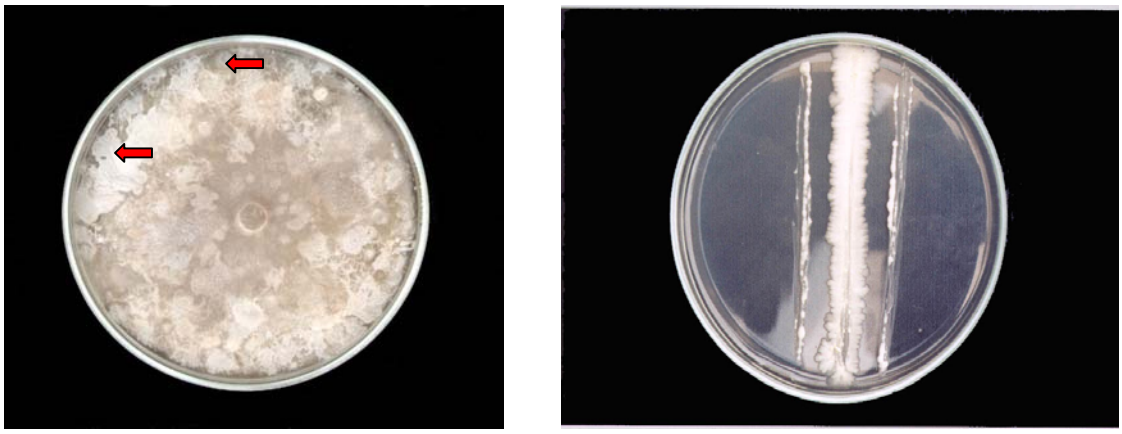
บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดิน และการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดินตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างดินเกษตรกรรมที่ปลูกถั่วหรั่งและถั่วลิสง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *R. solani* เชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ในถั่วหรั่ง (ภาพที่ 3 ก) ได้ทั้งหมด 342 สายพันธุ์ (ตารางที่ 5)



ก ข

ภาพที่ 3 ก. โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (ศรชี้) ที่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ภายหลังจากบ่มเชื้อนาน 4 วัน ในอาหาร GSM medium
ข. การเจริญร่วมกันของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.(เส้นกลาง) กับเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 (เส้นขนาบข้าง) บนอาหาร PDA เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

2.1 ทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. กับเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92

จากจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากดินเกษตรกรรม ทั้งหมด 342 สายพันธุ์ พบว่า มีเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 168 สายพันธุ์ ที่สามารถเจริญร่วมกันกับเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 ได้ โดยไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 หรือถูกยับยั้งโดยเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 (ภาพที่ 3 ข) (ภาคผนวก ข ตารางที่ 1-2)

ตารางที่ 5 จำนวนสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ที่แยกได้จากดินเกษตรกรรมแหล่งต่าง ๆ

แหล่งดินเกษตรกรรม	ชนิดพืชปลูก	รหัสแปลง (จำนวนแปลง)	จำนวนสายพันธุ์
อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	ถั่วหรั่ง	HYV (5)	27
	ถั่วลิสง	HYA (1)	10
อ. รัตภูมิ จ. สงขลา	ถั่วหรั่ง	RPV (12)	121
อ. จะนะ จ.สงขลา	ถั่วลิสง	JNA (1)	12
อ. นาทวี จ. สงขลา	ถั่วลิสง	NTA (1)	6
อ. ตะโหมด จ. พัทลุง	ถั่วหรั่ง	TMV (6)	20
อ. เมือง จ. ตรัง	ถั่วหรั่ง	TRV (16)	98
อ.ทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช	ถั่วลิสง	TSA (1)	9
อ. ยะหา จ. ยะลา	ถั่วลิสง	YHA (4)	32
อ. รือเสาะ จ.นราธิวาส	ถั่วลิสง	RSA (2)	7
รวมทั้งสิ้น		49	342

2.2 ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani*

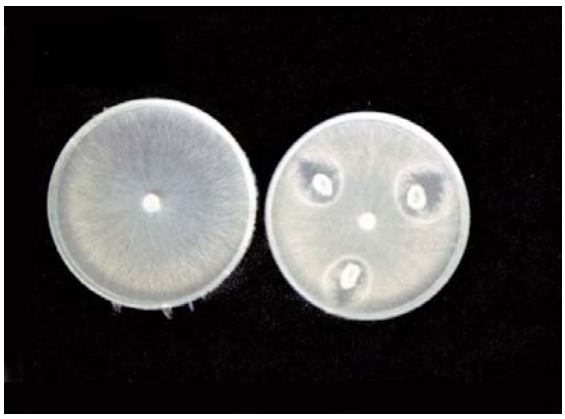
เมื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 16 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* และมีเส้นรัศมีวงใสมากกว่า 7.0 มิลลิเมตร โดยสายพันธุ์ TRV 5-3-2 TRV 9-5-2 TRV 13-3-4 และ TRV 13-3-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด คือ มีเส้นรัศมีวงใส เท่ากับ 9.3 มิลลิเมตร และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 6) (ภาพที่ 4 ก) และจากการนำสายเชื้อรา *R. solani* บริเวณที่ถูกยับยั้งโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา สังเกตพบการเปลี่ยนแปลงบริเวณส่วนปลายของสายรา (hyphal tip) อย่างชัดเจน คือ มีลักษณะสั้น งอ โป่งพอง ผนังสายราหนาขึ้น บางเซลล์มีลักษณะคล้ายถุง (ภาพที่ 4 ข และ ค)

