, *fenA*, *fenB*, *fenD*, *sfAA*, *bmy*, *mnlA*, *bae* และ *bac* ที่สามารถผลิตสารควบคุมทางชีวภาพลิโปเปปไทด์ ได้แก่ iturin, fengycin, surfactin, bacylomycin, macrolactin, bacillaene และ bacilysin (Khedher et al., 2021) จะเห็นได้ว่า

เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะมีการเจริญ และสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเราได้สูงกว่าการใช้เซลล์เพียงอย่างเดียว

เมื่อจำแนกแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่า VIMSH06 มีความเหมือนกับสปีชีส์ *Bacillus* ถึง 99.93 เปอร์เซ็นต์ โดยเพื่อความแม่นยำของผลการวิเคราะห์ต้องมีการส่งวิเคราะห์ใหม่ โดยต้องหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของหลายยีนที่อนุรักษ์สูงแล้ว BLAST เทียบข้อมูลกับหลาย ๆ ยีน และอ่านเพิ่มเติมด้วย key word multilocus gene sequencing (MGS) ต่อไป ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ เป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยืนยันว่ามีความปลอดภัยในการนำมาใช้ และสามารถผลิตสารควบคุมทางชีวภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ทั้งในห้องปฏิบัติการ และภาคสนาม (Torres et al., 2011) ซึ่งกลไกการควบคุมทางชีวภาพของแบคทีเรีนี้นั้น สามารถผลิตสารต้านจุลชีพหรือเอนไซม์ การแข่งขันด้านสารอาหาร และอากาศ การต้านทานโรคในพืช โดยกลไกการควบคุมศัตรูพืชส่วนใหญ่ มักจะใช้กลไกมากกว่าหนึ่งอย่าง (Wu et al., 2019)

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช ได้แก่ การหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 เลี้ยงในอาหารเหลว NB สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของรา *F. solani* ได้ดีที่สุดเท่ากับ 67.81 ± 0.41 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ NB, LB และ TSB ซึ่งอาหารแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 สามารถใช้ Peptone ในอาหาร NB เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่า Tryptone ในอาหาร LB และ TSB ดังนั้นแบคทีเรียจึงสามารถใช้องค์ประกอบของอาหาร NB เพื่อการเจริญ และผลิตสารควบคุมทางชีวภาพออกมา เมื่อทดสอบการหาสภาวะกรด-เบส ที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 ในอาหารเหลว NB ที่สภาวะ pH 7 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของรา *F. solani* ได้ดีที่สุด 76.81 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานวิจัยศึกษาสภาวะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมจะทำให้เชื้อสามารถผลิตสารควบคุมทางชีวภาพชนิด surfactin และ iturin A ที่ยับยั้งรา *Fusarium* ได้ ซึ่ง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BZR 336 ที่เลี้ยงในสภาวะ pH 8 จะมีจำนวนเซลล์ (2.7×10^9 CFU/ml) และ *B. subtilis* BZR 517 ที่เลี้ยงในสภาวะ pH 6 ถึง pH 8 มีจำนวนเซลล์ (1.0×10^9 CFU/ml) ดังนั้นสภาวะกรด-เบสที่ต่างกัน ก็จะทำให้การเจริญ และจำนวนเชื้อต่างกัน ส่งผลในการสร้างปริมาณสารยับยั้งราก่อโรคพืชได้ที่แตกต่างกันอีกด้วย (Sidorova et al., 2020)

เมื่อทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการบ่มแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 พบว่าอาหารเหลว NB ที่สภาวะ pH 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *F. solani* ได้ดีที่สุด 73.00 ± 0.20 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิถือเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เชื้อสามารถผลิตสารควบคุมทางชีวภาพออกมาได้ เนื่องจากแต่ละอุณหภูมิสามารถผลิตสารได้แตกต่างกัน ดังตัวอย่าง *Bacillus amyloliquefaciens* สามารถผลิต iturin A ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียส (Kumar et al., 2017) *Bacillus subtilis* เลี้ยงในอาหาร LB ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สามารถผลิต chitinase ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* และ *Penicillium chrysogenum* ได้ (Karunya et al., 2011) และเมื่อนำส่วนในสไปราศจากเซลล์ของ *Bacillus pseudomycooides* MT32 มาเลี้ยงในอาหาร NB อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) เท่ากับ 8 µg/ml สามารถยับยั้งรา *Penicillium digitatum* และ *Aspergillus niger* ได้ (El-Saadony et al., 2019)

และจากการทดสอบหาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่สภาวะ pH 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 21 ชั่วโมง สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *F. solani* ได้ดีที่สุด 73.99±0.42 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานวิจัยได้นำ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ N3 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB, pH6, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง สามารถผลิตสารควบคุมทางชีวภาพสำหรับต้านเชื้อรา *Curvularia lunata* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคจุดขึ้นสนิมของดอกไม้ในกล้วยไม้ได้ โดยมีโซนการยับยั้ง 7.69±0.24 มิลลิเมตรจากการวิเคราะห์ชนิดของสารที่แบคทีเรียสามารถสร้าง และยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดชั่วโมงที่ 21 ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้ออยู่ในระยะ Stationary phase นั้นพบว่าเป็น flagellin A ซึ่งโปรตีนชนิดนี้ทำให้ลักษณะของเส้นใยรา และสปอร์บวม จนไม่สามารถเจริญได้ (Sowanpreecha et al., 2018) และงานวิจัยนำ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ N3.2, *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ D747 และ *B. velezensis* สายพันธุ์ QST713 ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Xylella fastidiosa* ได้ ตั้งแต่ระยะเวลาที่ 18 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 90 ชั่วโมง การยับยั้งราโดยแบคทีเรียจะลดลง แสดงว่าในช่วง Stationary phase แบคทีเรียสามารถสร้างสารยับยั้งราก่อโรคพืชได้ แต่เมื่อเวลาผ่านไปจะทำให้ศักยภาพการยับยั้งลดลงเรื่อย ๆ อาจเนื่องมาจากเชื้อมีปริมาณน้อยและค่อย ๆ เข้าสู่ระยะ Death phase (Zicca et al., 2020)

และจากการทดลองยังพบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรีย VIMSH06 ยังสามารถหลั่งออกมาได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 เป็นต้นไป และผลิตสารได้มากขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา *F. solani* สูงขึ้นด้วย

การทดสอบความเสถียรต่อความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 มีศักยภาพในการยับยั้งรา *F. solani* โดยมีค่าระหว่าง 60 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 2 ถึง pH 9 และอุณหภูมิ 20 ถึง 121 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย VIMSH06 สามารถทนความร้อนได้มากกว่า 100 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ *Bacillus amyloliquefaciens* CJW15 และ *Bacillus amyloliquefaciens* SSD8 สามารถทนต่อความเป็นกรด-เบส ในช่วง 3 ถึง 11 และอุณหภูมิ ที่ 50 ถึง 100 องศาเซลเซียส ได้ เมื่อวิเคราะห์เพื่อหาชนิดของสารพบว่า เป็นไลโปเปปไทด์ ชนิด Surfactin, fengycin และ iturin (Liu et al., 2016)

จากรายงานวิจัยศึกษา *B. subtilis* สายพันธุ์ N3 สามารถเสถียรต่อ pH 2 ถึง 10 และที่อุณหภูมิ 20 ถึง 121 องศาเซลเซียส (Sowanpreecha et al., 2018) จากรายงานวิจัย ได้นำ *Bacillus safensis* สายพันธุ์ B21 มาเลี้ยงในอาหารเหลว และนำส่วนใสของแบคทีเรียมาทดสอบความเสถียรต่อค่า กรด-เบส pH 1, pH 3, pH 5, pH 7, pH 9, pH 11 และ pH 13 และค่าอุณหภูมิ 40, 60, 80, 100 and 120 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถทน และยังมีศักยภาพในการยับยั้งราก่อโรค *Magnaporthe oryzae* ได้ตั้งแต่ pH 1 ถึง pH 9 และอุณหภูมิ 40-100 องศาเซลเซียส เมื่อจัดจำแนกชนิดของสารพบว่าเป็น iturin A2 และ iturin A6 (Rong et al., 2020) ซึ่งสารออกฤทธิ์ของแบคทีเรียที่สามารถทนต่อค่าความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิได้ อีกทั้งยังมีศักยภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดี โดยจากรายงานวิจัยข้างต้นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* สามารถสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ทนต่อค่าดังกล่าวถือเป็นข้อได้เปรียบในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในการเก็บรักษา หรือมุ่งเน้นในการนำไปใช้เพื่อยับยั้งราก่อโรคพืชได้หลายแนวทาง

การตรวจดูลักษณะเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สังเกตเห็นว่าเส้นใยรา *F. solani* โดนทำลายโดยสารออกฤทธิ์จากแบคทีเรีย VIMSH06 ทำให้ปลายเส้นใยราผิดปกติ คือเหี่ยว แพลลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีราเพียงอย่างเดียว จากงานวิจัยที่ใช้ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ CCeRi1-002 เพื่อยับยั้งรา *Fusarium solani* และ *Fusarium kuroshium* พบว่าลักษณะเส้นใยที่ผิดปกติ มีการบวม เมื่อวิเคราะห์ชนิดของสารที่แบคทีเรียผลิตออกมาพบว่าเป็นกลุ่มของ lipopeptide ได้แก่ iturin, surfactin and fengycin (Vallejo et al., 2020)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคบนเมล็ดข้าวโพดในงานเพาะเลี้ยง (*In vivo*) พบว่าแบคทีเรีย VIMSH06 มีศักยภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของราก่อโรคต่อเมล็ดข้าวโพดได้ โดยไม่พบโคนิเดียของราในชุดที่แช่เมล็ดข้าวโพดร่วมกับแบคทีเรียก่อนโคนิเดีย และเมื่อวัดการเจริญของต้นกล้าข้าวโพด เปอร์เซ็นต์การงอก และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ดข้าวโพดในชุดการทดลองต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียช่วยลดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งจากรายงานวิจัยศึกษา *Bacillus velezensis* ที่เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ เมื่อนำเมล็ดข้าวโพดแช่ด้วยแบคทีเรียจะลดโอกาสการติดเชื้อในรากของข้าวโพดได้ และเมื่อส่องดูเซลล์รากภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบการเข้าทำลาย และอาศัยของราก่อโรค ที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการสร้างกล้าไม้ และป้องกันโรคเชื้อรา *Fusarium verticillioides* (Pal et al., 2020)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณป่าชายเลนทั้ง 6 แหล่ง พบว่าสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 98 ไอโซเลต โดยมี 36 ไอโซเลต ที่ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่ง และมี 18 ไอโซเลต ที่ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีตรงกับการทดสอบแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส นำแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคโดยวิธี Dual culture กับราทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *C. gloeosporioides* และ *P. palmivora* พบว่า มี 6 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งราก่อโรคได้ และ VIMSH06 ไอโซเลตเดียว ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ นำแบคทีเรีย 6 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งราก่อโรคในพืชได้มาทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคด้วย Culture filtrate พบว่าไอโซเลต VIMSH06 สามารถยับยั้งการเจริญของรา *F. solani* ได้ดี ดังนั้นจึงนำไอโซเลต VIMSH06 ไปศึกษาเพื่อจัดจำแนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับหลายสปีชีส์ในสกุล *Bacillus* มากถึง 99.93 เปอร์เซ็นต์ และนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช โดยพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่สภาวะ pH 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 21 ชั่วโมง สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *F. solani* ได้ดีที่สุด ถึง 73.99 ± 0.42 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิของน้ำเลี้ยงเชื้อของ VIMSH06 กับการยับยั้งรา *F. solani* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียสามารถทนที่ pH2 ถึง pH9 และอุณหภูมิได้ตั้งแต่ 20 ถึง 121 โดยยังมีศักยภาพในการยับยั้งราก่อโรค ซึ่งพบว่าสารที่ผลิตโดย VIMSH06 สามารถทนความเป็นกรด-เบส และทนความร้อนได้ เมื่อตรวจดูลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ระหว่างแบคทีเรีย VIMSH06 และรา *F. solani* พบว่าปลายเส้นใยของรา ผิดปกติอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเทียบกับชุดควบคุม อาจเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และนำไปทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งราก่อโรคบนเมล็ดข้าวโพดในงานเพาะเชื้อ พบว่าแบคทีเรีย VIMSH06 มีศักยภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของราก่อโรคต่อรากพืชได้ และเมื่อทดสอบหาอัตราการงอกและอัตราการติดเชื้อของเมล็ดข้าวโพดในกล่องปลูก พบว่าแบคทีเรียช่วยลดการติดเชื้อของเมล็ดส่งผลให้อัตราการงอกของเมล็ดดีขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อรา และ ดังนั้นแบคทีเรีย VIMSH06 อาจนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สำหรับการยับยั้งราก่อโรคพืชทางด้านเกษตรยั่งยืนได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรเพิ่มการทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียต่อการสร้างสารอื่น ๆ เพิ่มเติมเช่น การทดสอบเอนไซม์ไฮโดรไลติก, Siderophores, การตรึงไนโตรเจน, การละลายฟอสเฟต, การสร้างเอนไซม์ protease, β -glucanase, cellulase และ pectinase

