บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่แปลงปลูกถั่วหรั่ง และถั่วลิสงทั้งหมด 9 อำเภอ 6 จังหวัด จำนวนทั้งสิ้น 49 แปลง

2. ตัวอย่างวัสดุทดลอง

กากใยปาล์ม (mesocarp fiber of oil plam)

3. สารเคมี

alginate

lactose

talcum

sodium carboxymethylcellulose (SCMC)

polyvinylpyrolidone (PVP (k-30))

สารฆ่าเชื้อรา iprodione

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมเองตามสูตร (ภาคผนวก ก) ได้แก่

GSM medium

potato dextrose agar (PDA)

nutrient agar (NA)

nutrient broth (NB)

yeast mannitol agar (YMA)

yeast mannitol broth (YMB)

5. **สารละลายเตรียมเองตามสูตร (ภาคผนวก ข) ได้แก่**

สารผสมเร่งปฏิกิริยา (catalyst mixture)

อินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator)

สารละลายกรดบอริกผสมอินดิเคเตอร์

อุปกรณ์

ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 100 และ 1,000 ไมโครลิตร

บิวเรต (buret) ขนาด 50 มิลลิลิตร

ดีสเปนเซอร์ (dispenser) ขนาด 5 มิลลิลิตร

หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)

กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope

กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope : SEM)

กล้องสเตอริโอซูม (stereo zoom)

เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (analytical balance)

เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

เครื่องเขย่าสารเคมี (table rotary shaker)

เครื่องหมุนเหวี่ยงสารเคมี(centrifuge)

เครื่องวัดพื้นที่ใบ

เครื่องบดชิ้นส่วนพืช

เครื่องกลั่นไนโตรเจน (nitrogen distillation apparatus)

เตาย่อยตัวอย่าง (digestion block)

เครื่องผสม (planetary mixer)

เครื่องวัดความหนืด (Brookfield digital rheometer model DV-III)

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

เครื่องแก้ว และอุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น

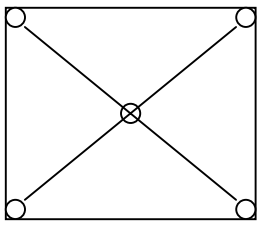
วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างดิน และการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดินตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกถั่วหรั่งและถั่วลิสงในพื้นที่ภาคใต้ โดยใช้พลั่วตักดินบริเวณใต้ทรงพุ่มของต้นถั่วที่เจริญเติบโตดี จากแปลงที่ไม่เกิดโรค หรือแปลงที่มีโรคลดลง หรือแปลงที่ไม่มีการแพร่กระจายของโรค โดยเดินสุ่มเก็บตัวอย่างดินในลักษณะเส้นทแยงมุมในแปลงขนาดประมาณ 30 x 30 เมตร ที่ความลึก 0-15 เซนติเมตร จำนวน 5 จุด (ภาพที่ 1) เก็บใส่ถุงพลาสติกถุงละประมาณ 500 กรัมต่อจุด ปิดปากถุงให้สนิท แล้วนำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต่อไป

สำหรับสถานที่เก็บตัวอย่างดินมีทั้งหมด 9 อำเภอ 6 จังหวัด จำนวนทั้งสิ้น 49 แปลง คือ

- อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา จากพื้นที่ปลูกถั่วหรั่ง 5 แปลง และถั่วลิสง 1 แปลง
- อ. รัตภูมิ จ. สงขลา จากพื้นที่ปลูกถั่วหรั่ง 12 แปลง
- อ. จะนะ จ.สงขลา จากพื้นที่ปลูกถั่วลิสง 1 แปลง
- อ. นาทวี จ. สงขลา จากพื้นที่ปลูกถั่วลิสง 1 แปลง
- อ. ตะโหมด จ. พัทลุง จากพื้นที่ปลูกถั่วหรั่ง 6 แปลง
- อ. เมือง จ. ตรัง จากพื้นที่ปลูกถั่วหรั่ง 16 แปลง
- อ. ทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช จากพื้นที่ปลูกถั่วลิสง 1 แปลง
- อ. ยะหา จ. ยะลา จากพื้นที่ปลูกถั่วลิสง 4 แปลง
- อ. รือเสาะ จ.นราธิวาส จากพื้นที่ปลูกถั่วลิสง 2 แปลง