ตารางที่ 6 เส้นรัศมีวงใสของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ที่ถูกยับยั้งโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

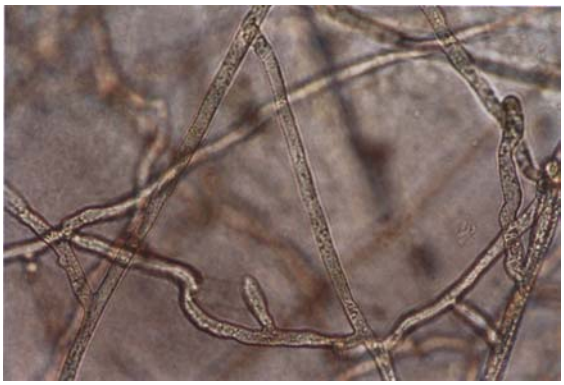
สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.	เส้นรัศมีวงใส (มม.)
HYV 3-4-1	8.3 a
RPV 2-4-1	8.3 a
RPV 8-1-1	7.7 a
RPV 8-1-2	7.3 a
RPV 8-3-1	7.7 a
TMV 2-1-3	7.3 a
TMV 2-3-1	8.7 a
TRV 4-3-2	7.3 a
TRV 5-3-2	9.3 a
TRV 6-4-6	8.3 a
TRV 9-5-2	9.3 a
TRV 10-1-3	7.7 a
TRV 13-3-2	8.3 a
TRV 13-3-3	7.3 a
TRV 13-3-4	9.3 a
TRV 13-3-5	9.3 a
Control	0.0 b
F- test	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	17.87

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

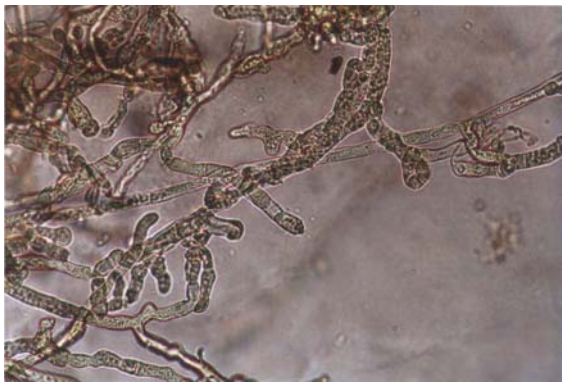
อักษรเหมือนกันในแถวและคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT



ก



ข



ค

ภาพที่ 4 ก. การเกิดวงใส ในการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ข. และ ค. จุลสัณฐานวิทยาของสายรา *R. solani* เมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ TRV 9-5-2 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา กำลังขยาย 400 เท่า สายราชุดควบคุม (ข) และสายราชุดทดสอบ (ค)

2.3 ทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *R. solani*

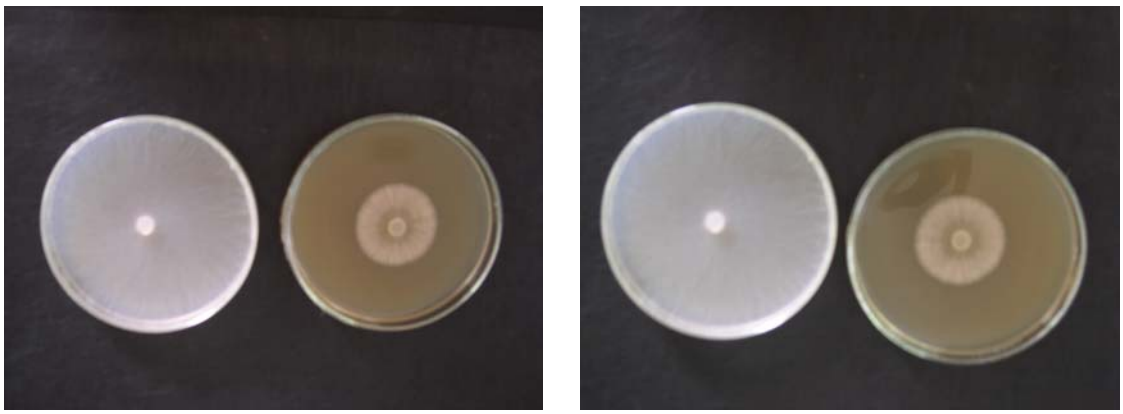
การทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 16 สายพันธุ์ ต่อเชื้อรา *R. solani* พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารปฏิปักษ์ที่ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ทุกสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ TRV 9-5-2 สามารถผลิตสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* ได้ดีที่สุด คือ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ของสารปฏิปักษ์หลังจากไม่นึ่งฆ่าเชื้อและนึ่งฆ่าเชื้อ เท่ากับ 97.3 และ 93.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7 และ ภาพที่ 5)

ตารางที่ 7 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ของสารปฏิปักษ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ และนึ่งฆ่าเชื้อ