5.2.1 ควรมีการตรวจหายีนที่สามารถสร้างสารควบคุมทางชีวภาพด้วย เพื่อจะได้ระบุชนิดของสาร

บรรณานุกรม

- ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา, โกมินทร์ วิโรจน์วัฒนกุล และอดิศักดิ์ คำนวนศิลป์. 2547. โรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัด. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยพืชไร่.
- ธารทิพย์ ภาสบุตร, กรรณิการ์ เพ็ชรนภักตร์ และธนิตยา ปล่องบรรจง. 2548. รวบรวมและจัดจำแนกชนิดเชื้อราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของไม้ผลและพืชเศรษฐกิจ. กลุ่มวิจัยโรคพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรุงเทพฯ.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์.
- ศุภยางค์ วรวิฑูณชัย. 2547. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- สุชาดา จาติกวณิช และ กาญจนา จันทองจีน. 2556. เอกสารปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อภิรักษ์ สมฤทธิ์, ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี, ธารทิพย์ ภาสบุตร และสุนิรัตน์ สีมะเต็อ. 2557. การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคพืช (non-pathogenic *Fusarium*) ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum*. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร.
- Achi, S. and Halami, P. M. 2016. Antimicrobial peptides from *Bacillus* spp. use in antimicrobial packaging. *Antimicrobial Food Packaging*. 43: 527-537.
- Al-fadhl, A., Al-Abedy, A. N., and Al-Janabi, M. M. 2018. Molecular identification of novel isolates of *Rhizoctonia solani* kuhn and *Fusarium* spp. (Matsushima) isolated from petunia plants (petuniahybridal.) *Plant Archives*. 18(1): 703-711.
- Al-Mughrabi, K. I. 2010. Biological control of *Fusarium* dry rot and other potato tuber diseases using *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter cloacae*. *Biological Control*. 53(3): 280-284.
- Alongi D. M., Christoffersen, P. and Tirendi, F. 1993. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 171: 201-223.
- Alongi D. M., Sasekumar A., Tirendi F. and Dixon P. 1998. The influence of stand age on benthic decomposition and recycling of organic matter in managed mangrove

- forests of Malaysia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 225: 197–218.
- Arrebola, E., Jacobs, R. and Korsten, L. 2010. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 108(2): 386–395.
- Ashwini, N. and Srividya, S. 2013. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*. 4(2): 127–136.
- Bacon, C. W. and Williamson, J. W. 1992. Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. *Mycopathologia*. 117(1-2): 65–71.
- Becker, P., Esker, P. and Umaña, G. 2021. Incorporation of microorganisms to reduce chemical fungicide usage in black sigatoka control programs in Costa Rica by use of biological fungicides. *Crop Protection*. 146. 105657.
- Bhattacharya, S., Das, A., Samadder, S. and Rajan, S. S. 2016. Biosynthesis and characterization of a thermostable, alkali-tolerant chitinase from *Bacillus pumilus* Jubch08 displaying antagonism against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. *3 Biotech*. 6(1): 87.
- Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodríguez, M., Chulze, S. and Etcheverry, M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Research in Microbiology*. 156(5-6): 748–754.
- Chatterjee, A. and Abraham, J. 2020. Mangrove endophytes: A rich source of bioactive substances. *Biotechnological Utilization of Mangrove Resources*. 2: 27–47.
- Choudhary, D. K., Kasotia, A., Jain, S., Vaishnav, A., Kumari, S., Sharma, K. P. and Varma, A. 2015. Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants under abiotic and biotic stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*. 35(1): 276–300.
- Daniel, R. Z. and John, B. P. 2008. The Genus *Bacillus*. Practical Handbook of microbiology. 310.
- Eke, P., Adamou, S., Fokom, R., Nya, V. D., Fokou, P. V., Wakam, L. N., Nwaga, D. and Boyom, F. F. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi alter antifungal potential of lemongrass essential oil against *Fusarium solani*, causing root rot in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Heliyon*. 6(12): 37-57.

- Eldeen, I. M. S., Alenjandra, L. S. M., Saidin, J. and Zin, N. A. M. 2015. Endophytic *Bacillus* species isolated from mangrove plants, and their antagonistic effects against some pathogenic bacterial strains. *International Journal of Phytomedicine*. 7: 302-309.
- El-Saadony, M. T., El-Wafai, N. A., El-Fattah, H. I. and Mahgoub, S. A. 2019. Biosynthesis, optimization and characterization of silver nanoparticles using a soil isolate of *Bacillus pseudomycooides* MT32 and their antifungal activity against some pathogenic fungi. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 7(4). 237-249.
- Euzeby, J. P. 2010. *Bacillus* Cohn 1872, genus in list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Available: <http://www.bacterio.net/bacillus.html>. Accessed Oct. 29, 2020.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J. and Stanković, S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*. 285: 44–55.
- Foyosal, M. J. and Lisa, A. K. 2018. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 16(2): 387–392.
- Garcia, S. N. J., Mier, L. G., Trejo, J. F. G., Gomez, X. S. R., Gonzalez, R. G. G. and Perez, A. A. F. 2018. *Fusarium* mycotoxins and metabolites that modulate their production. *Fusarium - Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers*.
- Gautam, A. K. 2014. *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, pathogenicity and management in India. *Journal of Plant Physiology and Pathology*. 02(02).
- Guevara-Avenidaño, E., Bejarano-Bolívar, A. A., Kiel-Martínez, A.-L., Ramírez-Vázquez, M., Méndez-Bravo, A., von Wobeser, E. A., Sánchez-Rangel, D., Guerrero-Analco, J. A., Eskalen, A. and Reverchon, F. 2019. Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiological Research*. 219: 74–83.
- Haddoudi, I., Cabrefiga, J., Mora, I., Mhadhbi, H., Montesinos, E. and Mrabet, M. 2021. Biological control of *fusarium* wilt caused by *Fusarium equiseti* in *Vicia faba* with

- broad spectrum antifungal plant-associated *Bacillus* spp.. *Biological Control*. 160: 104671.
- Hawa, M. M., Salleh, B. and Latiffah, Z. 2013. Characterization and pathogenicity of *Fusarium proliferatum* causing stem rot of *Hylocereus polyrhizus* in Malaysia. *Annals of Applied Biology*. 163(2): 269–280.
- Hu, H. Q., Li, X. S. and He, H. 2010. Characterization of an antimicrobial material from a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* from mangrove for biocontrol of *Capsicum* bacterial wilt. *Biological Control*. 54(3): 359–365.
- Huang, F., Chen, G. Q., Hou, X., Fu, Y. S., Cai, L., Hyde, K. D. and Li, H. Y. 2013. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. *Fungal Diversity*. 61(1): 61-74.
- Huergo, L. F., Rissi, D. V., Elias, A. S., Gonçalves, M. V., Gernet, M. V., Barreto, F. and Cruz, L. M. 2018. Influence of ancient anthropogenic activities on the mangrove soil microbiome. *Science of the Total Environment*. 645: 1-9.
- Huerta, M. M. and Huaman, E. R. 2017. Identificación y caracterización del agente causal de la pudrición de la raíz y tallo del Maíz (*Zea mays* L.). *Aporte Santiaguino*. 9(1): 69.
- Hung, P. M., Wattanachai, P., Kasem, S. and Poaim, S. 2015. Biological control of *Phytophthora palmivora* causing root rot of pomelo using *Chaetomium* spp. *Mycobiology*. 43(1): 63–70.
- Ingle, A., Rai, M., Gade, A. and Bawaskar, M. 2008. *Fusarium solani*: a novel biological agent for the extracellular synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*. 11(8): 2079–2085.
- Joo, H. J., Kim, H. Y., Kim, L. H., Lee, S., Ryu, J. G. and Lee, T. 2015. A *Brevibacillus* sp. antagonistic to mycotoxigenic *Fusarium* spp. *Biological Control*. 87: 64–70.
- Karunya, S. K., Reetha, D., Saranraj P. and Milton D. J. 2011. Optimization and purification of chitinase produced by *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against plant pathogens. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*. 2(6): 1680-1685.
- Kathiresan, K. and Bingham, B. L. 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology*. 40: 81–251.

- Kim, P. I., Ryu, J., Kim, Y. H. and Chi, Y. T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin a from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(1): 138–145.
- Kim, W. G., Lee, B. D., Kim, W. S. and Cho, W. D. 2002. Root rot of moth orchid caused by *Fusarium* spp. *Plant Pathology Journal*. 18(4): 225–227.
- Khedher B. S., Trabelsi, B. M. and Tounsi, 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: 104444.
- Kumar, P. N., Swapna, T. H., Khan, M. Y., Reddy, G. and Hameeda, B. 2017. Statistical optimization of antifungal iturin a production from *Bacillus amyloliquefaciens* Rhnk22 using agro-industrial wastes. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 24(7): 1722–1740.
- Kurniawan, E., Panphon, S. and Leelakriangsak, M. 2019. Potential of marine chitinolytic *Bacillus* isolates as biocontrol agents of phytopathogenic fungi. *Earth and Environmental Science*. 217(1): 1755-1315.
- Kushiro, M., Saitoh, H., Sugiura, Y., Aoki, T., Kawamoto, S. I. and Sato, T. 2012. Experimental infection of *Fusarium proliferatum* in *Oryza sativa* plants; fumonisin B1 production and survival rate in grains. *International Journal of Food Microbiology*. 156(3): 204–208.
- Lee, G. H., Rhee, M. S., Chang, D. H., Kwon, K. K., Bae, K. S., Yang, S. H. and Kim, B. C. 2014. *Bacillus solimangrovi* sp. nov. isolated from mangrove soil. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*. 64(5): 1622–1628.
- Leslie, J. F. 1992. Fumonisin B1 production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* Section Liseola). *Phytopathology*. 82(3): 341.
- Liu, X., Shim, J. M., Yao, Z., Lee, J. Y., Lee, K. W., Kim, H. J., Ham, K. S. and Kim, J. H. 2016. Properties of antimicrobial substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CJW15 and *Bacillus amyloliquefaciens* SSD8. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 44(1): 9–18.

- Maria, G. L. and Sridhar, K. R. 2002. Richness and diversity of filamentous fungi on woody litter of mangroves along the west coast of India. *Current Science*. 83: 1573–1580.
- Márcia, P. Lisboa., Bonatto, D., Bizani, D., João A. P., Henriques. and Brandelli, A. 2006. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic Forest. *International Microbiology*. 9: 111-118.
- Marín, P., Magan, N., Vázquez, C. and Jaén, G. M. T. 2010. Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene FUM1 in the maize pathogens and fumonisin producers *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *FEMS Microbiology Ecology*. 73(2): 303-11.
- Masratul, M., Hawa, B., Salleh. And Latiffah, Z. 2013. Characterization and pathogenicity of *Fusarium proliferatum* causing stem rot of *Hylocereus polyrhizus* in Malaysia. *Annals of Applied Biology*. 269–280.
- Meera, T., Louis, V. and S. Beena. 2016. Diseases of Phalaenopsis: symptoms, etiology and management. *Inter national Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology*. 5: 296–300.
- Mendoza, J. E. M. and Velandia, C. A. M. 2022. *Bacillus velezensis* supernatant mitigates tomato *Fusarium* wilt and affects the functional microbial structure in the rhizosphere in a concentration-dependent manner. *Rhizosphere*. 21: 100475.
- Navinchandran, M., Iyapparaj, P., Moovendhan, S., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Immanuel, G. and Palavesam, A. 2014. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*. 36: 38-45.
- Orlikowski, L. B. and Szkuta, G. 2006. *Phytophthora* rot of some orchids-new disease in Poland. *Phytopathologia Polonica*. 40: 57-61.
- Pal, G., Kumar, K., Verma, A. and Verma, S. K. 2022. Seed inhabiting bacterial endophytes of maize promote seedling establishment and provide protection against fungal disease. *Microbiological Research*. 255: 126926.