ภาพที่ 1 แผนผังการเดินสุ่มเก็บตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินที่เก็บมาทั้งสิ้น 49 แปลง ๆ ละ 5 จุด รวม 245 ตัวอย่าง นำตัวอย่างดินที่เก็บมาทั้งหมด มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดินตัวอย่างแต่ละจุด โดยวิธี pour plate จุดละ 2 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำการชั่งตัวอย่างดิน 1.00 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 9.0 มิลลิลิตร ของ 0.85 % NaCl เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าหลอด (vortex mixer) เป็นเวลา 1–2 นาที จะได้

dilution 10^{-1} แล้วจึงนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่มีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการเขย่าหลอดดังกล่าวทันทีเมื่อนำออกจากอ่างควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นทำ 10–fold dilution ให้ได้ 10^{-4} และ 10^{-5} แล้วทำการ pour plate ด้วยอาหาร GSM medium (อำไพ ทิพย์ สุขหอม, 2534) รอจนอาหารแข็งตัว จึงตัดชิ้นวุ้น potato dextrose agar (PDA) ที่มี เชื้อรา *R. solani* อายุประมาณ 36 ชั่วโมงเจริญอยู่ ด้วยที่เจาะรู (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร มาวางกลางจานเพาะเชื้อที่ทำการ pour plate ไว้แล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เกิดวงใส (clear zone) ของเชื้อรา *R. solani* นำมา streak บนอาหาร nutrient agar (NA) (เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ (ภาคผนวก ข ตารางที่ 1-1) เพื่อยืนยันว่าเป็น เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และทำการเก็บเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไว้บน NA slant เพื่อทำการศึกษาต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

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

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากดินตัวอย่างทั้งหมด มาทำการทดสอบบนอาหาร PDA โดยปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ให้เป็นเส้นตรง 1 เส้น ตรงกลางจานเพาะเชื้อ แล้วปลูกเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 เป็นเส้นขนาน ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร ทั้งสองด้านของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจผลการทดลองเมื่อครบ 24 และ 72 ชั่วโมง โดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 หรือถูกยับยั้งการเจริญโดยเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92

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

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2.1 มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* โดยวิธี dual culture ทำการทดสอบบนอาหาร PDA โดยตัดชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อรา *R. solani* อายุประมาณ 36 ชั่วโมงเจริญอยู่ ด้วยที่เจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร มาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อ แล้วปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 3 จุด บริเวณกึ่งกลางระหว่างจุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อกับขอบจาน ให้มีระยะห่างเป็นรูปสามเหลี่ยมด้านเท่า ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกระยะห่างของการเกิดวงใส แล้วคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เกิดวงใสของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* มากกว่าหรือเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร

2.3 ทดสอบฤทธิ์ของสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *R. solani*

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2.2 มาทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. บนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อ 2 ลูปในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการถ่ายกล้าเชื้อ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร GSM medium โดยเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำส่วนใสที่ผ่านการกรองดังกล่าวแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำไปผสมกับอาหาร PDA double strength ในอัตราส่วน 1:1ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่จานที่ปราศจากเชื้อ ส่วนจานควบคุมให้ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนส่วนใส อีกส่วนหนึ่งที่ไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อนั้นนำไปผสมกับอาหาร PDA double strength ทำการทดลองเช่นเดียวกับส่วนแรก เมื่ออาหารแข็งตัวดีแล้วนำเชื้อรา *R. solani* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุประมาณ 36 ชั่วโมง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร มาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อดังกล่าว ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราจากสูตร (Gamliel *et al.*, 1989) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 100 - \frac{(r^2 \times 100)}{R^2}$$

