บทที่ 4

บทวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างดิน และการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดินตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ทำการเกษตรจำนวน 49 แปลง ที่ปลูกถั่วหรั่งและถั่วลิสง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้ 342 สายพันธุ์ ซึ่งในแต่ละพื้นที่สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ทุกแหล่ง ๆ ละหลายสายพันธุ์ โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มักพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และชนิด (spiecies) ที่นำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช ได้แก่ *B. subtilis* (ประไพศรี สมใจ และคณะ, 2540 ; สุมาลี เหลืองสกุล และคณะ, 2542 ; Schmiedknecht *et al*., 1989 ; Maten *et al*., 1999) *B. megaterium* (Kanjamaneesathian *et al*., 2000 ; Wiwattanapatapee *et al*., 2004) *B. firmus* (สุพจน์ กาเซ็ม และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2544) *B. cereus* และ *B. pumilus* (Gasoni *et al*., 1998) โดยไม่ก่อให้เกิดอันตราย หรือทำให้เกิดโรคต่อคน สัตว์ หรือพืช อีกทั้งยังผลิตสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้หลายชนิด (Mckeen *et al*., 1986 และ Boer and Diderichsen, 1991)

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากดิน ทั้งสิ้น 342 สายพันธุ์ มาทดสอบ พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 168 สายพันธุ์ ที่สามารถเจริญร่วมกับเชื้อไรโซเบียม NC-92 ได้ และเมื่อนำมาทดสอบโดยวิธี dual culture technique พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์บางสายพันธุ์มีความสามารถครอบครองพื้นที่ได้กับเชื้อรา ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บางสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยการสร้างสารปฏิปักษ์ โดยสังเกตเห็นวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อราและแบคทีเรียปฏิปักษ์ เนื่องจากการสร้างสารปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อรา เป็นสิ่งที่แสดงว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถทำลายเชื้อราอย่างแท้จริง เมื่อเทียบกับการแก่งแย่งพื้นที่ในการเจริญระหว่างเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเชื้อรา โดยทำการตัดเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* บริเวณปลายสุดของเส้นใยเชื้อราที่ได้รับสารปฏิปักษ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า ส่วนปลายสุดของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* มีลักษณะผิดปกติ และผนังเซลล์ของเส้นใยบวมและมีผนังหนาขึ้น มีลักษณะคล้ายถุง ในขณะที่เส้นใยปกติจะเรียบไม่แสดงอาการบวม เช่นเดียวกับการทดลองของสุมาลี เหลืองสกุล และคณะ (2542) ที่พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ NE1 และ NE2 สามารถสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืช ทำให้ปลายเส้นใย