- Parikh, L., Kodati, S., Eskelson, M. and Adesemoye, A. 2018. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. in row crops in Nebraska. *Crop Protection*. 108: 120–127.
- Perincherry, L., Kanczugowska, L. J. and Stepien, E. 2016. Fusarium-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions. *Toxins*. 11(11): 664.
- Pu, R., Wang, P., Guo, L., Li, M., Cui, X., Wang, C., Liu, Y. and Yang, Y. 2022. The remediation effects of microbial organic fertilizer on soil microorganisms after Chloropicrin fumigation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 231: 113188.
- Quiroz, D. L. C. R., Cruz Maldonado, J. J., Alanis, M. R., Torres, J. A. D. and Saldivar, R. P. 2019. Fungi-based biopesticides: Shelf-life preservation technologies used in commercial products. *Journal of Pest Science*. 92(3): 1003–1015.
- Radovanović, N., Milutinović, M., Mihajlovski, K., Jović, J., Nastasijević, B., Rajilić-Stojanović, M. and Branković, S. D. 2018. Biocontrol and plant stimulating potential of novel strain *Bacillus* sp. PPM3 isolated from marine sediment. *Microbial Pathogenesis*. 120: 71–78.
- Riaz, R., Khan, A., Khan, W. J., Jabeen, Z., Yasmin, H., Naz, R., Nosheen, A. and Hassan, M. N. 2021. Vegetable associated *Bacillus* spp. suppress the pea (*Pisum sativum* L.) root rot caused by *Fusarium solani*. *Biological Control*. 158: 104610.
- Rishad, K. S., Rebello, S., Shabanamol, P. S. and Jisha, M. S. 2017. Biocontrol potential of halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel *Bacillus pumilus* MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 137: 36–41.
- Rodríguez I. M., María J. de., Morales, Y., Hilda V., Rojas, S., García D. L. S., Doralinda A. and Guzmán D. P. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia*. 163(1): 31–39.
- Rong, S., Xu, H., Li, L., Chen, R., Gao, X. and Xu, Z. 2020. Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 162: 69–77.
- Sahoo, K. and Dhal, N.K. 2009. Potential microbial diversity in mangrove ecosystems: A review *Indian Journal of Marine Sciences*. 38(2): 249-256.

- Sankaralingam S., Palpperumal S., Kathiresan D., Harinathan B., Shankar T. and Prabhu D. 2017. Antifungal activity of mangrove rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* against certain phytopathogenic fungi and its growth characterization. *American Journal of Current Microbiology*. 5: 9-18.
- Saxena, A., Raghuwanshi, R., Gupta, V. K. and Singh, H. B. 2016. Chilli anthracnose: The epidemiology and management. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1527.
- Shakeel, Q., Lyu, A., Zhang, J., Wu, M., Chen, S., Chen, W., Li G., and Yang, L. 2016. Optimization of the cultural medium and conditions for production of antifungal substances by *Streptomyces platensis* 3-10 and evaluation of its efficacy in suppression of clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae*) of oilseed rape. *Biological Control*. 101: 59-68.
- Sharma, S., Singh, P. B., Chadha, P. and Saini, H. S. 2016. Chlorpyrifos pollution: its effect on brain acetylcholinesterase activity in rat and treatment of polluted soil by indigenous *Pseudomonas* sp. *Environmental Science and Pollution Research*. 24(1): 381–387.
- Sidorova, T. M., Asaturova, A. M., Homyak, A. I., Zhevnova, N. A., Shternshis, M. V. and Tomashevich, N. S. 2020. Optimization of laboratory cultivation conditions for the synthesis of antifungal metabolites by *Bacillus subtilis* strains. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 27(7): 1879–1885.
- Smith G.W. and Gupta R., 2018. Fumonisin veterinary toxicology. *Elsevier New York*. 1003–1018.
- Son, S., Khan, Z., Kim, S. and Kim, Y. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria, *Paenibacillus Polymyxa* and *Paenibacillus lentimorbus* suppress disease complex caused by root-knot nematode and fusarium wilt fungus. *Journal of Applied Microbiology*. 107(2): 524–532.
- Sondergaard, T., Hansen, F., Purup, S., Nielsen, A., Jorgensen, E. B., Giese, H. and Sorensen, J. 2011. Fusarin C acts like an estrogenic agonist and stimulates breast cancer cells *in vitro*. *Toxicology Letters*. 205(2): 116-121.
- Sowanprecha, R. Kanchanabanca, C., Sangvanich, P. and Rerngsamran, P. 2018. *Bacillus subtilis* N3 as a biocontrol agent for *Curvularia lunata* and its antifungal

- protein properties. *International Journal of Agriculture and Biology*. 20(3). 531–538.
- Sowanpreecha, R., and Rerngsamran, P. 2018. Biocontrol of orchid-pathogenic mold, *Phytophthora palmivora* by antifungal proteins from *Pseudomonas aeruginosa* RS1. *Mycobiology*. 46(2): 129–137.
- Sporleder M. and Lacey L. A. 2013. Chapter 16 – Biopesticides. *Insert Pest Potato*. 463–497.
- Srivastava, P., Singh, M., and Chaturvedi, R. 2020. Herbal medicine and biotechnology for the benefit of human health. *Animal Biotechnology*. 613–629.
- Tan, T., Zhu, J., Shen, A., Li, J., Yu, Y., Zhang, M., Zhao, M., Li, Z., Chen, J., Gao, C., Cheng, Y., Guo, L., Yan, L., Sun, X., Zeng, L. and Yan, Z. 2018. Isolation and identification of a *Bacillus subtilis* HZ-72 exhibiting biocontrol activity against flax seedling blight. *European Journal of Plant Pathology*. 153(3): 825–836.
- Thatoi, H., Behera, B. C., Mishra, R. R. and Dutta, S. K. 2012. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: A review. *Annals of Microbiology*. 63(1): 1-19.
- Thasana, N., Prapagdee, B., Rangkadilok, N., Sallabhan, R., Aye, S. L., Ruchirawat, S., and Loprasert, S. 2010. *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtilin, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated β -amino acid. *FEBS Letters*, 584(14): 3209–3214.
- Torres, R., Teixidó, N., Usall, J., Abadías, M., Mir, N., Larrigaudiere, C. and Viñas, I. 2011. Anti-oxidant activity of oranges after infection with the pathogen *Penicillium digitatum* or treatment with the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Biological Control*. 57(2): 103–109.
- Tovar-Pedraza, J. M., Mora-Aguilera, J. A., Nava-Díaz, C., Lima, N. B., Michereff, S. J., Sandoval-Islas, J. S., Câmara, M. P., Téliz-Ortiz, D. and Leyva-Mir, S. G. 2020. Distribution and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Mexico. *Plant Disease*. 104(1): 137–146.
- Tsang, H. L., Huang, J. L., Lin, Y. H., Huang, K. F., Lu, P. L., Lin, G. H. and Chen, H. P. 2016. Borneol dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. strain TCU-HL1 catalyzes

- the oxidation of borneol and its isomers to camphor. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(21): 6378–6385.
- Tunsagool, P., Ployetch, S., Jaresitthikunchai, J., Roytrakul, S., Choowongkamon, K. and Rattanasrisomporn, J. 2021. Efficacy of cyclic lipopeptides obtained from *Bacillus subtilis* to inhibit the growth of *Microsporum canis* isolated from cats. *Heliyon*. 7(9).
- Umayah, A. and Purwantara, A. 2016. Identifikasi isolat *Phytophthora* asal kakao Identification of isolates of *Phytophthora* from cocoa. *E-Journal Menara Perkebunan*. 74: 2.
- Vallejo B., N., Pozos, D. A. C., Villanueva, J. L. M., Vázquez, M. R., Villarnovo, G. L. R., Analco, J. A. G, Martínez, L. P. P., and Reverchon, F. 2020. Forest tree associated bacteria for potential biological control of *Fusarium solani* and of *Fusarium kuroshium*, causal agent of fusarium dieback. *Microbiological Research*. 235: 126440.
- Vieria, W. A., Nunes, A. D., Veloso, J. S., Machado, A. R., Balbino, V. Q., Silva, A. C., Reis, A., Câmara, M. P. 2019. *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose on papaya fruit (*Carica papaya*) in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*. 15(1): 2.
- Wu, Y., Zhou, J., Li, C. and Ma, Y. 2019. Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbiology Open*. 8(8).
- Xiang, N., Lawrence, K. S., Kloepper, J. W., Donald, P. A., McInroy, J. A. and Lawrence, G. W. 2017. Biological control of *meloidogyne incognita* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on Cotton. *Plant Disease*, 101(5): 774–784.
- Yadav, K., Damodaran, T., Dutt, K., Singh, A., Muthukumar, M., Rajan, S., Gopal, R and Sharma, P. 2021. Effective biocontrol of banana *Fusarium* wilt tropical race 4 by a *Bacillus* rhizobacteria strain with antagonistic secondary metabolites. *Rhizosphere*. 18: 100341.
- Zhu, J. Z., Li, C. X., Zhang, C. J., Wang, Y., Li, X. G. and Zhong, J. 2019. *Fusarium solani* causing fruit rot of peach (*Prunus persica*) in Hunan, China. *Crop Protection*. 122: 171–174.

- Zicca, S., De Bellis, P., Masiello, M., Saponari, M., Saldarelli, P., Boscia, D. and Sisto, A. 2020. Antagonistic activity of olive endophytic bacteria and of *Bacillus* spp. strains against *Xylella fastidiosa*. *Microbiological Research*. 236: 126467.
- Zentmyer, G. A. 1973. Distribution of mating types of *Phytophthora palmivora*. *Phytopathology*. 63:6. 663.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Agar (NA) ยี่ห้อ HIMEDIA

วิธีการเตรียม ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปปริมาณ 28.0 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน บรรจุในขวดดูแวน ปิดฝาให้สนิทนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที ในอาหาร NA ประกอบไปด้วย

Peptone	5.00	กรัมต่อลิตร
HM peptone B#	1.50	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	1.50	กรัมต่อลิตร
Sodium chloride	5.00	กรัมต่อลิตร
Agar	15.00	กรัมต่อลิตร
pH 7.4±0.2, 25°C		

2. Nutrient Broth (NB) ยี่ห้อ HIMEDIA

วิธีการเตรียม ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปปริมาณ 13.0 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที ในอาหาร NB ประกอบไปด้วย

Peptone	5.00	กรัมต่อลิตร
HM peptone B#	1.50	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	1.50	กรัมต่อลิตร
Sodium chloride	5.00	กรัมต่อลิตร
pH 7.4±0.2, 25°C		

3. Luria Bertani Broth, Miller (LB) ยี่ห้อ HIMEDIA

วิธีการเตรียม ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปปริมาณ 25.0 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที ในอาหาร LB ประกอบไปด้วย

Tryptone	10.00	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.00	กรัมต่อลิตร
Sodium chloride	10.00	กรัมต่อลิตร

pH 7.5±0.2, 25°C

4. Soya Casein Digest Medium (Tryptone Soya Broth) (TSB) ยี่ห้อ HIMEDIA

วิธีการเตรียม ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปปริมาณ 30.0 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที ในอาหาร TSB ประกอบไปด้วย

Tryptone	17.00	กรัมต่อลิตร
Soya peptone	3.00	กรัมต่อลิตร
Sodium chloride	5.00	กรัมต่อลิตร
Dipotassium hydrogen phosphate	2.50	กรัมต่อลิตร
Dextrose (Glucose)	2.50	กรัมต่อลิตร

pH 7.3±0.2, 25°C

5. Potato Dextrose Agar (PDA)

วิธีการเตรียม ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปปริมาณ 39.0 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที ในอาหาร PDA ประกอบไปด้วย

Potatoes, infusion from	200.00	กรัมต่อลิตร
Dextrose (Glucose)	20.00	กรัมต่อลิตร
Agar	15.00	กรัมต่อลิตร

pH 5.6±0.2, 25°C

6. Potato Dextrose Broth (PDB)

วิธีการเตรียม ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปปริมาณ 24.0 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที ในอาหาร PDB ประกอบไปด้วย