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารปฏิปักษ์	
	ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ	นึ่งฆ่าเชื้อ
HYV 3-4-1	96.4 ab	90.6 abcd
RPV 2-4-1	95.7 abc	89.6 bcd
RPV 8-1-1	95.8 abc	85.1 ef
RPV 8-1-2	88.7 g	88.5 cd
RPV 8-3-1	94.4 cd	92.2 ab
TMV 2-1-3	95.1 bc	88.9 bcd
TMV 2-3-1	96.2 ab	92.0 ab
TRV 4-3-2	96.4 ab	88.9 bcd
TRV 5-3-2	90.6 f	84.7 ef
TRV 6-4-6	96.9 a	91.6 abc
TRV 9-5-2	97.3 a	93.7 a
TRV 10-1-3	80.4 h	82.5 f
TRV 13-3-2	94.9 bc	88.5 cd
TRV 13-3-3	93.0 de	89.6 bcd
TRV 13-3-4	95.1 bc	90.7 abcd
TRV 13-3-5	92.2 e	87.7 de
Control	0.0 I	0.0 g
F- test	**	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	0.87	1.86

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

อักษรเหมือนกันในแถวและคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT



ก ข

ภาพที่ 5 ขนาดโคโลนีของ *R. solani* เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA double strength ที่ผสมสารปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ TRV 9-5-2 ในอัตราส่วน 1:1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม สารปฏิปักษ์ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ (ก) และนึ่งฆ่าเชื้อ (ข)

2.4 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ผ่านการคัดเลือก

จากการตรวจสอบ และจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ TRV 9-5-2 โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (ตารางที่ 8) พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีเซลล์แบบแท่ง สร้างเอนโดสปอร์ สามารถรีดิวส์ไนเทรตให้เป็นไนไตรต์หรือก๊าซไนโตรเจนได้ มีความสามารถในการทนเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้นสูงได้ สร้างเอนไซม์ amylase และ gelatinase ย่อยแป้งและเจลาตินได้ และใช้น้ำตาลต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี เมื่อทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติดังกล่าวกับคู่มือของ Mac Faddin (1976) และ Schaad และคณะ (2001) ผลปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวคือ *B. firmus*

3. การเตรียมและการพัฒนาสูตรตำรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

3.1 การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์ที่มีคุณภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร PDA เป็นเวลา 4 วัน เพื่อผลิตสปอร์ที่มีคุณภาพ เมื่อตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยวิธี drop plate พบว่า จำนวนสปอร์ที่ผลิตได้มีปริมาณ 8.25×10^{21} cfu/มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสปอร์ที่ผลิตได้ไปเจือจางเป็นสารแขวนลอยของสปอร์เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อเตรียมสูตรตำรับต่อไป

ตารางที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการ และผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
Gram stain reaction	+
Morphology	rod
Endospore	+
Motility test	-
Nitrate reduction	+
Growth 7.0 % NaCl	+
Indole test	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin liquefaction	+
Simmons citrate	-
Voges-Proskauer	-
Glucose	+
Mannitol	+
Arabinose	+
Xylose	+
Catalase test	+

+ = positive

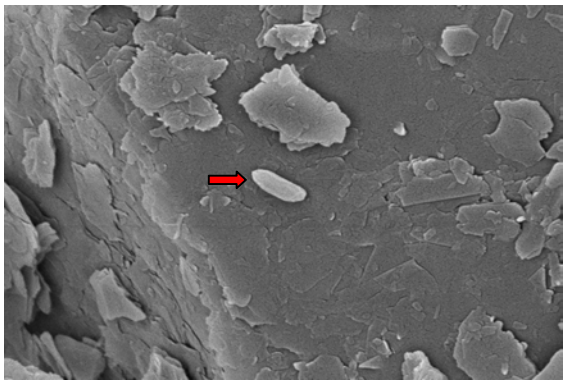
- = negative

3.2 สูตรตำรับคลุกเมล็ด

3.2.1 การเตรียมสูตรตำรับคลุกเมล็ด

จากการเตรียมสูตรตำรับคลุกเมล็ด 4 สูตร โดยผสมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และสารประกอบต่าง ๆ ในตำรับ คือ ทัลคัม และสารยึดเกาะ คือ SCMC หรือ PVP (k-30) พบว่าสูตรตำรับทุกสูตรมีลักษณะเป็นผงละเอียด สีขาว และมีลักษณะสปอร์ดังภาพที่ 6

ก



ข

ภาพที่ 6 ก. ลักษณะผลิตภัณฑ์สูตรตำรับคลุกเมล็ดสูตรที่ 1

ข. จุลสัณฐานวิทยาของสปอร์เชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 (ศรชี้) ในสูตรตำรับคลุกเมล็ดสูตรที่ 1 จากกล้องจุลทรรศน์แบบ SEM (2 μm)กำลังขยาย 8,000 เท่า

3.2.2 การประเมินผลสูตรตำรับคลุกเมล็ด

นำสูตรตำรับคลุกเมล็ดที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 มาประเมินผลเพื่อคัดเลือกสูตรตำรับคลุกเมล็ดที่เหมาะสมและดีที่สุด ดังนี้

3.2.2.1 ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

สูตรตำรับคลุกเมล็ดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 สูตร ที่ผลิตได้ เมื่อตรวจนับปริมาณเชื้อ โดยวิธี drop plate พบว่า สูตรตำรับที่ 1 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มากที่สุด โดยมีปริมาณ $2.80 \pm 0.5 \times 10^{10}$ cfu/กรัม (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. firmus*. สายพันธุ์ TRV 9-5-2 ในสูตรตำรับคลุกเมล็ด

สูตรตำรับคลุกเมล็ด	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (cfu/กรัม)
1	$2.8 \pm 0.5 \times 10^{10}$
2	$9.5 \pm 1.0 \times 10^{8}$
3	$2.1 \pm 0.5 \times 10^{10}$
4	$2.8 \pm 2.2 \times 10^{9}$