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดควบคุม

r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบ

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดมา 1 สายพันธุ์เพื่อนำไปทดลองในขั้นต่อไป

2.4 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ผ่านการคัดเลือก

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ ได้แก่ การติดแกรม รูปร่างเซลล์ และการผลิตสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี เพื่อจำแนกและตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยอาศัยคู่มือของ Mac Faddin (1976) และ Schaad และคณะ (2001)

3. การเตรียมและการพัฒนาสูตรตำรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

3.1 การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์ที่มีคุณภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. บนอาหาร PDA ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ อายุ 18–24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยลงในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 0.85 % NaCl เขย่าให้เข้ากัน นำไปเลี้ยงในอาหาร PDA ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ โดยให้น้ำเลี้ยงเชื้อเคลือบบนผิวอาหารให้ทั่ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35–37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3–4 วัน ทำการเก็บสปอร์ของเชื้อ โดยการล้างสปอร์ที่เจริญบนผิวอาหารด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปปั่นล้าง 2–3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำลาย vegetative cell แล้วนับจำนวนสปอร์ด้วยวิธี drop plate บนอาหาร PDA จัดเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อนำไปเตรียมสูตรตำรับต่อไป

3.2 สูตรตำรับคลุกเมล็ด

3.2.1 การเตรียมสูตรตำรับคลุกเมล็ด

นำสารประกอบต่าง ๆ ได้แก่ ทัลคัม และสารยึดเกาะ คือ SCMC หรือ PVP (k-30) ในอัตราส่วนต่าง ๆ (ตารางที่ 3) ผสมกับสารแขวนลอยสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสม แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาบดในโกร่งให้เป็นผงละเอียด แล้วใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2 การประเมินผลสูตรตำรับคลุกเมล็ด

นำสูตรตำรับคลุกเมล็ดที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 มาประเมินผลเพื่อคัดเลือกสูตรตำรับคลุกเมล็ดที่เหมาะสมและดีที่สุด ดังนี้

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของสูตรตำรับคลุกเมล็ด 4 สูตร

สารประกอบ	สูตรตำรับ			
	1	2	3	4
ทัลคัม (กรัม)	99	97	99	97
SCMC (กรัม)	1	3	-	-
PVP (k-30) (กรัม)	-	-	1	3
สารแขวนลอยสปอร์ (มิลลิลิตร)	40	40	40	40

3.2.2.1 **ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์**

ตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามวิธี drop plate บนอาหาร PDA โดยสุ่มวัด 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดในสูตรตำรับคลุกเมล็ด

3.2.2.2 **ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์**

โดยละลายสูตรตำรับคลุกเมล็ดในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการ pour plate ด้วยอาหาร PDA เมื่ออาหารแข็งดีแล้วนำชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อรา *R. solani* อายุประมาณ 36 ชั่วโมง มาวางกลางจานเพาะเชื้อ ทำการทดลองจำนวน 6 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อรา *R. solani* หลังจากนั้นนำสูตรตำรับคลุกเมล็ดที่เหมาะสมและดีที่สุดเพียง 1 สูตร มาศึกษาจุลสัณฐานวิทยาของสปอร์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

3.2.2.3 **การทดสอบความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดถั่วหรั่ง**