Potatoes, infusion from	200.00	กรัมต่อลิตร
Dextrose (Glucose)	20.00	กรัมต่อลิตร

pH 5.1±0.2, 25°C

7. Motility Test Medium

วิธีการเตรียม ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปปริมาณ 22 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที ในอาหาร Motility Test Medium ประกอบไปด้วย

Approximate Formula	3.0	กรัมต่อลิตร
Beef Extract	10.0	กรัมต่อลิตร
Pancreatic Digest of Gelatin	5.0	กรัมต่อลิตร
Agar	4.0	กรัมต่อลิตร
pH 7.3 ± 0.2		25°C

8. Starch hydrolysis test

วิธีการเตรียม ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปปริมาณ 24 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที ในอาหาร Starch hydrolysis test ประกอบไปด้วย

Beef extract	2.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Starch soluble	2.0	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร

ภาคผนวก ข
การเตรียมทดสอบทางชีวเคมี

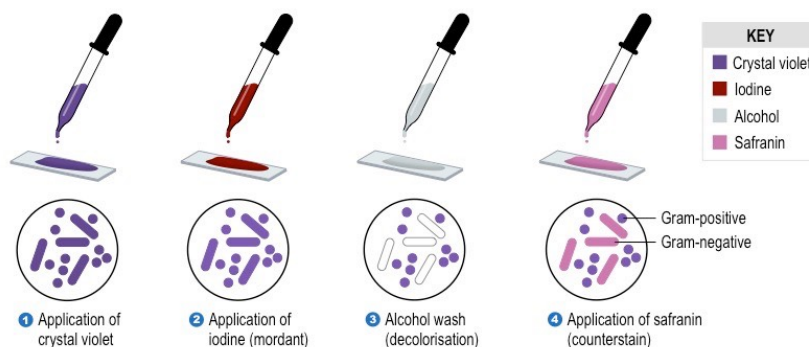
ภาคผนวก ข

การเตรียมทดสอบทางชีวเคมี

การย้อมสีเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี Gram stain

1. การเตรียมสไลด์ และย้อมสีเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี Gram stain

นำสไลด์มาเช็ดทำความสะอาด และนำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาป้ายให้กระจายบนสไลด์สะอาด ทำให้แห้งในอากาศ และผ่านเปลวไฟ ย้อมด้วยสี Crystal violet เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ ย้อมทับด้วย สารละลาย Iodine เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ ล้างสีออก โดยการเอียงสไลด์ แล้วเทราดด้วย Decolorizer หยุดปฏิกิริยา โดยการจุ่มสไลด์ลงในน้ำ ย้อมด้วยสี safranin เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ และซับให้แห้ง นำตัวอย่างไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์



ภาพภาคผนวกที่1 การย้อมสีเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี Gram stain

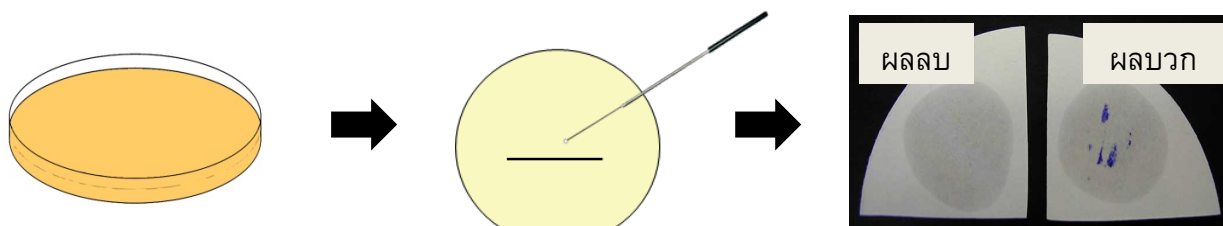
ที่มา: <https://ib.bioninja.com.au/options/untitled/b1-microbiology-organisms/gram-staining.html>

(สืบค้นเมื่อ 23 พฤษภาคม 2564)

การทดสอบทางชีวเคมี

1. ทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการบ่มนำมาทดสอบปฏิกิริยาโดยหยด Kovac's oxidase reagent ลงบนกระดาษกรอง และขีดเชื้อแบคทีเรียป้ายลงบนกระดาษ สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยผลบวก จะมีการเปลี่ยนสีเป็นสีม่วง ผลลบจะไม่มีสีเปลี่ยนสี

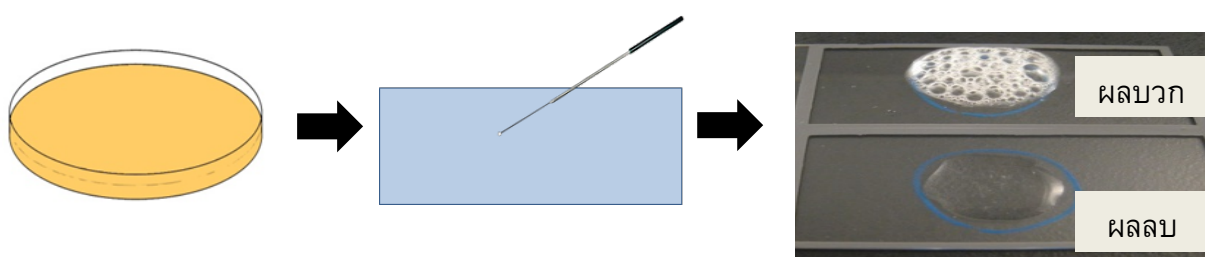


ภาพภาคผนวกที่ 2 การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส

ที่มา: <https://microbiologyinfo.com/oxidase-test-principle-uses-procedure-types-result-interpretation-examples-and-limitations/>
(สืบค้นเมื่อ 23 พฤษภาคม 2564)

2. ทดสอบปฏิกิริยาอะตะเลส

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการบ่มนำมาทดสอบปฏิกิริยาโดยขีดเชื้อลงบนกระดาษกรองไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยผลบวก จะมีการสร้างฟองแก๊ส ผลลบ จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง

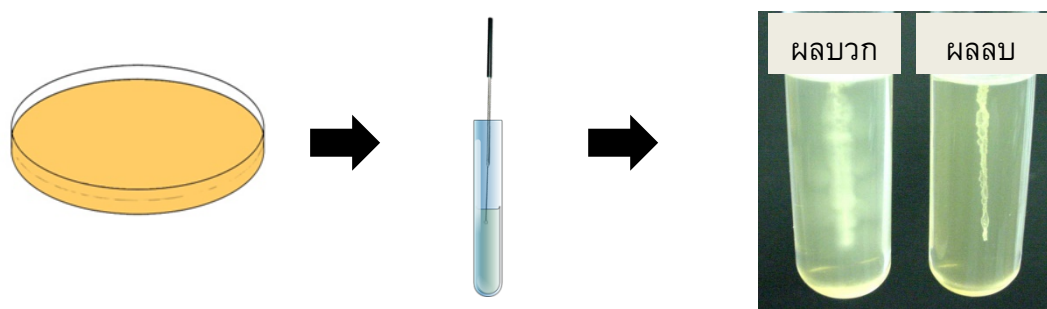


ภาพภาคผนวกที่ 3 การทดสอบปฏิกิริยาอะตะเลส

ที่มา: <https://www.quora.com/What-does-catalase-positive-mean-in-microbiology>
(สืบค้นเมื่อ 23 พฤษภาคม 2564)

3. ทดสอบการเคลื่อนที่

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการบ่มนำมาทดสอบการเคลื่อนที่โดยวิธีการแทงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Motility Medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการบ่มสังเกตผลที่เกิดขึ้น โดยผลบวก จะมีการเจริญของเชื้อออกจากรอยแทง ผลลบจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง



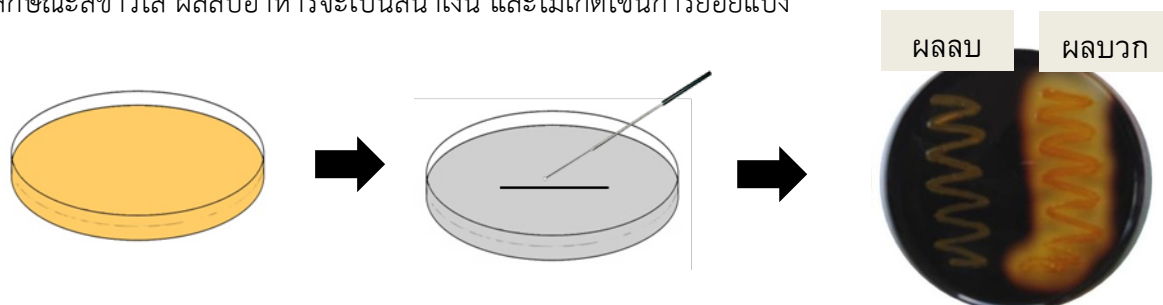
ภาพภาคผนวกที่ 4 การทดสอบการเคลื่อนที่

ที่มา: <https://germsandworms.wordpress.com/2013/03/09/motility/>

(สืบค้นเมื่อ 23 พฤษภาคม 2564)

4. ทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการบ่มนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส โดยขีดเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร Starch Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการบ่มหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมผิวหน้าอาหาร และสังเกตผลที่เกิดขึ้น โดยผลบวก จะมีโซนการย่อยแป้งลักษณะสีขาวใส ผลลบอาหารจะเป็นสีน้ำเงิน และไม่เกิดโซนการย่อยแป้ง



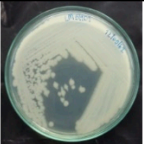
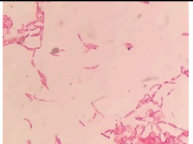
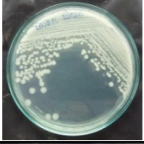
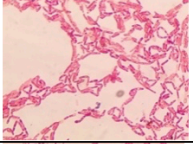

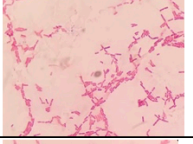

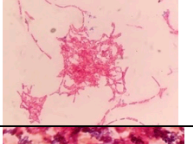


ภาพภาคผนวกที่ 5 การทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

ที่มา: <https://www.researchgate.net/figure/Starch-hydrolysis>

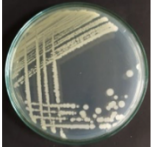
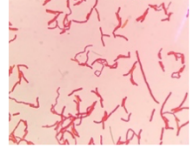

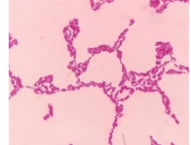

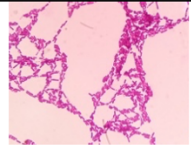
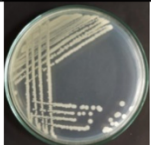
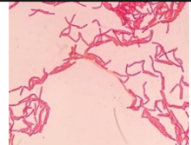
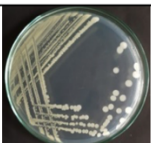
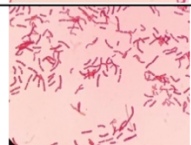
(สืบค้นเมื่อ 23 พฤษภาคม 2564)

ภาคผนวก ค
ผลการทดลอง

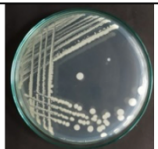
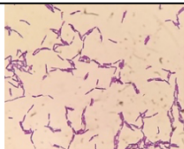

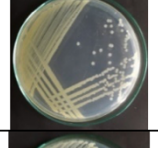
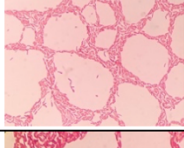
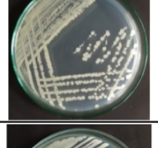
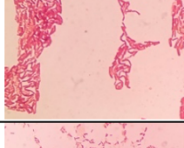
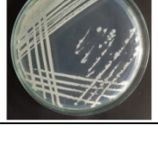
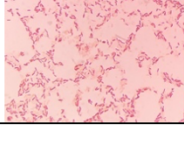
ตารางภาคผนวกที่ 1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชาย เลนแหลม ตะลุมพุก	LMSH01	ได้รับความร้อน	Convex	Wooly	White	+	Bacilli		
	LMSH02		Raised	Smooth (Entire)	White	+	Bacilli		
	LMST03	ไม่ได้รับความ ร้อน	Convex	Wooly	White	+	Bacilli		
	LMST04		Raised	Smooth (Entire)	White	+	Bacilli		
	LMST05		Pulvinated (drop-like)	Undulate (Wavy)	White	-	Rod		