หมายเหตุ : ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เริ่มต้น เท่ากับ 2.55×10^{13} cfu/มิลลิลิตร

3.2.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยวิธี pour plate ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอาหาร PDA พบว่า สูตรตำรับที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อรา *R. solani* สูงสุด คือ สูตรตำรับที่ 1 รองลงมาได้แก่ สูตรตำรับที่ 2 3 และ 4 เทียบกับชุดควบคุม เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* โดยสูตรตำรับคลุกเมล็ด

สูตรตำรับคลุกเมล็ด	การยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)
1	97.4 a
2	95.9 a
3	93.1 b
4	91.9 b
ชุดควบคุม	00.0 c
F-test	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	1.75

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

อักษรเหมือนกันในแถวและคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

3.2.2.3 การทดสอบความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดถั่วหรั่ง

หลังจากทดสอบความงอก และความแข็งแรงของเมล็ดถั่วหรั่ง เมื่อคลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับต่าง ๆ พบว่า เมล็ดถั่วหรั่งที่ไม่ได้คลุกด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ด มีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าปกติสูงสุด (77.5 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับที่ 1 2 และ 3 ส่วนเมล็ดที่คลุกด้วยสูตรตำรับที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าปกติต่ำสุด (66.5 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับที่ 1 2 และ 3 ส่วนเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ ในกรรมวิธีที่ไม่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับมีเปอร์เซ็นต์สูงสุด (12.5 เปอร์เซ็นต์) และกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติต่ำสุด (4.5 เปอร์เซ็นต์) และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง กรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดูดน้ำสูงสุด (17.0 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับเปอร์เซ็นต์เมล็ดดูดน้ำในกรรมวิธีที่คลุก

เมล็ดด้วยสูตรตำรับที่ 1 2 และ 3 ส่วนเปอร์เซ็นต์เมล็ดเป็นโรค ในกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับที่ 1 มีค่าเฉลี่ยต่ำสุด (3.0 เปอร์เซ็นต์) และกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับที่ 4 มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดเป็นโรคสูงสุด (6.5 เปอร์เซ็นต์) และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ กรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดตายต่ำสุด (2.0 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับ กรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับที่ 2 และ 4 ส่วนกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยตำรับที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดตายสูงสุด (6.0 เปอร์เซ็นต์) และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 11) (ภาพที่ 7)

ตารางที่ 11 ผลของการคลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ดสูตรต่าง ๆ ต่อการงอกของเมล็ดถั่วหรั่ง

สูตรตำรับคลุกเมล็ด	เปอร์เซ็นต์				
	ต้นกล้าปกติ	ต้นกล้าผิดปกติ	เมล็ดดูดน้ำ	เมล็ดเป็นโรค	เมล็ดตาย
1	75.0 ab	4.5 b	15.5 a	3.0 b	2.0 b
2	72.5 ab	6.0 b	15.0 a	3.0 b	3.5 b
3	71.5 ab	5.0 b	12.5 a	5.0 ab	6.0 a
4	66.5 b	6.5 b	17.0 a	6.5 a	3.5 b
ชุดควบคุม	77.5 a	12.5 a	3.5 b	3.5 b	3.0 b
F-test	*	**	*	*	*
C.V (เปอร์เซ็นต์)	8.15	39.86	43.72	44.11	41.51

*, ** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05, 0.01$

อักษรเหมือนกันในแถวและคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

ก

ข

ภาพที่ 7 ลักษณะต้นกล้าปกติ หลังจากเพาะเป็นเวลา 8 วัน ต้นกล้าที่ไม่คลุกด้วยสูตรตำรับ (ก) และต้นกล้าที่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับที่ 1 (ข)

จากการประเมินผลสูตรตำรับคลุกเมล็ดข้างต้น พบว่าสูตรตำรับคลุกเมล็ดสูตรที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย ทัลคัม 99 กรัม SCMC 1 กรัม และสารแขวนลอยสปอร์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2.55 X 10^{13} ปริมาณ 40 มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. solani* สูงสุด และมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่รอดในสูตรตำรับสูงสุด รวมทั้งไม่แสดงอาการยับยั้งการงอกหรือการเจริญของต้นกล้าถั่วหรั่ง จึงคัดเลือกสูตรตำรับคลุกเมล็ดสูตรที่ 1 เพื่อใช้ทดสอบ ประสิทธิภาพของสูตรตำรับในการควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง ในสภาพเรือนทดลองต่อไป

3.3 สูตรตำรับฉีดพ่น

3.3.1 การเตรียมสูตรตำรับฉีดพ่น

จากการเตรียมสูตรตำรับฉีดพ่น 4 สูตร โดยมีสารประกอบในสูตรตำรับ ได้แก่ alginate PVP (k-30) และ lactose ในอัตราส่วนต่าง ๆ และผสมกับสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 พบว่าสูตรตำรับแต่ละสูตรมีลักษณะเป็นแกรนูล สีขาวครีม และมีลักษณะสปอร์ดังภาพที่ 8