นำเมล็ดถั่วหรั่งพันธุ์สงขลา 1 ไปฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการแช่ในสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ คลอร๊อก (clorox) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง แช่น้ำไว้ 1 คืน หลังจากนั้นนำเมล็ดถั่วหรั่งมาคลุกด้วยสูตรตำรับทั้ง 4 สูตร ในอัตราส่วนเมล็ดถั่วหรั่ง 10 กรัม ต่อสูตรตำรับคลุกเมล็ด 1 กรัม ผสมให้สูตรตำรับแต่ละสูตรเคลือบผิวเมล็ดให้ทั่วถึง แล้วนำไปทดสอบความงอกเทียบกับชุดควบคุม (ไม่คลุกเมล็ดด้วยสูตรตำรับ) โดยการเพาะในถาดอะลูมิเนียมขนาด กว้าง X ยาว X ลึก เท่ากับ 24.5 X 34.5 X 5.5 เซนติเมตร โดยวางแผ่นกระดาษซับ จำนวน 4 แผ่น ดูดซับน้ำไว้ในปริมาณที่พอเพียงตลอดระยะเวลาของการทดสอบ จากนั้นจึงจัดวางเมล็ดถั่วหรั่ง โดยทำการทดสอบสูตรละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 50 เมล็ด แล้วปิดถาดด้วยแผ่นกระดาษทิชชู วางไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกผลการงอกทุก ๆ 2 วัน นับจากวันเพาะจนสิ้นสุดการตรวจสอบความงอก เป็นระยะเวลา 8 วัน บันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ ต้นกล้าปกติ ต้นกล้าผิด

ปกติ เมล็ดดูดน้ำ เมล็ดเป็นโรค และเมล็ดตาย (วัลลภ สันติประชา, 2538) (ภาคผนวก ค) หาเปอร์เซ็นต์เพื่อคัดเลือกสูตรตำรับคลุกเมล็ดแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ไม่มีผลยับยั้งการงอก หรือการเจริญเติบโตของต้นกล้าถั่วหรั่ง

3.3 สูตรตำรับฉีดพ่น

3.3.1 การเตรียมสูตรตำรับสำหรับฉีดพ่น

นำสารประกอบ ได้แก่ alginate PVP (k-30) และ lactose ในอัตราส่วนต่าง ๆ (ตารางที่ 4) ผสมกับสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในเครื่องผสมจนเข้ากันดี และมีลักษณะเป็นก้อนหมาดพอเหมาะ นำส่วนผสมเปียกที่ได้ผ่านแร่งเบอร์ 16 กดให้ส่วนผสมเปียกออกมาเป็นแกรนูล แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสูตรตำรับที่ได้ไปทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ และประเมินผลในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของสูตรตำรับฉีดพ่น 4 สูตร

สารประกอบ	สูตรตำรับ			
	1	2	3	4
alginate (กรัม)	10	10	5	5
PVP (k-30) (กรัม)	10	5	10	5
lactose (กรัม)	80	85	85	90
สารแขวนลอยสปอร์ (มิลลิลิตร)	20	20	20	20

3.3.2 การประเมินผลสูตรตำรับฉีดพ่น

นำสูตรตำรับฉีดพ่นในรูปแกรนูลละลายน้ำ ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 มาประเมินผลเพื่อคัดเลือกสูตรตำรับฉีดพ่นที่เหมาะสมและดีที่สุด ดังนี้

3.3.2.1 วัดความเป็นกรด–ด่าง (pH) ของสูตรตำรับฉีดพ่น

โดยใช้ pH meter วัดความเป็นกรด–ด่างของสารละลายสูตรตำรับฉีดพ่นที่มีความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำ โดยวัด 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.3.2.2 วัดความหนืดของสูตรตำรับฉีดพ่น

โดยใช้ Brookfield digital rheometer model DV-III ที่มีขนาดเข็ม (spindle number) เท่ากับ 61 ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที วัดความหนืดของสารละลายสูตรตำรับฉีดพ่นที่มีความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำ โดยวัด 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.3.2.3 ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

โดยตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรตำรับฉีดพ่นตามวิธี drop plate โดยสุ่มวัด 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมด

3.3.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

โดยนำสูตรตำรับฉีดพ่นละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มาทำการ pour plate ด้วยอาหาร PDA เมื่ออาหารแข็งดีแล้วนำชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อรา *R. solani* อายุประมาณ 36 ชั่วโมง มาวางกลางจานเพาะเชื้อ ทำการทดลองจำนวน 6 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อรา *R. solani*

3.3.2.5 ทดสอบการติดใบ และความสามารถในการอยู่รอดบนต้นถั่วหรั่งของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