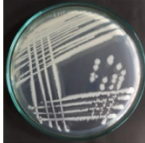
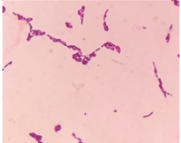
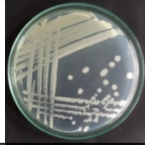
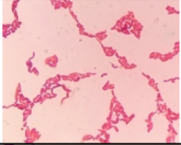
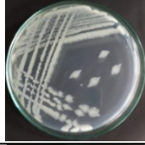
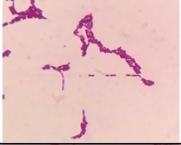
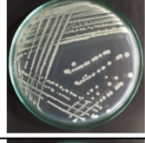
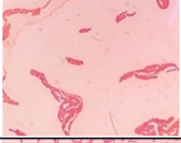
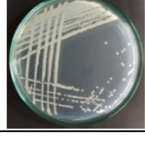
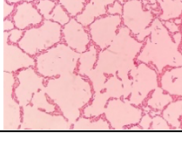
ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชายเลน ศูนย์วิจัยและ พัฒนาทรัพยากร ป่าชายเลน และ ป่าชายฝั่ง	VIMSH01	ได้รับความร้อน	Raised	Smooth (Entire)	Cream	-	Rod		
	VIMSH02		Raised	Smooth (Entire)	White	+	Rod		
	VIMSH03		Raised	Wooly	White	+	Rod		
	VIMSH04		Raised	Smooth (Entire)	Cream	-	Bacilli		
	VIMSH05		Raised	Smooth (Entire)	Cream	-	Rod		


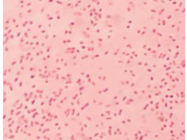
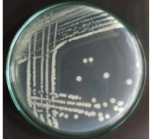
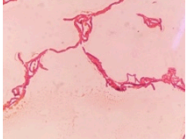

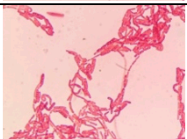
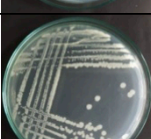
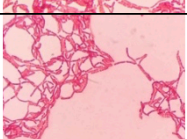
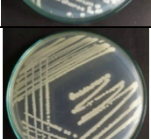
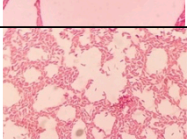
ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชายเลน ศูนย์วิจัยและ พัฒนาทรัพยากร ป่าชายเลน และ ป่าชายฝั่ง	VIMSH06	ได้รับความร้อน	Raised	Smooth (Entire)	White	+	Bacilli		
	VIMSH07		Raised	Wooly	White	-	Bacilli		
	VIMSH08		Flat	Smooth (Entire)	Yellow	-	Rod		
	VIMSH09		Flat	Smooth (Entire)	Cream	-	Rod		
	VIMSH10		Flat	Smooth (Entire)	Cream	-	Rod		


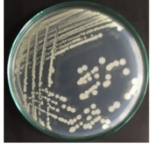
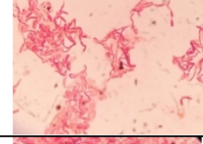

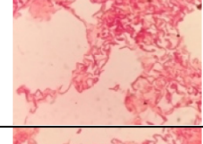


ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชายเลน ศูนย์วิจัยและ พัฒนาทรัพยากร ป่าชายเลน และ ป่าชายฝั่ง	VIMSH11	ได้รับความร้อน	Convex	Undulate (Wavy)	White	+	Rod		
	VIMSH12		Convex	Smooth (Entire)	Cream	-	Rod		
	VIMSH13		Flat	Wooly	White	+	Rod		
	VIMSH14		Convex	Smooth (Entire)	Cream	-	Bacilli		
	VIMSH15		Effuse	Smooth (Entire)	Cream	-	Rod		


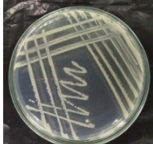

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชายเลน ศูนย์วิจัยและ พัฒนาทรัพยากร ป่าชายเลน และ ป่าชายฝั่ง	VIMST16	ไม่ได้รับความ ร้อน	Convex	Smooth (Entire)	Cream	-	Cocci		
	VIMST17		Convex	Smooth (Entire)	Cream	-	Bacilli		
	VIMST18		Flat	Undulate (Wavy)	Cream	-	Bacilli		
	VIMST19		Raised	Smooth (Entire)	White	-	Bacilli		
	VIMST20		Flat	Undulate (Wavy)	Yellow	-	Rod		

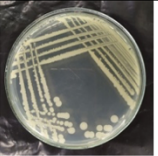
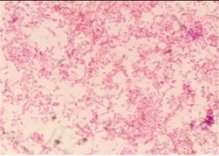
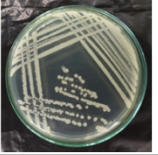
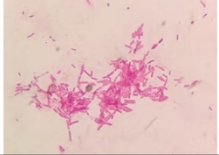
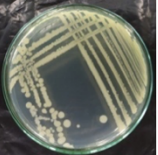
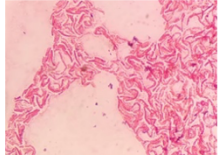
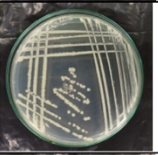
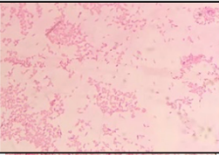
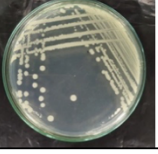
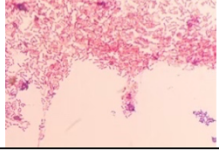
ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชายเลน ศูนย์วิจัยและ พัฒนาทรัพยากร ป่าชายเลน และ ป่าชายฝั่ง	VIMST21	ไม่ได้รับความ ร้อน	Flat	Wooly	White	-	Bacilli		
	VIMST22		Convex	Smooth (Entire)	Cream	-	Rod		
	VIMST23		Raised	Undulate (Wavy)	White	-	Bacilli		
	VIMST24		Raised	Undulate (Wavy)	Cream	-	Bacilli		
	VIMST25		Raised	Undulate (Wavy)	Cream	-	Bacilli		

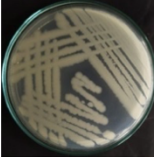
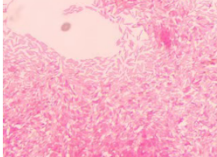
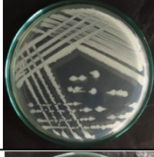
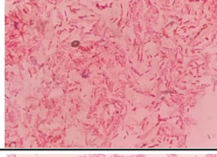
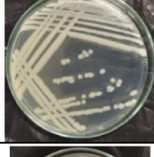
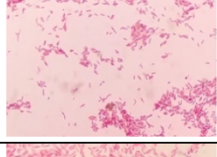
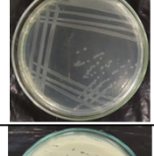
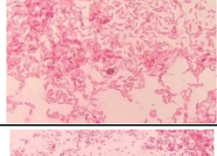

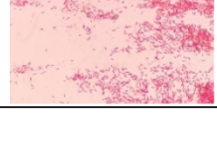
ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สถานะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชายเลน ศูนย์วิจัยและ พัฒนาทรัพยากร ป่าชายเลน และ ป่าชายฝั่ง	VIMST26	ไม่ได้รับความ ร้อน	Flat	Undulate (Wavy)	White	-	Bacilli		
	VIMST27		Flat	Wooly	White	-	Rod		
ดินจากป่าชายเลน อำเภอสีชล	SIMSH01	ได้รับความ ร้อน	Raised	Wooly	Cream	-	Rod		
	SIMSH02		Raised	Smooth (Entire)	Cream	-	Bacilli		
	SIMSH03		Umbonate	Undulate (Wavy)	White	-	Rod		

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชายเลน อำเภอสิชล	SIMSH04	ได้รับความร้อน	Raised	Smooth (Entire)	Cream	-	Rod		
	SIMSH05		Flat	Smooth (Entire)	Cream	+	Rod		
	SIMST06	ไม่ได้รับความ ร้อน	Raised	Smooth (Entire)	Cream	-	Bacilli		
	SIMST07		Flat	Smooth (Entire)	Cream	-	Rod		
	SIMST08		Raised	Smooth (Entire)	Cream	-	Rod		

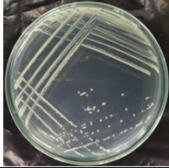
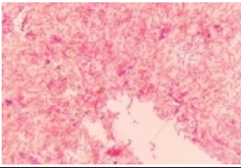

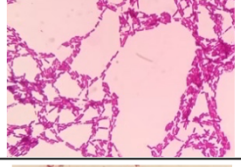
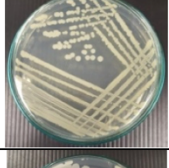
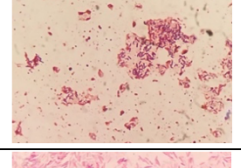
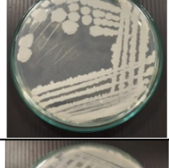
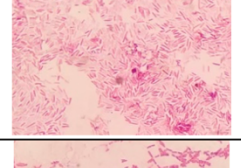
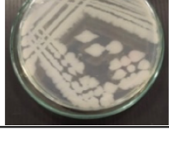

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชายเลน ท่าทอง	TMSH19	ได้รับความร้อน	Flat	Wooly	Cream	-	Rod		
	TMSH20		Flat	Wooly	Cream	+	Rod		
	TMSH21		Flat	Wooly	Cream	-	Rod		
	TMSH22		Effuse	Smooth (Entire)	Cream	+	Rod		
	TMSH23		Raised	Undulate (Wavy)	White	+	Rod		

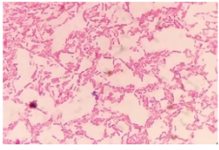
ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชาย เลนท่าทอง	TMSH24	ได้รับความ ร้อน	Flat	Undulate (Wavy)	White	+	Rod		
	TMSH25		Flat	Smooth (Entire)	White	+	Rod		
	TMSH26		Raised	Wooly	Cream	+	Rod		
	TMSH27		Umbonate	Smooth (Entire)	Yellow	-	Rod		
	TMSH28		Effuse	Smooth (Entire)	Cream	+	Bacilli		


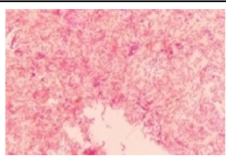

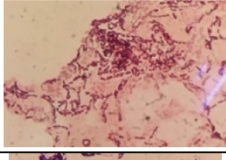
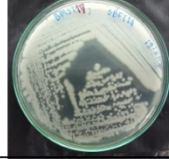
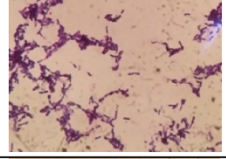

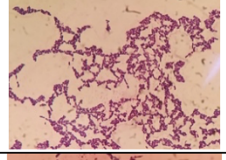
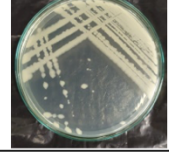

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชาย เลนท่าทอง	TMSH29	ได้รับความร้อน	Flat	Smooth (Entire)	Cream	+	Rod		
ดินจากป่าชาย เลนบางไผ่	BMSH06		Umbonate	Undulate (Wavy)	White	+	Rod		
	BMSH07		Raised	Smooth (Entire)	Cream	+	Rod		
	BMSH08		Umbonate	Undulate (Wavy)	White	+	Rod		
	BMSH09		Flat	Wooly	White	+	Rod		




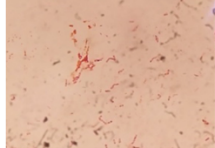

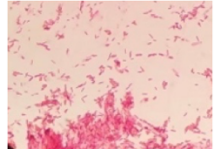
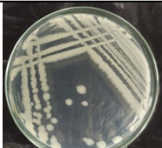
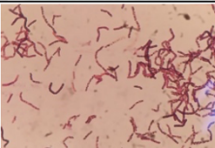

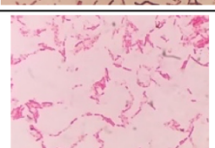
ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชาย เลนบางใบไม้	BMSH10	ได้รับความร้อน	Raised	Smooth (Entire)	White	+	Bacilli		
	BMSH11		Raised	Smooth (Entire)	Cream	-	Bacilli		
	BMST12	ไม่ได้รับความ ร้อน	Umbonate	Undulate (Wavy)	Cream	-	Rod		
	BMST13		Umbonate	Undulate (Wavy)	Cream	+	Rod		
	BMST14		Raised	Wooly	Cream	+	Rod		