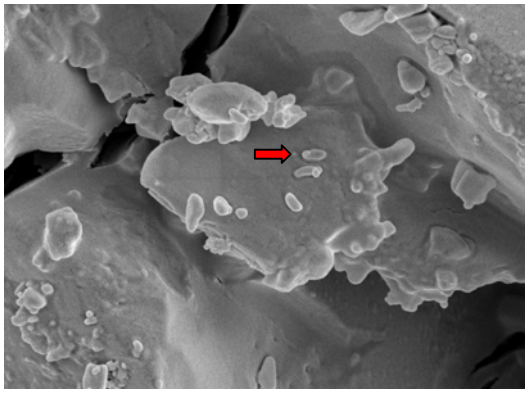
3.3.2 การประเมินผลสูตรตำรับฉีดพ่น

นำสูตรตำรับฉีดพ่น ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 มาประเมินผลเพื่อคัดเลือกสูตรตำรับฉีดพ่นที่เหมาะสมและดีที่สุด ดังนี้

3.3.2.1 วัดความเป็นกรด–ด่าง (pH) ของสูตรตำรับฉีดพ่น

ค่าความเป็นกรด–ด่างของสูตรตำรับทั้ง 4 สูตรเป็นกรดอ่อนถึงเป็นกลาง ซึ่งในแต่ละสูตรตำรับ พบว่าที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เล็กน้อย (ตารางที่ 12)

ก



ข

ภาพที่ 8 ก. ลักษณะผลิตภัณฑ์สูตรตำรับฉีดพ่นสูตรที่ 1

ข. จุลสัณฐานวิทยาของสปอร์เชื้อแบคทีเรีย *B.firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 (*ศรชี้*) ในสูตรตำรับฉีดพ่นสูตรที่ 1 จากกล้องจุลทรรศน์ แบบ SEM (5 μm) กำลังขยาย 4,000 เท่า

ตารางที่ 12 ความเป็นกรด-ด่างของสูตรตำรับฉีดพ่นที่ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์

สูตรตำรับฉีดพ่น	ความเป็นกรด-ด่าง	
	1 เปอร์เซ็นต์	3 เปอร์เซ็นต์
1	5.73 ± 0.05	5.87 ± 0.04
2	5.87 ± 0.05	6.16 ± 0.12
3	5.66 ± 0.10	5.97 ± 0.08
4	5.97 ± 0.13	6.09 ± 0.06

3.3.2.2 วัดความหนืดของสูตรตำรับฉีดพ่น

จากการวัดความหนืดของสารละลายสูตรตำรับฉีดพ่นที่ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำ เปรียบเทียบกับความหนืดของน้ำกลั่น ปรากฏว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยสูตรตำรับฉีดพ่นที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์ความหนืดสูงสุด ทั้งที่ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ สูตรตำรับที่ 2 (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ความหนืดของสูตรตำรับฉีดพ่นที่ความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์

สูตรตำรับฉีดพ่น	ความหนืด (เปอร์เซ็นต์)	
	1 เปอร์เซ็นต์	3 เปอร์เซ็นต์
1	9.18 a	13.17 a
2	9.05 a	12.93 a
3	8.19 b	10.43 b
4	8.09 b	10.37 b
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	5.47 c	5.48 c
F-test	**	**
C.V (เปอร์เซ็นต์)	1.56	2.28

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

อักษรเหมือนกันในแถวและคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

3.3.2.3 ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

สูตรตำรับฉีดพ่นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 สูตร ที่ผลิตได้ เมื่อทำการตรวจนับปริมาณเชื้อโดยวิธี drop plate พบว่า สูตรตำรับที่ 1 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มากที่สุด คือ $1.0 \pm 0.0 \times 10^9$ cfu/กรัม และมีความสม่ำเสมอมากที่สุด (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 ในสูตรตำรับฉีดพ่น

สูตรตำรับฉีดพ่น	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (cfu/กรัม)
1	$1.0 \pm 0.0 \times 10^9$
2	$1.5 \pm 1.2 \times 10^8$
3	$1.5 \pm 1.2 \times 10^8$
4	$5.0 \pm 1.4 \times 10^8$

หมายเหตุ : ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เริ่มต้น เท่ากับ 1.95×10^{12} cfu/มิลลิลิตร

3.3.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยวิธี pour plate ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอาหาร PDA พบว่า สูตรตำรับที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* สูงสุด คือ สูตรตำรับที่ 1 รองลงมาได้แก่ สูตรตำรับที่ 2 4 และ 3 เทียบกับชุดควบคุม เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าแต่ละสูตรตำรับให้ค่าที่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* โดยสูตรตำรับฉีดพ่น

สูตรตำรับฉีดพ่น	การยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)
1	92.6 a
2	90.3 ab
3	88.9 ab
4	85.8 b
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	00.0 c
F-test	**
C.V. (เปอร์เซ็นต์)	4.27

** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.01$

อักษรเหมือนกันในแถวและคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

3.3.2.5 ทดสอบการติดใบ และความสามารถในการอยู่รอดบนต้นถั่วหรั่งของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรตำรับฉีดพ่น

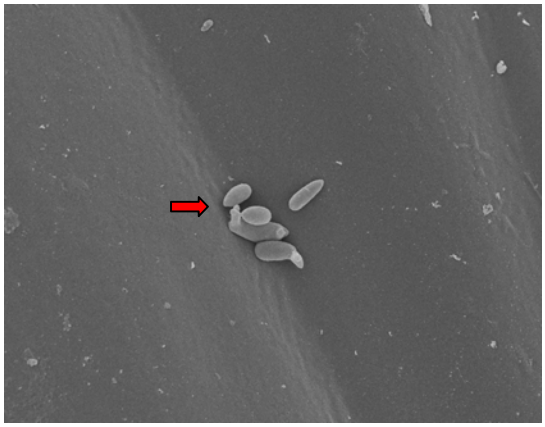
จากการทดสอบการติดใบ และการอยู่รอดบนต้นถั่วหรั่งของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ หลังจากฉีดพ่นด้วยสูตรตำรับต่าง ๆ เป็นเวลา 1 4 และ 7 วัน พบว่า สูตรตำรับที่ 1 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ติดอยู่บนใบ และก้านใบสูงสุด (ตารางที่ 16) โดยมีลักษณะการติดของสูตรตำรับและสปอร์บนใบ และก้านใบดังภาพที่ 9