ของเชื้อราที่สัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ แสดงอาการผิดปกติ และไม่สามารถก่อโรคในพืชได้ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 16 สายพันธุ์ ที่มีเส้นรัศมีวงใสมากกว่าหรือเท่ากับ 7 มิลลิเมตร มาทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารปฏิปักษ์ และเมื่อนำสารปฏิปักษ์ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที พบว่าสารปฏิปักษ์ยังมีศักยภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* แสดงว่าสารปฏิปักษ์ที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 16 สายพันธุ์ ผลิตได้เป็นสารที่ทนความร้อนสูงได้ โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ TRV 9-5-2 สามารถผลิตสารปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* ได้ดีที่สุด ซึ่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์นี้ แยกได้จากดินปลูกถั่วหรั่งในพื้นที่ อ. เมือง จ. ตรัง และจากพื้นที่ดังกล่าวสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ถึง 9 สายพันธุ์ จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมด 16 สายพันธุ์ (ตารางที่ 7) โดยใน อ. เมือง จ. ตรัง ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกถั่วหรั่งของเกษตรกรจำนวน 16 แปลง ซึ่งทุกแปลงเป็นพื้นที่เปิดใหม่และปลูกถั่วหรั่งแซมพืชชนิดอื่น รวมทั้งมีการดูแลรักษาแปลงเป็นอย่างดี ต้นถั่วหรั่งมีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตดี พบอาการโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งน้อยกว่าแปลงปลูกถั่วจากพื้นที่อื่น ๆ มาก จึงสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพจากพื้นที่ อ. เมือง จ. ตรัง จำนวนมากกว่าพื้นที่ปลูกอื่น ๆ และแปลงที่คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ TRV 9-5-2 ได้นั้น ไม่พบการเกิดโรคใบไหม้เลย ขณะที่การปลูกถั่วหรั่งใน อ. รัตภูมิ จ. สงขลา เกษตรกรได้ทำการปลูกถั่วหรั่งต่อเนื่องกันหลายฤดูปลูก ขาดการดูแลรักษาแปลง และพบอาการโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งมาก ทำให้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพได้น้อย และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ TRV 9-5-2 ไปจำแนกชนิด โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้เป็นรายงานแรกที่นำเชื้อ *B. firmus* มาควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง แต่มีการนำเชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ KPS44 และ KPS46 ไปใช้ควบคุมโรคใบจุดนูนแบคทีเรียแอนแทรคโนส และใบจุดของถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพทัดเทียมสารเคมี (สุพจน์ กาเซ็ม และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2544) จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ดี เมื่ออยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีธาตุอาหารสมบูรณ์ ดังนั้น การจะใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพอใจในสภาพธรรมชาติ จึงควรศึกษาถึงการผลิตสูตรตำรับ ซึ่งมีแหล่งพลังงานที่เหมาะสมเป็นส่วนประกอบ และมีสารอื่น ๆ ที่ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการควบคุมโรคของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น สารช่วยในการแตกตัว และสารยึดเกาะ เพื่อให้แบคทีเรียปฏิปักษ์มีความคง

ตัว สามารถผลิตสารปฏิปักษ์ได้ดี และสามารถควบคุมการเกิดโรคได้เช่นเดียวกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ

3. การเตรียมและการพัฒนาสูตรตำรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