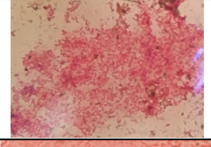

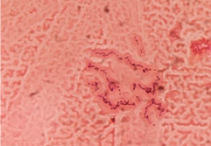

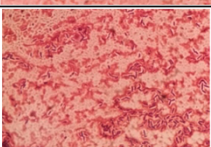

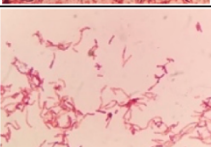
ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชาย เลนบางใบไม้	BMST15	ไม่ได้รับความ ร้อน	Umbonate	Undulate (Wavy)	White	-	Rod		
	BMST16		Raised	Undulate (Wavy)	White	+	Rod		
	BMST17		Flat	Wooly	White	+	Rod		
	BMST18		Flat	Wooly	White	+	Rod		
ดินจากป่าชาย เลนสีเล็ด	LEMSH 01	ได้รับความร้อน	Raised	Smooth	Cream	+	Bacilli		

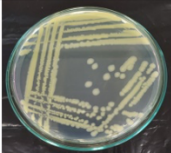
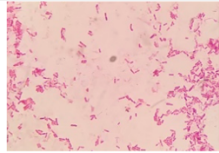

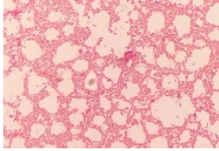
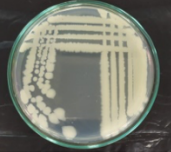
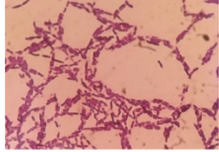

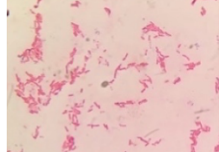


ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชาย เลนสีเขียว	LEMSH02	ได้รับความร้อน	Raised	Smooth	Yellow	-	Rod		
	LEMSH03		Raised	Smooth	Cream	-	Rod		
	LEMSH04		Flat	Lobate	White	-	Rod		
	LEMSH05		Raised	Undulate (Wavy)	Cream	+	Bacilli		
	LEMSH06		Raised	Undulate (Wavy)	Cream	-	Bacilli		

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชาย เลนสีเล็ด	LEMSH07	ได้รับความร้อน	Flat	Smooth (Entire)	Cream	+	Rod		
	LEMSH08		Raised	Smooth (Entire)	Cream	-	Rod		
	LEMSH09		Flat	Lobate	White	-	Rod		
	LEMSH10		Flat	Wavy	White	+	Rod		
	LEMSH11		Raised	Smooth (Entire)	Cream	-	Bacilli		

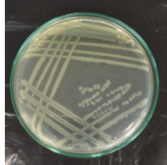


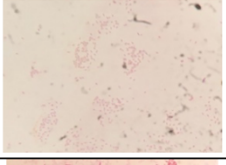
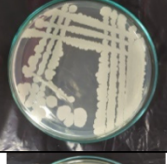
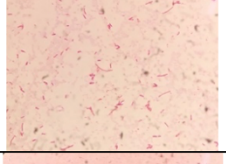
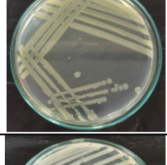
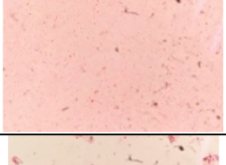


ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชาย เลนสีเสียด	LEMSH12	ได้รับความร้อน	Raised	Smooth (Entire)	Yellow	-	Rod		
	LEMSH13		Umbonate	Undulate (Wavy)	White	-	Rod		
	LEMSH14		Raised	Undulate (Wavy)	Cream	+	Bacilli		
	LEMSH15		Raised	Undulate (Wavy)	White	-	Bacilli		
	LEMSH16		Flat	Smooth (Entire)	Yellow	-	Rod		

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์
			การยก ตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชาย เลนสีเลือด	LEMSH17	ได้รับความร้อน	Flat	Smooth (Entire)	Yellow	-	Bacilli		
	LEMSH18		Effuse	Smooth (Entire)	White	+	Rod		
	LEMSH19		Flat	Smooth (Entire)	Cream	-	Cocci		
	LEMST20	ไม่ได้รับความ ร้อน	Effuse	Smooth (Entire)	Cream	+	Bacilli		

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชาย เลนสีเลือด	LEMST22	ไม่ได้รับความ ร้อน	Effuse	Smooth (Entire)	Cream	-	Cocci		
	LEMST23		Flat	Undulate (Wavy)	White	-	Cocci		
	LEMST24		Umbonate	Undulate (Wavy)	White	-	Rod		
	LEMST25		Effuse	Smooth (Entire)	Cream	-	Cocci		
	LEMST26		Flat	Lobate	Cream	-	Rod		

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชาย เลนสีเลือด	LEMST27	ไม่ได้รับความ ร้อน	Umbonate	Undulate (Wavy)	White	-	Rod		
	LEMST28		Raised	Smooth (Entire)	Yellow	+	Rod		
	LEMST29		Raised	Smooth (Entire)	Yellow	-	Rod		
	LEMST30		Umbonate	Undulate (Wavy)	White	-	Rod		
	LEMST31		Flat	Smooth (Entire)	Cream	-	Bacilli		

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

จุดเก็บตัวอย่าง	ไอโซเลต	สภาวะ	ลักษณะโคโลนี			การติดสีแกรม	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ภาพบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ	ภาพเซลล์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์
			การยกตัว	ขอบ	สี				
ดินจากป่าชาย เลนสีเลือด	LEMST32	ไม่ได้รับความ ร้อน	Flat	Undulate (Wavy)	Cream	-	Rod		
	LEMST33		Raised	Undulate (Wavy)	Yellow	-	Rod		
	LEMST34		Raised	Undulate (Wavy)	White	-	Rod		

ตารางภาคผนวกที่ 2 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากดิน
ป่าชายเลน

ไอโซเลต	การทดสอบทางชีวเคมี			
	คะตะเลส	ออกซิเดส	การย่อยแป้ง	การเคลื่อนที่
LMSH02	+	+	-	-
VIMSH11	-	+	-	-
TMSH20	-	+	-	+
TMSH22	-	-	-	-
TMSH24	+	-	-	+
TMSH25	-	+	+	+
TMSH26	+	-	-	-
TMSH29	-	+	-	-
BMSH07	+	+	-	+
BMSH08	+	+	-	+
BMSH09	+	-	+	-
BMSH10	+	+	+	+
BMST13	+	-	+	-
BMST16	-	+	+	-
LEMSH07	-	-	-	-
LEMSH18	+	-	+	-
LEMST20	+	-	+	+
LEMST28	+	+	-	-

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ + หมายถึง ผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นบวก

สัญลักษณ์ - หมายถึง ผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นลบ

ผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส คือ คะตะเลส การเคลื่อนที่ และการย่อยแป้ง ให้ผลเป็นบวก ส่วนการทดสอบออกซิเดส ให้ผลเป็นลบ

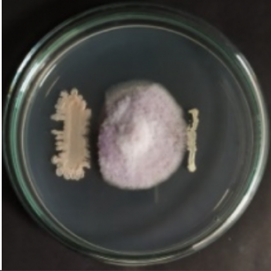

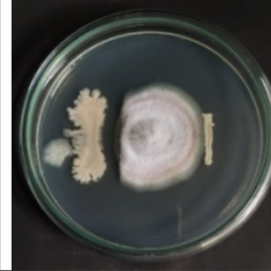
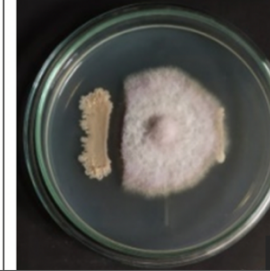
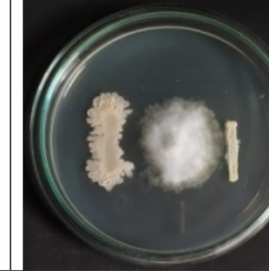
ตารางภาคผนวกที่ 3 ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต VIMSH06


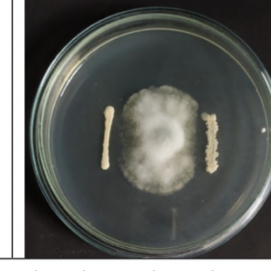
Rank	Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise Similarity (%)	Mismatch/ Total nt.
1	<i>Bacillus tequilensis</i>	KCTC 13622	Gatson et al. 2006	AYTO01000043	99.93	1/1470
2	<i>Bacillus cabrialesii</i>	TE3	de Los Santos Villalobos et al. 2019	MK462260	99.93	1/1470
3	<i>Bacillus inaquosorum</i>	KCTC 13429	(Rooney et al. 2009) Dunlap et al. 2020	AMXN01000021	99.93	1/1470
4	<i>Bacillus subtilis</i>	NCIB 3610	(Ehrenberg 1835) Cohn 1872	ABQL01000001	99.86	2/1470
5	<i>Bacillus stercoris</i>	JCM 30051	(Adelskov and Patel 2017) Dunlap et al. 2020	MN536904	99.80	3/1470
6	<i>Bacillus spizizenii</i>	NRRL B-23049	(Nakamura et al. 1999) Dunlap et al. 2020	CP002905	99.80	3/1470
7	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	Ruiz-Garcia et al. 2005	AY603658	99.71	4/1403
8	<i>Bacillus halotolerans</i>	ATCC 25096	(Delaporte and Sasson 1967) Tindall 2017	LPVF01000003	99.66	5/1470
9	<i>Bacillus mojavensis</i>	RO-H-1	Roberts et al. 1994	JH600280	99.59	6/1470
10	<i>Bacillus vallismortis</i>	DV1-F-3	Roberts et al. 1996	JH600273	99.59	6/1470
11	<i>Bacillus nakamurai</i>	NRRL B-41091	Dunlap et al. 2016	LSAZ01000028	99.59	6/1470
12	<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613	Sumpavapol et al. 2010	AJVF01000043	99.46	8/1470
13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DSM 7	(ex Fukumoto 1943) Priest et al. 1987	FN597644	99.32	10/1470
14	<i>Bacillus atrophaeus</i>	JCM 9070	Nakamura 1989	AB021181	99.25	11/1470
15	<i>Bacillus glycinifermentans</i>	GO-13	Kim et al. 2015	LECW01000063	98.77	18/1469

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ) ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต VIMSH06

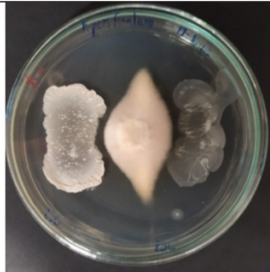
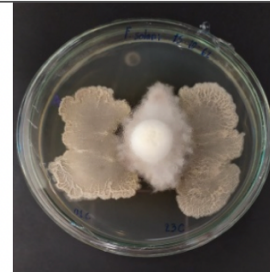
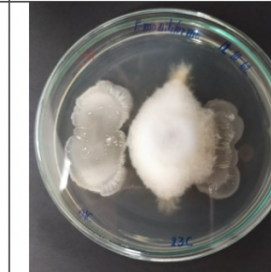
Rank	Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise Similarity (%)	Mismatch/ Total nt.
16	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	KJ-16	Dunlap et al. 2015	KY694465	98.71	19/1469
17	<i>Bacillus haynesii</i>	NRRL B-41327	Dunlap et al. 2017	MRBL01000076	98.43	23/1469
18	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	(Weigmann 1898) Chester 1901	AE017333	98.37	24/1469
19	<i>Bacillus sonorensis</i>	NBRC 101234	Palmisano et al. 2001	AYTN01000016	98.16	27/1469
20	<i>Bacillus swezeyi</i>	NRRL B-41294	Dunlap et al. 2017	MRBK01000096	98.16	27/1469
21	<i>Bacillus aerius</i>	24K	Shivaji et al. 2006	AJ831843	97.82	32/1467
22	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	Shivaji et al. 2006	ASJC01000029	97.14	42/1469
23	<i>Bacillus xiamenensis</i>	HYC-10	Lai et al. 2014	AMSH01000114	97.07	43/1469
24	<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>safensis</i>	FO-36b	Abril et al. 2019	ASJD01000027	96.94	45/1469
25	<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>osmophilus</i>	BC09	Abril et al. 2019	KY990920	96.93	45/1468
26	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061	Meyer and Gottheil 1901	ABRX01000007	96.87	46/1469
27	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	DW5-4	Liu et al. 2016	JOTP01000061	96.87	46/1469
28	<i>Bacillus australimaris</i>	NH7I_1	Liu et al. 2016	JX680098	96.80	47/1469
29	<i>Rosellomorea oryzaecorticis</i>	R1	(Hong et al. 2014) Gupta et al. 2020	KF548480	96.39	40/1107
30	<i>Bacillus salacetis</i>	SKP7-4	Daroonpunt et al. 2019	LC367333	96.35	52/1425