ตารางที่ 16 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนใบและก้านใบถั่วหรั่ง หลังจากฉีดพ่นด้วยสูตรตำรับฉีดพ่น เป็นเวลา 1 4 และ 7 วัน

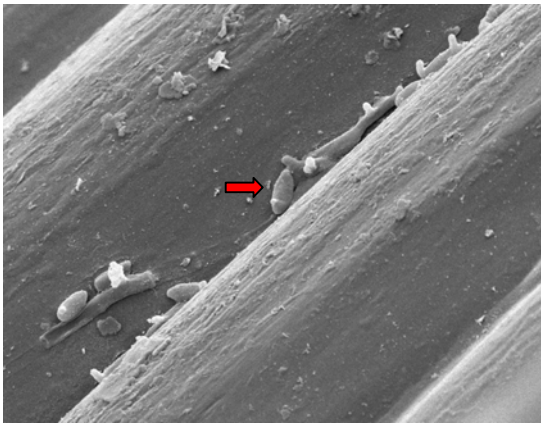
สูตรตำรับฉีดพ่น	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (cfu/กรัม)						
	เริ่มต้น	หลังฉีดพ่น 1 วัน		หลังฉีดพ่น 4 วัน		หลังฉีดพ่น 7 วัน	
		ใบ	ก้านใบ	ใบ	ก้านใบ	ใบ	ก้านใบ
1	$2.7 \pm 1.4 \times 10^{8}$	$3.3 \pm 1.7 \times 10^{7}$	$1.0 \pm 0.6 \times 10^{6}$	$1.4 \pm 0.5 \times 10^{6}$	$7.0 \pm 2.1 \times 10^{5}$	$2.2 \pm 0.5 \times 10^{6}$	$3.3 \pm 0.6 \times 10^{5}$
2	$1.3 \pm 1.0 \times 10^{8}$	$1.0 \pm 0.0 \times 10^{7}$	$7.3 \pm 1.5 \times 10^{5}$	$1.5 \pm 1.0 \times 10^{6}$	$5.5 \pm 1.0 \times 10^{5}$	$1.0 \pm 0.6 \times 10^{6}$	$2.6 \pm 1.5 \times 10^{5}$
3	$1.6 \pm 0.9 \times 10^{8}$	$1.5 \pm 0.0 \times 10^{7}$	$6.2 \pm 0.5 \times 10^{5}$	$1.2 \pm 1.3 \times 10^{6}$	$4.4 \pm 0.6 \times 10^{5}$	$8.3 \pm 1.3 \times 10^{5}$	$3.1 \pm 1.0 \times 10^{5}$
4	$1.4 \pm 0.9 \times 10^{8}$	$1.8 \pm 0.6 \times 10^{7}$	$9.2 \pm 2.2 \times 10^{5}$	$1.3 \pm 0.5 \times 10^{6}$	$4.4 \pm 1.3 \times 10^{5}$	$1.3 \pm 1.0 \times 10^{6}$	$2.5 \pm 0.6 \times 10^{5}$

หมายเหตุ : สูตรตำรับฉีดพ่นแต่ละสูตรที่นำมาทดสอบเป็นสูตรตำรับที่ผลิตเก็บไว้นาน 3 เดือน