โดยนำสูตรตำรับฉีดพ่นละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วฉีดพ่นบนใบและก้านใบถั่วหรั่งที่มีอายุประมาณ 60 วัน เนื่องจากเป็นช่วงที่ถั่วหรั่งกำลังแตกกอและมีการเข้าทำลายของเชื้อรา *R. solani*สูง โดยฉีดพ่นกอละ 100 มิลลิลิตร และตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ติดใบและก้านใบถั่วหรั่ง (cfu/กรัมพืช) โดยวิธี drop plate หลังจากฉีดพ่น 1 4 และ 7 วัน โดยวัด 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย หลังจากนั้นนำสูตรตำรับฉีดพ่นที่เหมาะสมและดีที่สุดเพียง 1 สูตร พร้อมด้วยใบและก้านใบถั่วหรั่งที่ฉีดพ่นด้วยสูตรตำรับนั้น มาศึกษาจุลสัณฐานวิทยาของสปอร์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

นำสูตรตำรับที่ดีที่สุดที่ผ่านการประเมินผลแล้ว สูตรตำรับละ 1 สูตร เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในสภาพเรือนทดลองต่อไป

4. การตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในสูตรตำรับคลุกเมล็ดและสูตรตำรับฉีดพ่นภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

โดยตรวจนับปริมาณเชื้อครั้งแรกหลังจากผลิตเสร็จ และตรวจนับทุกเดือนเป็นระยะเวลานาน 6 เดือน โดยทำการชั่งสูตรตำรับคลุกเมล็ดและสูตรตำรับฉีดพ่น สูตรละ 1 กรัม นำไปทำ serial dilution ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1}–10^{-10} แล้วตรวจนับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยวิธี drop plate บนอาหาร PDA บันทึกข้อมูล

5. การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งของสูตรตำรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในสภาพเรือนทดลอง

5.1 การเตรียมเชื้อรา *R. solani*

เตรียมโดยเลี้ยงเชื้อรา *R. solani* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5–7 วัน แล้วตัดชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อรา *R. solani* เจริญอยู่ ด้วยที่เจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ลงเลี้ยงในกากใยปาล์มที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 กากใยปาล์มสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *R. solani*

5.2 การเตรียมเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 เพื่อใช้คลุกเมล็ดถั่วหรั่ง

โดยเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 ลงในอาหาร YMB ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบประมาณ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7–10 วัน จนกระทั่งมีปริมาณเชื้อไรโซเบียมมากกว่า 10^9 cfu/มิลลิลิตร และก่อนนำไปคลุกกับเมล็ดถั่วหรั่งเพื่อเตรียมปลูก นำอาหารดังกล่าวไปตรวจนับปริมาณเชื้อไรโซเบียม โดยวิธี drop plate บนอาหาร YMA

5.3 การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มาเลี้ยงเพิ่มจำนวน โดยใช้อาหาร NB ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบประมาณ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-4 วัน จนกระทั่งมี

ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มากกว่า 10^9 cfu/มิลลิลิตร และก่อนนำไปคลุกกับเมล็ดถั่วหรั่งเพื่อเตรียมปลูก หรือก่อนนำไปฉีดพ่น (เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเซลล์สดกับสูตรตำรับ) ให้นำอาหารดังกล่าวไปตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยวิธี drop plate บนอาหาร PDA

5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรตำรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในสภาพเรือนทดลอง

นำสูตรตำรับแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปคลุกเมล็ดและฉีดพ่นที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด มาทดสอบประสิทธิภาพเพื่อทดสอบผลของการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรตำรับคลุกเมล็ดและฉีดพ่นร่วมกับเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 ในการควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง โดยทำการเก็บตัวอย่างดินชุดวิสัย ที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร จากแปลงปลูกหญ้าของสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำดินมาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แล้วทำการร่อนดินด้วยตะแกรงขนาดช่องตา 0.5 เซนติเมตร แบ่งตัวอย่างดินที่ผึ่งลมให้แห้งส่วนหนึ่ง มาร่อนด้วยตะแกรงขนาดช่องตา 2 มิลลิเมตรนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมี และกายภาพของดิน (ภาคผนวก ข ตารางที่ 1-3) สำหรับที่ดินผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาดช่องตา 0.5 เซนติเมตร นำมาทำการทดลองโดยปลูกถั่วหรั่ง พันธุ์สงขลา 1 จำนวน 4 เมล็ด ในกะละมังพลาสติกซึ่งบรรจุดิน 20 กิโลกรัม ก่อนปลูกคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ NC-92 หลังจากถั่วเจริญเติบโตได้ 7 วัน ถอนแยกต้นถั่วออกให้เหลือกะละมังละ 2 ต้น โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ มี 9 กรรมวิธี คือ

1. คลุกเมล็ดถั่วหรั่งด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ด
2. แช่เมล็ดถั่วหรั่งด้วยสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.
3. ไม่คลุกเมล็ดถั่วหรั่งด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ด เมื่อถั่วหรั่งอายุ 60 วัน ฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.
4. ไม่คลุกเมล็ดถั่วหรั่งด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ด เมื่อถั่วหรั่งอายุ 60 วัน ฉีดพ่นด้วยสูตรตำรับฉีดพ่น
5. ไม่คลุกเมล็ดถั่วหรั่งด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ด เมื่อถั่วหรั่งอายุ 60 วัน ฉีดพ่นด้วยสารฆ่าเชื้อรา iprodione
6. คลุกเมล็ดถั่วหรั่งด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ด เมื่อถั่วหรั่งอายุ 60 วัน ฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.
7. คลุกเมล็ดถั่วหรั่งด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ด เมื่อถั่วหรั่งอายุ 60 วัน ฉีดพ่นด้วยสูตรตำรับฉีดพ่น

8. คลุกเมล็ดถั่วหรั่งด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ดเมื่อถั่วหรั่งอายุ 60 วัน ฉีดพ่นด้วยสารฆ่าเชื้อรา iprodione

9. ไม่คลุกเมล็ดถั่วหรั่งด้วยสูตรตำรับคลุกเมล็ด (ชุดควบคุม)

โดยสูตรตำรับคลุกเมล็ด ฉีดพ่น สารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และสารฆ่าเชื้อรา iprodione ที่ใช้ในกรรมวิธีต่าง ๆ มีอัตราดังนี้ สูตรตำรับคลุกเมล็ด อัตรา 1 กรัม/เมล็ด 10 กรัม สูตรตำรับฉีดพ่น ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร/ซ้ำ สารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 10^6 cfu/มิลลิลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร/ซ้ำ และสารฆ่าเชื้อรา iprodione อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร/ซ้ำ

ในแต่ละกรรมวิธีกำหนดให้มีการปลูกเชื้อรา *R. solani* ที่เลี้ยงบนกากใยปาล์ม ในอัตรา 15 กรัม/กอ โดยโรยเชื้อราสาเหตุรอบ ๆ ทรงพุ่มถั่วหรั่ง เมื่อถั่วหรั่งอายุ 58 วัน ในระหว่างการทดลองมีการให้น้ำแบบพ่นฝอย เช้า เที่ยง เย็น ของทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวัดความรุนแรงของการเกิดโรค โดยการนับจำนวนก้านของต้นถั่วหรั่งที่แสดงอาการของโรค และวัดพื้นที่ใบถั่วหรั่งที่ถูกเชื้อสาเหตุเข้าทำลายด้วยเครื่องวัดพื้นที่ใบ เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนของถั่วหรั่งส่วนที่อยู่เหนือดิน โดยนำพืชไปย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกจนใสแล้วนำไปกลั่นตามคู่มือการวิเคราะห์ดินและพืช (จำเป็น อ่อนทอง, 2545) แล้วนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Mutiple Rang Test (DMRT)