ตารางภาคผนวกที่ 4 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยวิธี Dual culture

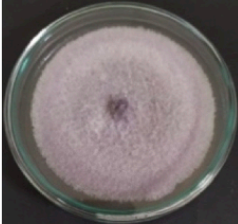






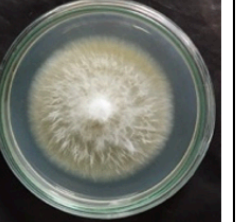

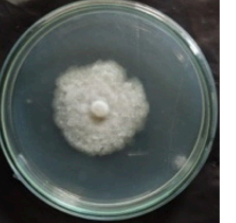








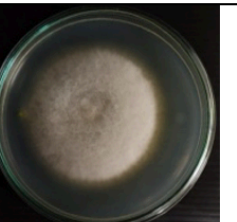

	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>C. gloeosporioedes</i>	<i>P. palmivora</i>
Dual culture					
Inhibition zone of VIMSH06 (Left) and VIMSH11 (Right)					

	<i>F. proliferatum</i>	<i>P. palmivora</i>
Dual culture		
Inhibition zone of VIMSH02 (Left) and (Right) VIMSH03		








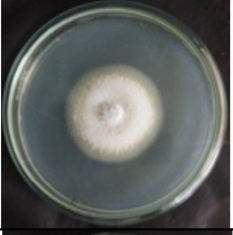


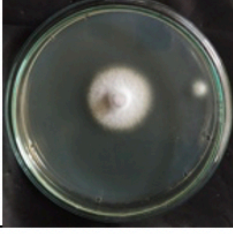



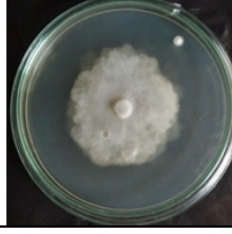
ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ) การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยวิธี Dual culture

	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. moniliforme</i>
Dual culture			
Inhibition zone of LMSH01 (Left) and TMSH10 (Right)			


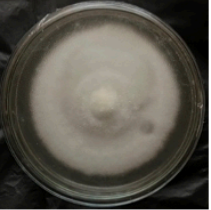
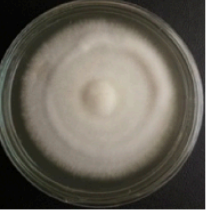

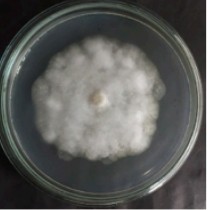
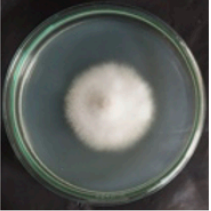


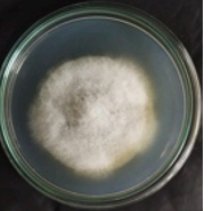


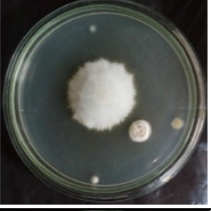





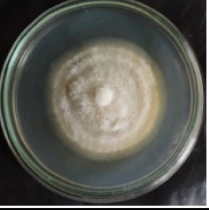
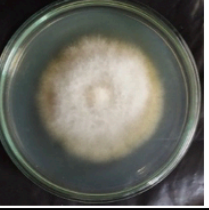

ตารางภาคผนวกที่ 5 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วย Culture filtrate

Culture filtrate	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>C. gloeosporioedes</i>	<i>P. palmivora</i>
Control					
VIMSH02					
VIMSH03					
VIMSH06					



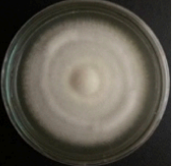




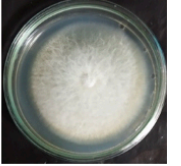
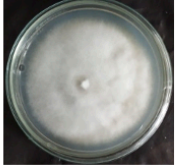
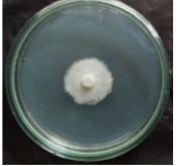



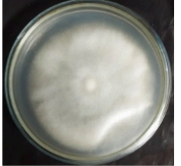
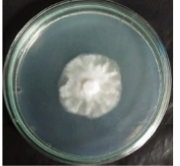

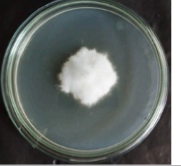





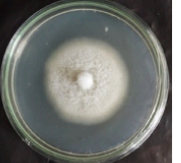


ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ) การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วย Culture filtrate

Culture filtrate	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>C. gloeosporioedes</i>	<i>P. palmivora</i>
VIMSH13					
LMSH01					
TMSH10					

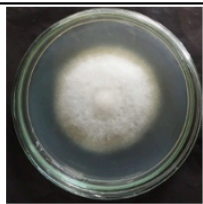


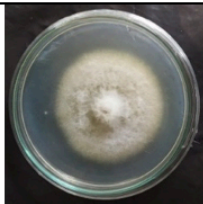

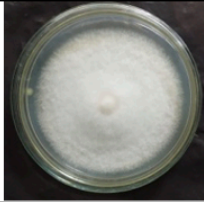

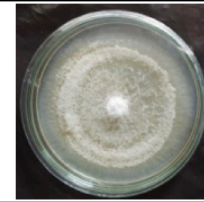
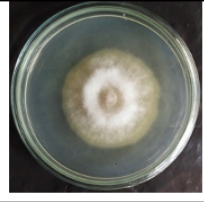
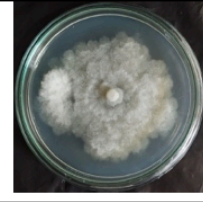
ตารางภาคผนวกที่ 6 การหาความเหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06

Optimal medium	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>C. gloeosporioedes</i>	<i>P. palmivora</i>
Control					
NB					
LB					
TSB					


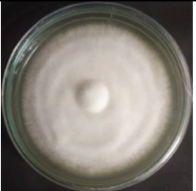
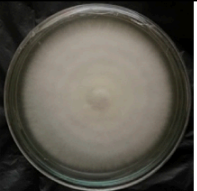

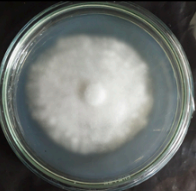







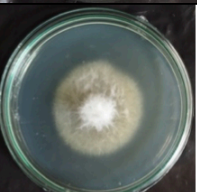
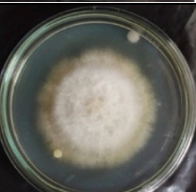






ตารางภาคผนวกที่ 7 การหาความเหมาะสมของความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต
VIMSH06

Optimal pH	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>C. gloeosporioedes</i>	<i>P. palmivora</i>
Control					
pH4					
pH5					
pH6					
pH7					

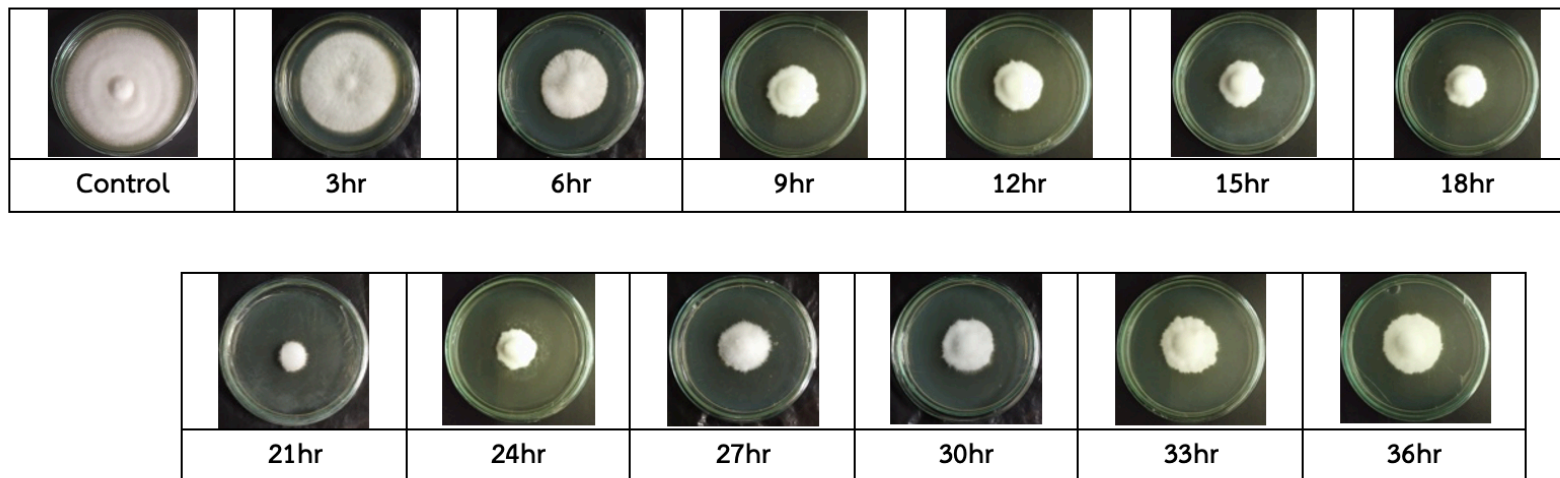
ตารางภาคผนวกที่ 7 (ต่อ) การหาความเหมาะสมของความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรีย
ไอโซเลต VIMSH06

Optimal pH	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>C. gloeosporioedes</i>	<i>P. palmivora</i>
pH8					
pH9					

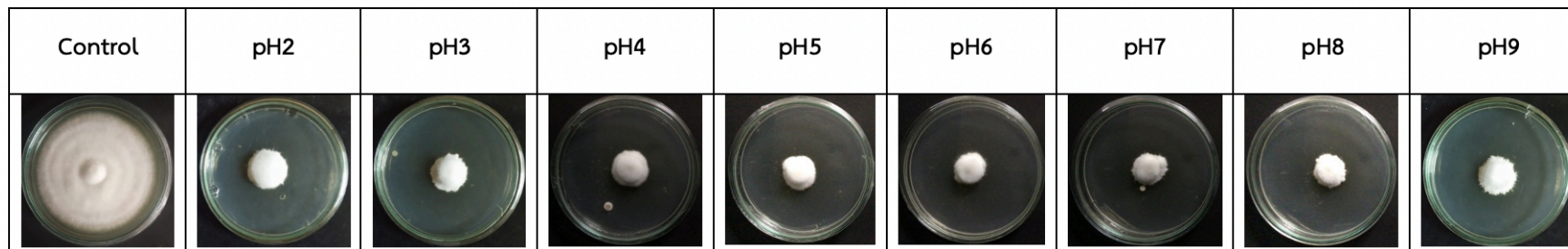
ตารางภาคผนวกที่ 8 การหาความเหมาะสมที่อุณหภูมิต่าง ๆ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06

Optimal temperature	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>C. gloeosporioedes</i>	<i>P. palmivora</i>
Control					
30°C					
37°C					
40°C					

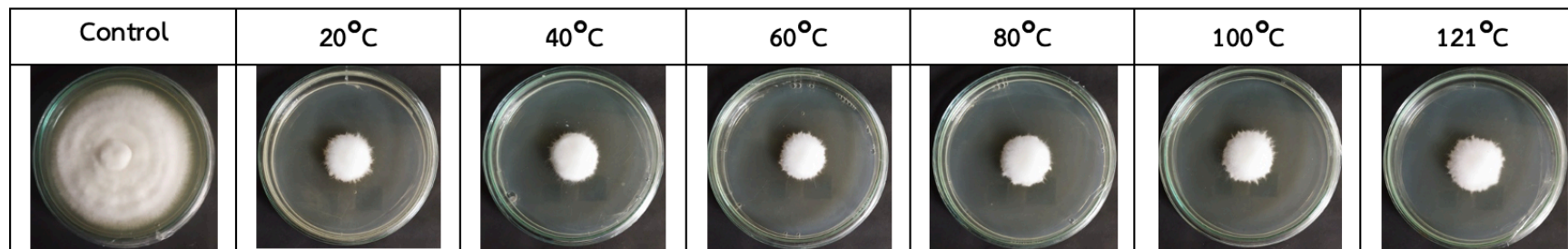
ตารางภาคผนวกที่ 9 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของแบคทีเรีย สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06