3.1 สูตรตำรับคลุกเมล็ด

จากการเตรียมและพัฒนาสูตรตำรับคลุกเมล็ด โดยผสมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และสารประกอบต่าง ๆ ในสูตรตำรับ คือ ทัลคัม และสารยึดเกาะ คือ SCMC หรือ PVP (k-30) พบว่า สูตรตำรับที่ 1 และ 3 ซึ่งประกอบด้วยสารยึดเกาะ 1 กรัม มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรตำรับสูงกว่าสูตรตำรับที่ 2 และ 4 ซึ่งมีสารยึดเกาะ 3 กรัม ทั้งที่ผสมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในปริมาณที่เท่ากัน อาจเนื่องจากการใช้สารยึดเกาะปริมาณ 3 กรัม เป็นอัตราส่วนที่สูงเกินไปไม่เหมาะสมต่อการเตรียมสูตรตำรับคลุกเมล็ด ซึ่งสูตรตำรับที่ได้จับตัวกันเป็นก้อนใหญ่ อาจทำให้การผสมไม่ทั่วถึง และยากต่อการบดให้เป็นผงละเอียด และมีส่วนผสมของสูตรตำรับบางส่วนติดอยู่กับอุปกรณ์ในการเตรียมสูตรตำรับ จึงทำให้มีการสูญเสียสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ระหว่างการเตรียมสูตรตำรับมากกว่าสูตรตำรับที่ใช้สารยึดเกาะ 1 กรัม และสูตรตำรับที่ 1 และ 2 ซึ่งมี SCMC เป็นสารยึดเกาะมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* สูงกว่าสูตรตำรับที่ 3 และ 4 ซึ่งมี PVP (k-30) เป็นสารยึดเกาะ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก SCMC เป็นสารยึดเกาะที่เหมาะสมต่อการผลิตเป็นสูตรตำรับคลุกเมล็ดเมื่อผสมกับทัลคัม ทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งได้มากกว่าการใช้ PVP (k-30) เป็นสารยึดเกาะ และจากการทดลองพบว่า สูตรตำรับที่ 1 (ทัลคัม 99 กรัม:SCMC 1 กรัม) ซึ่งมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว ไม่จับตัวกันเป็นก้อนแข็ง เกาะติดเมล็ดถั่วหรั่งได้ดี เมื่อคลุกเมล็ดที่เปียกน้ำ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. solani* สูงสุด (97.4 เปอร์เซ็นต์) มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่รอดในสูตรตำรับสูงสุด ($2.8 \pm 0.5 \times 10^{10}$ cfu/กรัม) และไม่มีผลยับยั้งการงอกหรือการเจริญของต้นกล้าถั่วหรั่ง การคลุกเมล็ดถั่วหรั่งด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ดทำให้เกิดเมล็ดดูดน้ำสูง และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม แต่การใช้สูตรตำรับคลุกเมล็ดทำให้เกิดต้นกล้าผิดปกติต่ำ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม เนื่องจากในสูตรตำรับคลุกเมล็ดมีสารประกอบส่วนใหญ่เป็นผงทัลคัม และทัลคัมมีคุณสมบัติในการดูดน้ำหรือความชื้นได้สูง ทำให้เมล็ดที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับต้องการน้ำในการงอกมากกว่าชุดควบคุม ทั้งที่เมล็ดดูดน้ำเมื่องอกออกมาก็จะได้ต้นกล้าที่ผิดปกติเช่นกัน ผงทัลคัมเป็นสารประกอบที่เหมาะสมต่อการอยู่รอดและการออกฤทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และมีรายงานการใช้ผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีทัลคัมเป็นส่วนประกอบ ซึ่งสามารถควบคุมโรคในข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ (นลินี จาริกภากร และคณะ, 2537 ; Nandakumar *et al*, 2001; Commare *et al*, 2002) ดังนั้นจึงคัด

เลือกสูตรตำรับคลุกเมล็ดสูตรที่ 1 เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรตำรับในการควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งในสภาพเรือนทดลองต่อไป

3.2 สูตรตำรับฉีดพ่น

การเตรียมและพัฒนาสูตรตำรับฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยผสมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ alginate PVP (k-30) และ lactose ในอัตราส่วนต่าง ๆ หลังจากประเมินผลสูตรตำรับ พบว่า สูตรตำรับที่ 1 ซึ่งมีลักษณะเป็นแกรนูล สีครีมอ่อน ไม่จับตัวเป็นก้อนแข็ง ละลายน้ำได้ดี มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอดในสูตรตำรับสูงสุด คือ 1.0 X 10^9 cfu/ กรัม และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* สูงสุด (92.6 เปอร์เซ็นต์) เมื่อทดสอบการติดใบและก้านใบของถั่วหรั่ง พบว่า สูตรตำรับที่ 1 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอดบนใบ และก้านใบสูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากสูตรตำรับที่ 1 มีสารยึดเกาะเป็นส่วนประกอบมากกว่าสูตรตำรับอื่น ๆ คือ alginate 10 กรัม และ PVP (k-30) 10 กรัม ทำให้สูตรตำรับที่ 1 ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มีความหนืดมากที่สุด (13.17 เปอร์เซ็นต์) ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ติดบนใบและก้านใบถั่วหรั่งได้นาน โดยหลังจากฉีดพ่นนาน 7 วัน ยังมีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่รอดบนใบและก้านใบถึง 2.2 $\pm$ 0.5 X 10^6 และ 3.3 $\pm$ 0.6 X 10^5 cfu/กรัมพืช ตามลำดับ และนอกจากนี้ alginate และ PVP (k-30) เป็นสารที่ช่วยในการแตกตัวเมื่อผสมกับน้ำทำให้สูตรตำรับที่ 1 ละลายน้ำได้ดีไม่เป็นอุปสรรคต่อการฉีดพ่น สำหรับการควบคุมโรคพืชโดยการฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน และเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับให้เกษตรกรนำไปใช้ควบคุมโรคพืชแทนสารเคมีได้ อาทิเช่น จากการทดลองของ พากเพียร อรัญนารถ และคณะ (2544) พบว่า การฉีดพ่นสารละลายชีวภัณฑ์ *B. subtilis* 4 ชนิด คือ TRF สูตร A สูตร B Larminar wp. และ Agroguard Liq. มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ดีกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ ทั้งในสภาพเรือนทดสอบและแปลงนาทดลอง ในฤดูนาปีและนาปรัง ดังนั้นจึงคัดเลือกสูตรตำรับฉีดพ่นสูตรที่ 1 เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง ในสภาพเรือนทดลองต่อไป

4. การตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรตำรับคลุกเมล็ดและสูตรตำรับฉีดพ่น ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

จากการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 ในรูปแบบคลุกเมล็ดและฉีดพ่น ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสูตรตำรับคลุกเมล็ดทั้ง 4 สูตร มีอัตราการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่ำ โดยเริ่มต้นผลิตมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่ในช่วง 10^8-10^{10} cfu/กรัม เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 6 เดือน พบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอดสูง คือ ประมาณ

10^8 cfu/กรัม โดยสูตรตำรับคลุกเมล็ดที่ 1 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงสุด ($1.7 \pm 0.5 \times 10^8$ cfu/กรัม) ส่วนสูตรตำรับฉีดพ่นทั้ง 4 สูตร มีอัตราการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่ำมาก โดยเริ่มต้นผลิตมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่ในช่วง 10^8-10^9 cfu/กรัม เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 6 เดือน พบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอด 10^8 cfu/กรัม (ภาคผนวก ง ตารางที่ 2-18) ทั้งนี้การที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรตำรับทั้ง 2 รูปแบบ มีอัตราการลดลงต่ำ เนื่องจากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปสปอร์ มาผลิตเป็นสูตรตำรับ ทำให้สูตรตำรับมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่รอดสูง และมีความคงตัวมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wiwattanapatapee และคณะ (2004) พบว่า สูตรตำรับในรูปสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอดสูง หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน ขณะที่การใช้เซลล์สดและสปอร์ ทำให้ได้สูตรตำรับที่มีความคงตัวต่ำ และปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรตำรับลดลง (Kanjanamaneesathian *et al*., 2000) แสดงว่าการเตรียมสูตรตำรับในรูปสปอร์ทำให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอดสูงและมีความคงตัวมากกว่าการเตรียมสูตรตำรับในรูปเซลล์สด และจากการทดลองจะเห็นได้ว่าสูตรตำรับฉีดพ่นจะมีความคงตัวและอัตราการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มากกว่าสูตรตำรับคลุกเมล็ด อาจเนื่องจากสูตรตำรับฉีดพ่นซึ่งอยู่ในรูปแกรนูล เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถจับอยู่ได้ทั้งที่ผิวภายนอกและภายในแกรนูล และการที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่ภายในแกรนูลจะช่วยป้องกันมิให้ถูกรบกวนจากสภาพแวดล้อมภายนอกได้ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จึงมีความคงตัวและมีอัตราการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์น้อยกว่าสูตรตำรับคลุกเมล็ดซึ่งมีลักษณะเป็นผงละเอียด อย่างไรก็ตามจากการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรตำรับคลุกเมล็ดและฉีดพ่น ไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ ในสูตรตำรับทั้ง 2 รูปแบบ

5. การทดสอบประสิทธิภาพของการควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งของสูตรตำรับของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในสภาพเรือนทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพสูตรตำรับคลุกเมล็ดและฉีดพ่นของเชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง และทุกกรรมวิธีได้คลุกเมล็ดถั่วหรั่งด้วยเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 ทำการปลูกถั่วหรั่งในดินชุดวิสัย ซึ่งเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ โดยมีอินทรียวัตถุ 11.44 กรัม/กิโลกรัม ไนโตรเจนทั้งหมด 0.192 กรัม/กิโลกรัม ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 2.57 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ (ภาคผนวก ข ตารางที่ 1-3) แต่ถั่วหรั่งสามารถเจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากถั่วหรั่งเป็นพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี ถึงแม้อยู่ในสภาพที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำเมื่อเทียบกับถั่วชนิดอื่น เช่น ในถั่วเขียว หากผลการวิเคราะห์ดินพบว่า มีอินทรียวัตถุต่ำกว่า 15.0 กรัม/กิโลกรัม ต้องใส่ปุ๋ยไนโตรเจนอัตรา 6 กิโลกรัม/

ไร่ และมีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่ำกว่า 8.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ต้องใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสในรูป P_2O_5 อัตรา 6-9 กิโลกรัม/ไร่ (สุทิน คล้ายมนต์, 2535) เพื่อเพิ่มผลผลิตถั่วเขียวได้ แต่อย่างไรก็ตามปัญหาการเข้าทำลายของโรคใบไหม้ ทำให้การเจริญเติบโตของถั่วหรั่งลดลงได้ ซึ่งจากผลการทดลอง แม้ว่าทำการตรวจสอบหลังจากใส่เชื้อราสาเหตุเพียง 7 วัน พบว่า ชุดควบคุมถั่วหรั่งมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบปกติ (80.33 เปอร์เซ็นต์) ก้านใบปกติ (51.04 เปอร์เซ็นต์) น้ำหนักแห้ง (3.73 กรัม/กระถาง) และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (0.15 กรัม/กระถาง) ต่ำกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ มาก และการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถควบคุมโรคได้ดีเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

กรรมวิธีที่คลุกเมล็ดถั่วหรั่งด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ด และแช่เมล็ดในสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนปลูก พบว่าสามารถควบคุมโรคได้ดี โดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบ และก้านใบปกติสูง แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และถั่วหรั่งมีการเจริญเติบโตดี มีน้ำหนักแห้งและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูง ทั้งที่ใส่เชื้อรา *R. solani* ในช่วงที่ถั่วหรั่งกำลังแตกกอ อาจเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ช่วยส่งเสริมการทำงานของเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 ทำให้ถั่วหรั่งเจริญเติบโตดี ผนังเซลล์พืชแข็งแรงขึ้น จึงช่วยต้านทานการเข้าทำลายของโรคได้ และมีรายงานการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ร่วมกับเชื้อไรโซเบียมช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ (Peterson et al., 1996 ; Srinivasan et al., 1997) การคลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ด ถั่วหรั่งมีการเจริญเติบโตดีกว่าการแช่เมล็ดในสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 4.68 กรัม/กระถาง และแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรตำรับฉีดพ่น หลังจากใส่เชื้อรา *R. solani* ก่อน 2 วัน สามารถควบคุมโรคได้ดีกว่าการฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบปกติและก้านใบปกติสูงกว่า และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม เนื่องจากสูตรตำรับฉีดพ่นมีสารยึดเกาะเป็นส่วนประกอบ ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถติดอยู่บนใบและก้านใบได้นาน ซึ่งจากการทดสอบการติดใบและความสามารถในการอยู่รอดบนต้นถั่วหรั่งของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรตำรับฉีดพ่น พบว่าหลังจากฉีดพ่นเป็นเวลา 7 วัน มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอดบนใบและก้านใบสูง (ตารางที่ 16) ส่วนการฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ซึ่งไม่มีสารยึดเกาะเป็นส่วนประกอบ เมื่อรดน้ำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อาจหลุดไปกับน้ำ ทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคต่ำลง และการฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคต่ำกว่าการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 อาจช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วหรั่ง ทำให้ต้านทานการเข้าทำลายของโรคได้ และกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรตำรับฉีดพ่นสามารถควบคุมโรคได้ไม่แตกต่างจากการฉีดพ่นด้วยสารฆ่าเชื้อรา iprodione แสดงว่า