ก



ข



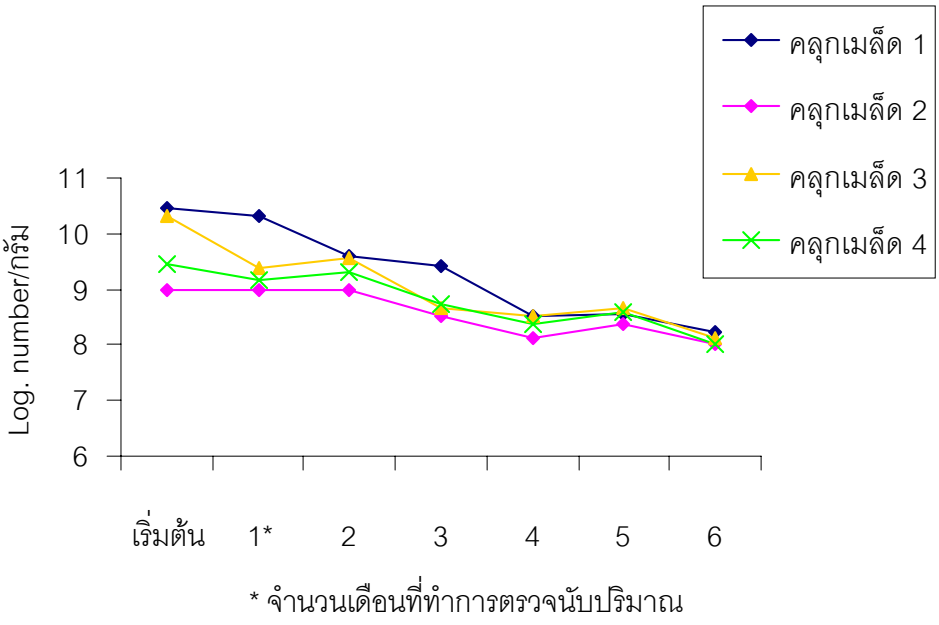
ค

ภาพที่ 9 ก. ลักษณะการติดใบและก้านใบของสูตรตำรับฉีดพ่นสูตรที่ 1 หลังจากฉีดพ่น 7 วัน ข. และ ค. จุลสัณฐานวิทยาของสปอร์เชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 (ศรชี้) บนใบ (ข) และก้านใบ (ค) ถั่วหรั่ง จากกล้องจุลทรรศน์ แบบ SEM (5 µm) กำลังขยาย 4,000 เท่า

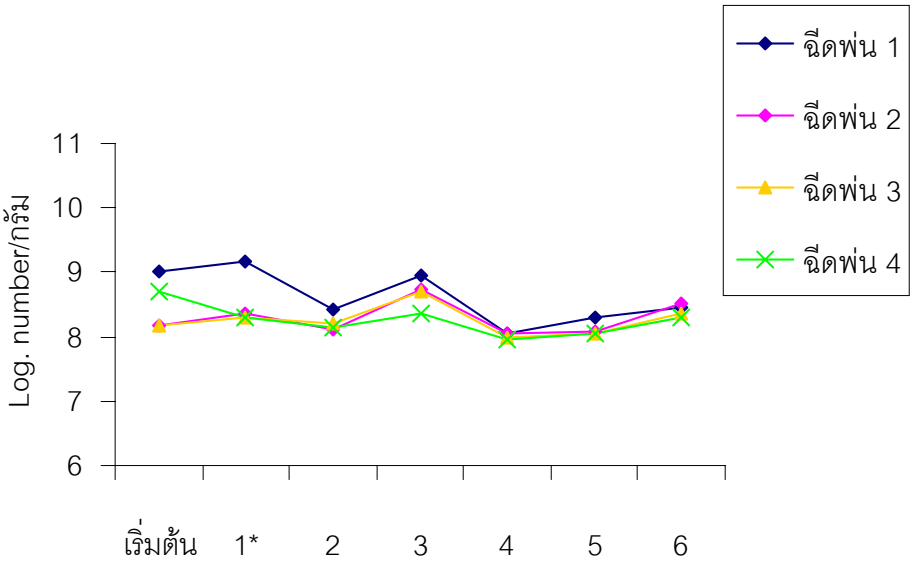
จากการประเมินผลสูตรตำรับฉีดพ่นข้างต้น พบว่าสูตรตำรับที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย alginate 10 กรัม PVP (k-30) 10 กรัม lactose 80 กรัม และสารแขวนลอยสปอร์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1.95 X 10^{12} cfu/ มิลลิลิตร ปริมาณ 20 มิลลิลิตร มีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *R. solani* สูงสุด และมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอดในสูตรตำรับ บนใบ และก้านใบสูงสุด จึงคัดเลือกสูตรตำรับฉีดพ่นสูตรที่ 1 เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง ในสภาพเรือนทดลองต่อไป

4. การตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในสูตรตำรับคลุกเมล็ดและสูตรตำรับฉีดพ่นภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

จากเก็บรักษาสูตรตำรับของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 รูปแบบ (สูตรตำรับคลุกเมล็ดและฉีดพ่น) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน และทำการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกเดือน พบว่า สูตรตำรับคลุกเมล็ดทั้ง 4 สูตร มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลดลงจากที่เริ่มต้นผลิต แต่อย่างไรก็ตามหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน พบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอดในสูตรตำรับคลุกเมล็ดค่อนข้างสูง คือ ประมาณ 10^8 cfu/กรัม โดยสูตรตำรับคลุกเมล็ดที่ 1 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่รอดสูงสุด (ภาพที่ 10) ส่วนสูตรตำรับฉีดพ่น พบว่า สูตรตำรับฉีดพ่นทั้ง 4 สูตร มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ค่อนข้างคงที่ อัตราการลดลงของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์น้อยมากถึงแม้เก็บไว้นาน 6 เดือน (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 10 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 ในสูตรตำรับคลุกเมล็ด เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน



ภาพที่ 11 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 ในสูตรตำรับฉีดพ่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน

5. การทดสอบประสิทธิภาพของการควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งของสูตรตำรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในสภาพเรือนทดลอง

5.1 การเตรียมเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 เพื่อใช้คลุกเมล็ดถั่วหรั่ง

จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 ลงในอาหาร YMB ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ให้มีปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อไรโซเบียม โดยวิธี drop plate ก่อนนำไปคลุกกับเมล็ดถั่วหรั่งเพื่อเตรียมปลูกทดสอบในสภาพเรือนทดลอง ซึ่งปริมาณเชื้อที่นับได้เท่ากับ 1.0×10^{10} cfu/มิลลิลิตร

5.2 การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *B. firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2

จากการนำเชื้อแบคทีเรีย *B.firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนโดยใช้อาหาร NB ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ให้มีปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยวิธี drop plate แล้วจึงนำไปคลุกกับเมล็ดถั่วหรั่งก่อนปลูกทดสอบในสภาพ