ตารางภาคผนวกที่ 10 การทดสอบความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-เบส ของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรีย
ไอโซเลต VIMSH06




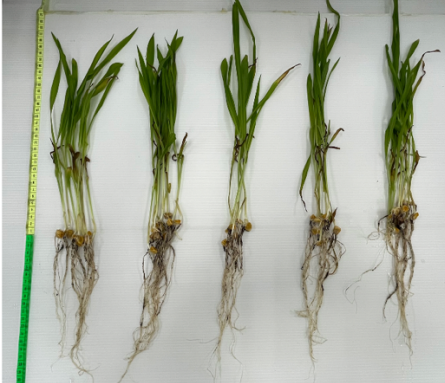
ตารางภาคผนวกที่ 11 การทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิ ของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06

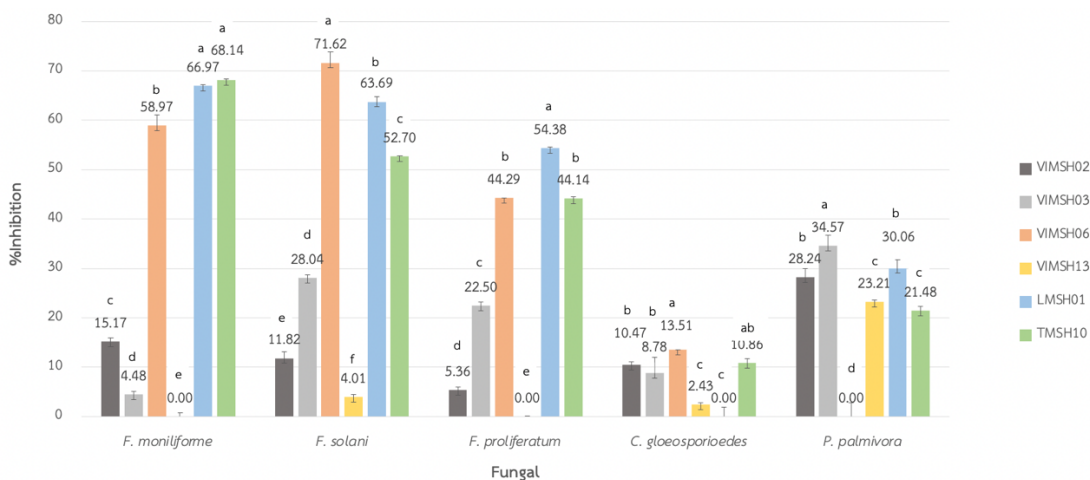


ตารางภาคผนวกที่ 12 การทดสอบการก่อโรคของรา *F. solani* ในข้าวโพด

ชุดการทดลอง	ภาพการทดลอง
ชุดที่ 1 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	
ชุดที่ 2 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับ สารแขวนลอยโคโคนีเดียของรา <i>F. solani</i>	
ชุดที่ 3 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับ สารแขวนลอยแบคทีเรีย	
ชุดที่ 4 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับ ส่วนใสปราศจากเซลล์แบคทีเรีย	

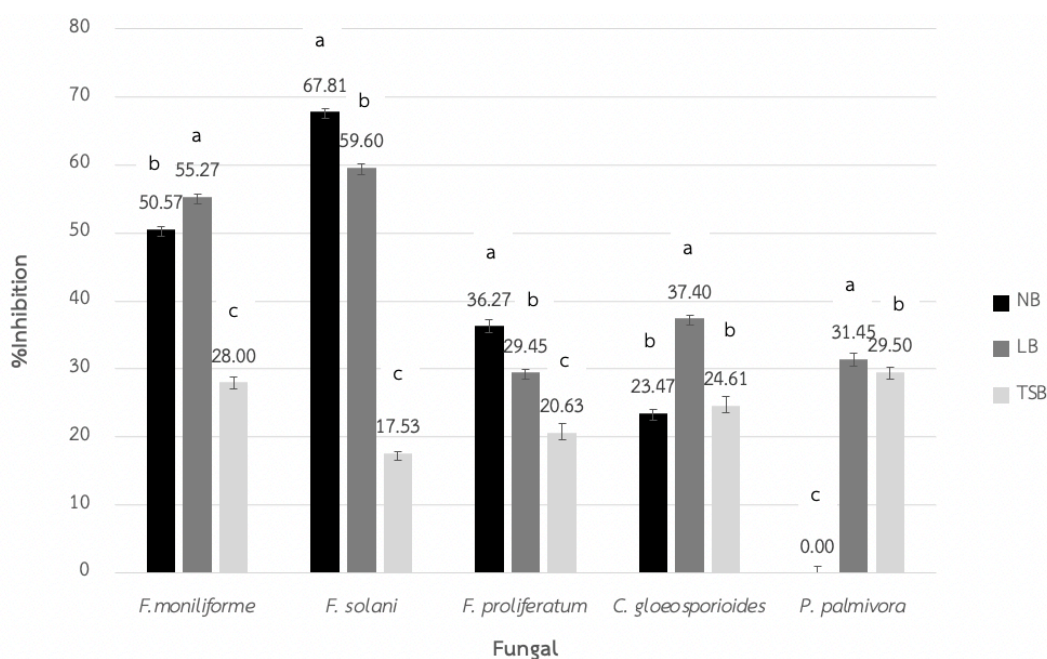
ตารางภาคผนวกที่ 12 (ต่อ) การทดสอบการก่อโรคของรา *F. solani* ในข้าวโพด

ชุดการทดลอง	ภาพการทดลอง
<p>ชุดที่ 5 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับโค นินเดียและสารแขวนลอยแบคทีเรีย</p>	
<p>ชุดที่ 6 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับโค นินเดียและส่วนใสปราศจากเซลล์ แบคทีเรีย</p>	
<p>ชุดที่ 7 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับเซลล์ แบคทีเรียและสารแขวนลอยโคนินเดีย ของรา <i>F. solani</i></p>	
<p>ชุดที่ 8 เมล็ดข้าวโพด แช่ร่วมกับส่วน ใสปราศจากเซลล์แบคทีเรีย และสาร แขวนลอยโคนินเดียของรา <i>F. solani</i></p>	



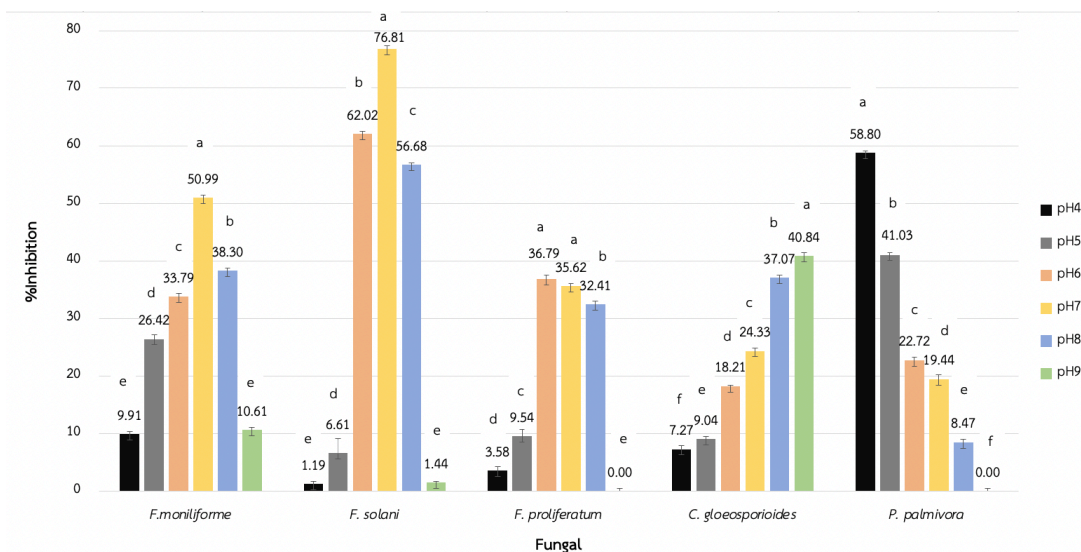
ภาพภาคผนวกที่ 1 การทดสอบความสามารถของการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยวิธี Culture filtrate

หมายเหตุ : ตัวอักษร abcdef ที่แตกต่างกันในแท่งกราฟแต่ละสีแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P < 0.05$) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm$ Standard Error



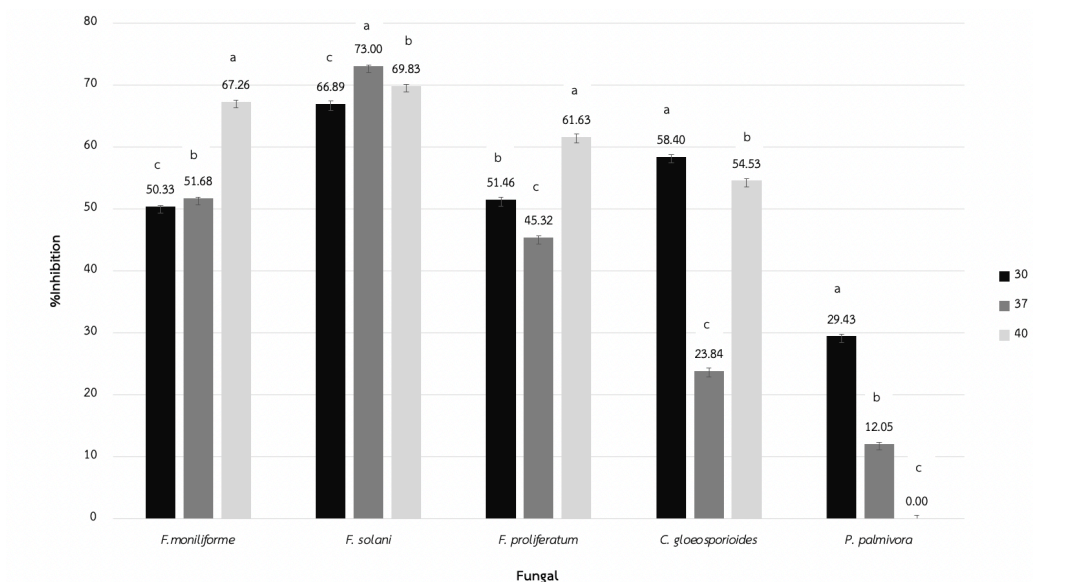
ภาพภาคผนวกที่ 2 การหาความเหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06

หมายเหตุ : ตัวอักษร abc ที่แตกต่างกันในแท่งกราฟแต่ละสีแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P < 0.05$) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm$ Standard Error



ภาพภาคผนวกที่ 3 การหาความเหมาะสมของความเป็นกรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06

หมายเหตุ : ตัวอักษร abcdef ที่แตกต่างกันในแท่งกราฟแต่ละสีแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P<0.05) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm \text{Standard Error}$



ภาพภาคผนวกที่ 4 การหาความเหมาะสมที่อุณหภูมิต่าง ๆ สำหรับการสร้างสารในการยับยั้งราก่อโรคพืชของแบคทีเรียไอโซเลต VIMSH06

หมายเหตุ : ตัวอักษร abc ที่แตกต่างกันในแท่งกราฟแต่ละสีแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P<0.05) ค่าที่แสดงในกราฟเป็น $\bar{X} \pm \text{Standard Error}$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาว สุฉัญญา ใหม่ทอง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6240320107

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
ปริญญาตรี	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2561
วิทยาศาสตรบัณฑิต	วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี	

ทุนการศึกษา

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2563

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ประจำปีงบประมาณ 2563 (เพิ่มเติม)

การตีพิมพ์เผยแพร่งาน

Maitong S, Permpoonpattana P and Sowanpreecha R. 2021. Optimal conditions of *Bacillus* sp. from mangrove soil against plant pathogenic fungi. *KHON KAEN AGRICULTURE JOURNAL*. 49 SUPPL. 1: 272-278.

Maitong S, Permpoonpattana P and Sowanpreecha R. 2020. Potentiality of *Bacillus* sp. derived from mangrove soil for controlling *Fusarium* spp. *KHON KAEN AGRICULTURE JOURNAL*. 48 SUPPL. 1: 337-344.