สูตรตำรับฉีดพ่นสามารถนำส่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปยังบริเวณเป้าหมาย และสารประกอบในสูตรตำรับอาจช่วยส่งเสริมให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถออกฤทธิ์ควบคุมเชื้อรา *R. solani* เชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งได้ดีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี เช่นเดียวกับการทดลองของ Commare และคณะ (2002) พบว่าการใช้ผลิตภัณฑ์ชนิดผงแห้งของเชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* สายพันธุ์ pf1 และ pf7 ผสมกับ chitin สามารถลดความรุนแรงของโรคได้เท่ากับการใช้สาร carbendazim และ chlorpyriphos และจากการศึกษาของ Arunyanart และคณะ (2001) พบว่าการใช้ผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สูตร TRF A และ B สามารถควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ดีรองจากการใช้สารเคมี validacin และมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม

กรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่นด้วยสูตรตำรับ และการคลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ความสามารถในการควบคุมโรค และการเจริญเติบโตของถั่วหรั่ง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่กรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่นด้วยสูตรตำรับมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบปกติ (90.17 เปอร์เซ็นต์) ก้านใบปกติ (93.69 เปอร์เซ็นต์) และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (20 กรัม/กระถาง) สูงกว่า และไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่นด้วยสารฆ่าเชื้อรา iprodione และกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่นด้วยสารฆ่าเชื้อรา iprodione มีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน (3.78 เปอร์เซ็นต์) ต่ำที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากถั่วหรั่งมีการเจริญเติบโตดี มีน้ำหนักแห้งสูง (5.36 กรัม/กระถาง) ธาตุไนโตรเจนจึงถูกนำไปใช้ในกระบวนต่าง ๆ และกระจายอยู่ทั่วทั้งต้น ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนต่ำ

กรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่นด้วยสูตรตำรับฉีดพ่น มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *R. solani* และมีแนวโน้มส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วหรั่ง เช่นเดียวกับการทดลองของ Maten และคณะ (1999) รายงานว่าผลิตภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ B2g นอกจากจะสามารถทำลายเชื้อรา *R. solani* และ *F. oxysporum* ได้ผลดีแล้ว ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของทานตะวัน กะหล่ำปลี และแตงกวาได้อีกด้วย ดังนั้นการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งจะมีประสิทธิภาพมากขึ้น เมื่อใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปสูตรตำรับคลุกเมล็ดก่อนปลูกเพื่อป้องกันการเกิดโรคโดยเชื้อสาเหตุในดินก่อนที่ต้นถั่วหรั่งจะงอกและเจริญเติบโต ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยสูตรตำรับฉีดพ่น เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง หลังจากต้นถั่วหรั่งเจริญเติบโต และแตกกอแล้ว

จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า การนำสูตรตำรับแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปแบบคลุกเมล็ด และฉีดพ่น มาใช้ร่วมกันจะช่วยให้การควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งมีประสิทธิภาพสูงขึ้น และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มผลผลิตให้กับถั่วหรั่งได้ ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปควร

ทำการศึกษาในสภาพไร่นา เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคของสูตรตำรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสภาพธรรมชาติ ศึกษาความคงตัวและปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรตำรับที่เก็บไว้ในเวลาที่นานขึ้น เช่น 1-2 ปี รวมทั้งศึกษาชนิดวัตถุดิบทางเกษตร วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรืออุตสาหกรรมเกษตร เพื่อใช้ทดแทนอาหารสำหรับการผลิตสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต และเป็นแนวทางในการผลิตสูตรตำรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในเชิงการค้าต่อไป