เรือนทดลอง และฉีดพ่นเมื่อต้นถั่วหรั่งมีอายุ 60 วัน ซึ่งปริมาณเชื้อที่นับได้เท่ากับ 5.0 X 10^{10} และ 9.25 X 10^{7} cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรตำรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในสภาพเรือนทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพสูตรตำรับเชื้อแบคทีเรีย *B.firmus* สายพันธุ์ TRV 9-5-2 ทั้งสูตรคลุกเมล็ด และสูตรฉีดพ่น เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* เมื่อถั่วหรั่งอายุ 60 วัน ทำการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธีต่าง ๆ แล้วตรวจสอบผลการควบคุมโรคใบไหม้เมื่อถั่วหรั่งอายุ 67 วัน พบว่ากรรมวิธีที่ให้เปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบปกติสูงสุด คือ ฉีดพ่นสูตรตำรับฉีดพ่น (91.92 เปอร์เซ็นต์) และไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีฉีดพ่นสารฆ่าเชื้อรา ipodione (91.12 เปอร์เซ็นต์) สูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสารฆ่าเชื้อรา iprodione (90.73 เปอร์เซ็นต์) สูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสูตรตำรับฉีดพ่น (90.17 เปอร์เซ็นต์) แช่สารแขวนลอย *B.firmus* (89.92 เปอร์เซ็นต์) สูตรตำรับคลุกเมล็ด (89.80 เปอร์เซ็นต์) สูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสารแขวนลอย *B.firmus* (87.81 เปอร์เซ็นต์) แต่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับกรรมวิธีชุดควบคุม (ปลูกเชื้อราสาเหตุเพียงอย่างเดียว) ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบปกติต่ำสุด (80.33 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 17)

สำหรับเปอร์เซ็นต์ก้านใบปกติของแต่ละกรรมวิธี มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยกรรมวิธีที่ให้เปอร์เซ็นต์ก้านใบปกติมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ ฉีดพ่นสารฆ่าเชื้อรา iprodine (94.78 เปอร์เซ็นต์) สูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสารฆ่าเชื้อรา iprodione (94.49 เปอร์เซ็นต์) และ สูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสูตรตำรับฉีดพ่น (93.69 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ตารางที่ 17)

การเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินของถั่วหรั่ง พบว่าน้ำหนักแห้งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่ง โดยกรรมวิธีที่ให้น้ำหนักแห้งมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ สูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสารฆ่าเชื้อรา iprodione (5.36 กรัม/กระถาง) สูตรตำรับคลุกเมล็ด (4.68 กรัม/กระถาง) ฉีดพ่นสูตรตำรับฉีดพ่น (4.47 กรัม/กระถาง) ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีชุดควบคุมให้น้ำหนักแห้งน้อยที่สุด (3.73 กรัม/กระถาง) (ตารางที่ 17)

การเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของต้นถั่วหรั่งส่วนเหนือดิน พบว่าเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยกรรมวิธีคลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสูตรตำรับฉีดพ่น มีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนสูงสุด (4.60 เปอร์เซ็นต์) ส่วนกรรมวิธีคลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสารฆ่าเชื้อรา iprodione มีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนต่ำสุด (3.78 เปอร์เซ็นต์) และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรรม

วิธีที่ให้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมากที่สุด คือ สูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสูตรตำรับฉีดพ่น (0.20 กรัม/กระถาง) รองลงมา คือ สูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสารแขวนลอย *B.firmus* (0.19 กรัม/กระถาง) ส่วนกรรมวิธีฉีดพ่นสารแขวนลอย *B.firmus* และชุดควบคุมให้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่ำสุด (0.15 กรัม/กระถาง) (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 พื้นที่ใบและก้านใบปกติ น้ำหนักแห้ง เปอร์เซ็นต์และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของถั่วหรั่ง ในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธีทดลอง	พื้นที่ใบปกติ (เปอร์เซ็นต์)	ก้านใบปกติ (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักแห้ง (กรัม/กระถาง)	ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)	ไนโตรเจนทั้งหมด (กรัม/กระถาง)
สูตรตำรับคลุกเมล็ด	89.80 a	88.07 ab	4.68 ab	3.82 b	0.18 ab
แช่เมล็ดในสารแขวนลอย *B.firmus*	89.92 a	80.90 b	4.11 ab	4.17 ab	0.18 ab
ฉีดพ่นสารแขวนลอย *B.firmus*	89.16 a	63.18 c	3.88 ab	3.89 b	0.15 b
ฉีดพ่นสูตรตำรับฉีดพ่น	91.92 a	87.91 ab	4.47 ab	4.12 ab	0.18 ab
ฉีดพ่นสารฆ่าเชื้อรา iprodione	91.12 a	94.78 a	4.04 ab	4.22 ab	0.17 ab
สูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสารแขวนลอย *B.firmus*	87.81 a	84.17 ab	4.44 ab	4.25 ab	0.19 ab
สูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสูตรตำรับฉีดพ่น	90.17 a	93.69 a	4.28 ab	4.60 a	0.20 a
สูตรตำรับคลุกเมล็ด+ฉีดพ่นสารฆ่าเชื้อรา iprodione	90.73 a	94.49 a	5.36 a	3.78 b	0.17 ab
ชุดควบคุม (*R. solani*)	80.33 b	51.04 d	3.73 b	4.09 ab	0.15 b
F-test	**	**	**	**	*
C.V.(%)	3.53	9.46	15.13	5.96	15.88

*, ** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05, 0.01$

อักษรเหมือนกันในแถวและคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT