การเตรียมสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

Formulation of Antagonist *Bacillus* spp. Against Fungal Pathogens of Rice

ประเสริฐ จริยะเลอพงษ์

Prasert Jariyalerpong

Order Key 21860
BIB Key 161233

เลขหมู่ QB608.R5 ป46
เลขทะเบียน 89A2 ฉ.2
- 9 ส.ค. 2542

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2542

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเตรียมสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

ผู้เขียน นายประเสริฐ จริยะเลอพงษ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(นางนลินี จาริกภากร)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(นางนลินี จาริกภากร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเตรียมสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าว
ผู้เขียน นายประเสริฐ จริยะเลอพงษ์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารสูตร Mckeen บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 6-12 ชั่วโมง และให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่น (OD_{660}) ได้ 4.09 และ 4.33 ตามลำดับ น้ำหมักของ *Bacillus* ทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ (*Pyricularia grisea*) และโรคกาบใบแห้ง (*Rhizoctonia solani*) ได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง อาหาร Mckeen ที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 7.0 เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่นได้ 5.68 และ 6.16 ตามลำดับ ความสามารถในการทนร้อนของเชื้อ *Bacillus* spp. พบว่าเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สามารถฆ่าเซลล์ของ *Bacillus* spp. ได้หมด และเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที สามารถฆ่าสปอร์ของ *Bacillus* spp. ได้หมด การทดลองผลของสารเคมีต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23 พบว่าสารที่มีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดข้าวน้อยที่สุด คือ โปแตสเซียมซอร์เบท tween 80 คาราจีแนน และกลีเซอรอล ให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดเป็น 9.11 8.79 9.04 และ 9.11 และมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเป็น ร้อยละ 99 98 99 และ 96 ตามลำดับ สำหรับสูตรเชื้อที่ประกอบด้วย โปแตสเซียมซอร์เบท ร้อยละ 0.1 tween 80 ร้อยละ 0.1 คาราจีแนน ร้อยละ 1.0 กลีเซอรอล ร้อยละ 0.3 และ *B. subtilis* NSRS 89-24 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร สามารถควบคุมโรคข้าวในเรือนทดลองได้ดีที่สุด โดยหลังการฉีดสูตรเชื้อเป็นเวลา 3 สัปดาห์สามารถลดการ

เกิดใบไหม้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีเชื้อ จากขนาดแผลของโรค 0.21 ตารางเซ็นติเมตร เหลือ 0.05 ตารางเซ็นติเมตร และจาก 1.64 ตารางเซ็นติเมตร เหลือ 0.84 ตารางเซ็นติเมตร ในใบที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันเมื่อทดสอบกับโรคกาบใบแห้ง สามารถลดความยาวของแผลจาก 3.71 เซ็นติเมตร เหลือ 1.06 เซ็นติเมตร หลังการทดลอง 4 สัปดาห์

เชื้อ *Bacillus* spp. ในสูตรเชื้อสามารถคงตัวต่อแสงแดดได้ดีกว่าเชื้อปกติ โดยปริมาณเชื้อจะลดลงไม่ถึง 1 log cycle เมื่อได้รับแสงแดดนาน 2 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อปกติปริมาณเชื้อจะลดลงถึง 1 log cycle สำหรับการเก็บรักษาสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 เดือน พบว่าสูตรเชื้อทุกสูตร มีปริมาณเชื้อลดลง 5 log cycle และเมื่อนำ *Bacillus* spp. ที่เก็บรักษาในสูตรเชื้อดังกล่าวมาเลี้ยง พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ตามปกติ และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* ได้ไม่แตกต่างจากเชื้อปกติ

Thesis Title	Formulation of Antagonist *Bacillus* spp. Against Fungal Pathogens of Rice
Author	Mr. Prasert Jariyalerpong
Major Program	Biotechnology
Academic Year	1998

Abstract

Cultivation of *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 and *Bacillus* sp. LN 007 in Mckeen medium at 35 °C and 200 rpm showed that growth was increased rapidly at 6 to 12 hr of cultivation and had the highest optical density at 36 hr with OD_{660} of 4.09 and 4.33, respectively. The ability to inhibit causal agents of rice diseases, leaves blast (*Pyricularia grisea*) and sheath blight (*Rhizoctonia solani*) was highest at 48 hr. Both of *B. subtilis* NSRS 89-24 and *Bacillus* sp. LN 007 grew well in the Mckeen medium with the initial pH of 7.0 and showed the highest optical density at 36 hr with OD_{660} of 5.68 and 6.16, respectively. The heat treatment that was capable to kill the vegetative cells of *Bacillus* spp. was at the temperature of 90 °C for 20 min. While the heat treatment at 110 °C for 30 min could kill all spores of *Bacillus* spp. The effects of chemical components of formulations on germination of rice seed cultivar RD 23 were tested. The best chemicals with least effect on germination were potassium sorbate, tween 80, carrageenan and glycerol. They showed the germination index of 9.11, 8.79, 9.04 and 9.11 and the germination percentage of 99%, 98%, 99% and 96%, respectively. In greenhouse experiments, the formulation of antagonist *Bacillus* spp. composed of 0.1% potassium sorbate, 0.1% tween 80, 1.0% carrageenan, 0.3% glycerol and *B. subtilis* NSRS 89-24 10^8

CFU/ml showed the best ability to control leaves blast and sheath blight deseases of rice. After spraying for 3 weeks the leaves blast was reduced from 0.21 cm^2 to 0.05 cm^2 lesion area per leave on the second leave and from 1.64 cm^2 to 0.84 cm^2 lesion area per leave on the third leave. When applied to sheath blight disease, it decreased the lesion length from 3.71 cm to 1.06 cm after 4 weeks. After exposing to sunlight for 2 hr the *Bacillus* spp. in the formulations was reduced by less than 1 log cycle while in the control treatment was reduced 1 log cycle. When the formulations of antagonist *Bacillus* spp. were kept at room temperature for 12 months every formulation had the viable cell count of *Bacillus* spp. reduced by 5 log cycles. When the *Bacillus* spp. in the stored formulations were cultivated the bacteria grew normally and the culture supernatants could inhibited growth of *P. grisea* and *R. solani* not significantly different from the control treatment.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล และคุณนลินี จาริกภากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือด้านการปฏิบัติการทดลองตลอดระยะเวลาของการทำงานโครงการวิจัยรวมทั้งการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยตรวจสอบวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุงทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และให้คำปรึกษาด้วยดีในการทำการทดลอง ตลอดจนอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มูลนิธิมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนวิจัย

ขอขอบคุณ พ่อ แม่ ญาติพี่น้อง อาจารย์ เพื่อนๆ และทุกๆ คนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

ประเสริฐ จริยะเลอพงษ์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
1. โรคข้าวที่สำคัญ	3
1.1 โรคใบไหม้	3
1.2 โรคกาบใบแห้ง	6
2. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี	8
2.1 ความหมายของการควบคุมโดยชีววิธี	8
2.2 ลักษณะการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี	9
2.3 ปัญหาการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี	13
3. การปรับปรุงการควบคุมโรคโดยชีววิธี	13
3.1 การปรับปรุงกิจกรรมการควบคุมโรคโดยชีววิธี	13
3.2 การปรับปรุงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์	14
4. ชนิดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช	16
4.1 เชื้อแบคทีเรีย	16

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 เชื้อรา	18
4.3 ยีสต์	18
5. หลักทั่วไปในการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรคพืช	19
6. วิธีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์	20
6.1 บริเวณผิวราก	20
6.2 บริเวณผิวพืชอยู่เหนือดิน	21
7. ลักษณะและคุณสมบัติของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis*	21
8. การพัฒนาชีวภัณฑ์	24
8.1 ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการพัฒนาชีวภัณฑ์	25
8.2 การใช้สารเคมีในการยืดอายุการเก็บรักษาเชื้อ	27
วัตถุประสงค์	30
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	31
วัสดุ	31
อุปกรณ์	32
วิธีการทดลอง	33
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	46
4. สรุป	93
เอกสารอ้างอิง	95
ภาคผนวก ก	108
ภาคผนวก ข	111
ประวัติผู้เขียน	115

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชีวภัณฑ์ที่ผ่านการยอมรับจากสำนักงานพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา	26
2	การพัฒนาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของบริษัทต่างๆ เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช	28
3	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007	48
4	ผลของสารเคมีในกลุ่ม preservative ต่อการงอกและความแข็งแรงของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23	64
5	ผลของสารเคมีในกลุ่ม emulsifier ต่อการงอกและความแข็งแรงของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23	66
6	ผลของสารเคมีในกลุ่ม binder ต่อการงอกและความแข็งแรงของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23	68
7	ผลของสารเคมีในกลุ่ม protectant ต่อการงอกและความแข็งแรงของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23	69
8	ส่วนประกอบของสูตรต่างๆ	70
9	ผลของสูตรต่างๆ ต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23	71
10	ส่วนประกอบของสูตรต่างๆ ที่จะใช้ทดสอบกับต้นข้าว	73
11	ผลของสูตรที่จะใช้ผลิตสูตรเชื้อต่อต้นข้าวพันธุ์ กข 23	74
12	ส่วนประกอบของสูตรต่างๆ ที่จะใช้เตรียมสูตรเชื้อ *Bacillus* spp.	75
13	ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาสูตรเชื้อต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ที่อยู่ในสูตรเชื้อต่างๆ	77
14	ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาสูตรเชื้อต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ที่อยู่ในสูตรเชื้อต่างๆ	77
15	ผลของสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23	79

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	ผลของสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ต่อต้นข้าวพันธุ์ กข 23 ที่ปลูกเชื้อ *P. grisea* หลังฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งแรก 7 14 และ 21 วัน	82
17	ผลของสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ต่อต้นข้าวพันธุ์ กข 23 ที่ปลูกเชื้อ *R. solani* หลังฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งแรก 7 14 21 และ 28 วัน	86
18	การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดยเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เก็บรักษาในสูตรเชื้อนาน 12 เดือน	90

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
1	การเจริญของเซลล์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007	111
2	การเจริญของสปอร์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007	112
3	ราคาสารเคมีต่อสูตรเชื้อ 1000 มิลลิลิตร	113

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	วงจรการเกิดโรคใบไหม้จากเชื้อ *P. grisea*	5
2	วงจรการเกิดโรคกาบใบแห้งจากเชื้อ *R. solani*	7
3	ขนาดบาดแผลมาตรฐานของโรคใบไหม้	42
4	แปลงล่อเชื้อโรคใบไหม้ข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง และลักษณะการเกิดโรคใบไหม้ข้าว	43
5	การเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007	47
6	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* โดยน้ำหมักของ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007	50
7	ผลของความร้อนต่อการรอดชีวิตของเซลล์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007	52
8	ผลของความร้อนต่อการรอดชีวิตของสปอร์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007	54
9	การเจริญของเซลล์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ที่พีเอชต่างๆ	56
10	การเจริญของสปอร์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ที่พีเอชต่างๆ	57
11	การทนต่อรังสี UV ของเซลล์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007	59
12	การทนต่อรังสี UV ของสปอร์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007	60
13	การทนแสงแดดของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007	62
14	การเกิดโรคใบไหม้ในต้นข้าวพันธุ์ กข 23 หลังฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งแรก 21 วัน	83

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
15	การเกิดโรคกาบใบแห้งในต้นข้าวพันธุ์ กข 23 หลังฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งแรก 28 วัน	87
16	การเจริญของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ที่เก็บรักษาในสูตรเชื้อนาน 12 เดือน	89
17	การทนแสงแดดของสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007	92

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ข้าว (*Oryza sativa* Linn.) เป็นธัญพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศมีการเพาะปลูกทั่วไปในทุกภูมิภาคของประเทศไทย เนื่องจากเป็นอาหารหลักของคนไทยและเป็นพืชเศรษฐกิจหลักซึ่งเป็นสินค้าส่งออกเป็นอันดับ 4 ของประเทศ นอกจากนั้นประเทศไทยยังส่งข้าวเป็นสินค้าส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลกคิดเป็นมูลค่าหลายหมื่นล้านบาท (นพดล พีรเสถียร, 2535 ; กรมวิชาการเกษตร, 2535) ในปีการเพาะปลูก 2539-2540 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวทั้งหมด 57.291 ล้านไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2540) และในปีการเพาะปลูก 2540-2541 ประเทศไทยมีการเพาะปลูกข้าวทั้งหมด 57.172 ล้านไร่ สำหรับการส่งออกข้าวในปี 2541 ประเทศไทยส่งข้าวออกรวม 5,205,689 ตัน คิดเป็นมูลค่า 71,450.24 ล้านบาท (อัจฉรา วิรัตน์พงษ์, 2541) ในแต่ละปีความเสียหายซึ่งเกิดจากแมลงศัตรูพืชและโรคพืชคิดเป็นมูลค่าประมาณ 4,000-5,000 ล้านบาท ปัญหาหลักในการผลิตข้าวในปัจจุบันคือการระบาดของโรคข้าว ซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นกับชาวนาทั่วทุกภาคของประเทศไทย ทำให้ผลผลิตข้าวลดต่ำลง (บุญชัย แซ่ด่าน, 2535) ทำให้ผลผลิตข้าวที่ได้มีคุณภาพต่ำและไม่เป็นที่ต้องการของตลาด นอกจากนี้เชื้อโรคบางชนิดยังสามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อชีวิตมนุษย์และสัตว์ (นลินี จาริกภากร, 2532) โรคข้าวที่ทำความเสียหายและระบาดอย่างกว้างขวางคือ โรคใบไหม้และโรคกาบใบแห้งซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* และ *Rhizoctonia solani* ตามลำดับ ในอดีตการป้องกันกำจัดศัตรูพืชมักใช้สารเคมีเป็นหลัก แต่ในปัจจุบันประชากรโลกเริ่มตระหนักถึงมลพิษที่เกิดจากการใช้สารเคมีซึ่งก่อให้เกิดปัญหาต่อสภาพแวดล้อมและทำลายระบบสมดุลย์ตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการป้องกันและการกำจัดโรคพืชโดยชีววิธีจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการแก้ไข

ปัญหาต่างๆ ในระบบการเกษตรแผนใหม่ อีกทั้งยังสามารถแก้ปัญหาการเกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันการศึกษาและวิจัยการควบคุมโรคข้าวโดยชีววิธีได้แพร่หลายมากขึ้น ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุงได้มีการแยกเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* จากแปลงทดลองข้าวพบว่า เชื้อ *B. subtilis* จำนวน 3 สายพันธุ์คือ *B. subtilis* NSRS 89-24 *B. subtilis* NSRS 89-26 และ *B. subtilis* NSRS B_1 (Charigkapakorn *et al.*, 1991; นลินี จาริกภากร และคณะ, 2535) แสดงความสามารถในการทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการแพร่กระจายของเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคข้าวทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* จึงได้ทำการศึกษาเบื้องต้นทั้งในระดับแปลงทดลองและห้องปฏิบัติการพบว่าปฏิปักษ์ *B. subtilis* สามารถควบคุมโรคข้าวที่สำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น ลดการใช้ปุ๋ยซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิต (นลินี จาริกภากร และคณะ 2537)

ในการวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาถึงเทคนิคการผลิตสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้โดยคุณนลินี จาริกภากร กรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง และ *Bacillus* sp. LN 007 ซึ่งแยกได้โดยอาจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และการนำไปใช้ในรูปแบบที่เหมาะสม ตลอดจนความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อ ในสูตรเชื้อภายใต้สภาวะต่างๆ

ตรวจเอกสาร

พืชที่ปลูกโดยทั่วไปมักจะมีศัตรูพืชเข้าทำลายก่อให้เกิดการเสียหายทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ "โรคพืช" จัดเป็นศัตรูพืชที่สำคัญเนื่องจากสามารถทำให้พืชเสียหายตั้งแต่เริ่มเพาะปลูกจนกระทั่งหลังการเก็บเกี่ยว ตลอดจนขณะอยู่ในระหว่างเก็บรักษา ขนส่ง หรือจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด การควบคุมโรคพืชมีหลายวิธี แต่เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมควบคุมโรคพืชต่างๆ โดยการใช้สารเคมี เนื่องจากใช้ง่ายได้ผลเร็ว (นิพนธ์ ทวีชัย, 2539) ประเทศไทยมีการนำเข้าสารเคมีเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชในปริมาณที่มาก มูลค่าการนำเข้าเพิ่มขึ้นทุกๆ ปี ปีละประมาณห้าพันล้านบาท ข้อมูลล่าสุดในปี พ.ศ. 2539 มีการนำเข้าเป็นมูลค่าประมาณ 197.5 ล้านดอลล่าร์สหรัฐหรือ 5,095.5 ล้านบาท (ธวัชชัย สิชฌวัฒน์, 2541) เมื่อมีการใช้มากทำให้เกิดปัญหาติดตามมาคือ สารเคมีเหล่านี้นอกจากเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ ยังมีผลกระทบต่อผู้บริโภค ซึ่งอาจได้รับพิษจากสารเคมีที่ตกค้างในพืชผักต่างๆ และยังตกค้างในดินและน้ำ ก่อให้เกิดปัญหาสภาพแวดล้อมเป็นพิษ ดังนั้นในปัจจุบัน การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี จึงได้รับความสนใจและสนับสนุนจากประเทศต่างๆทั่วโลก นอกจากจะเป็นการส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติในการควบคุมและกำจัดโรคพืชและศัตรูพืชแล้วยังเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

1. โรคข้าวที่สำคัญ

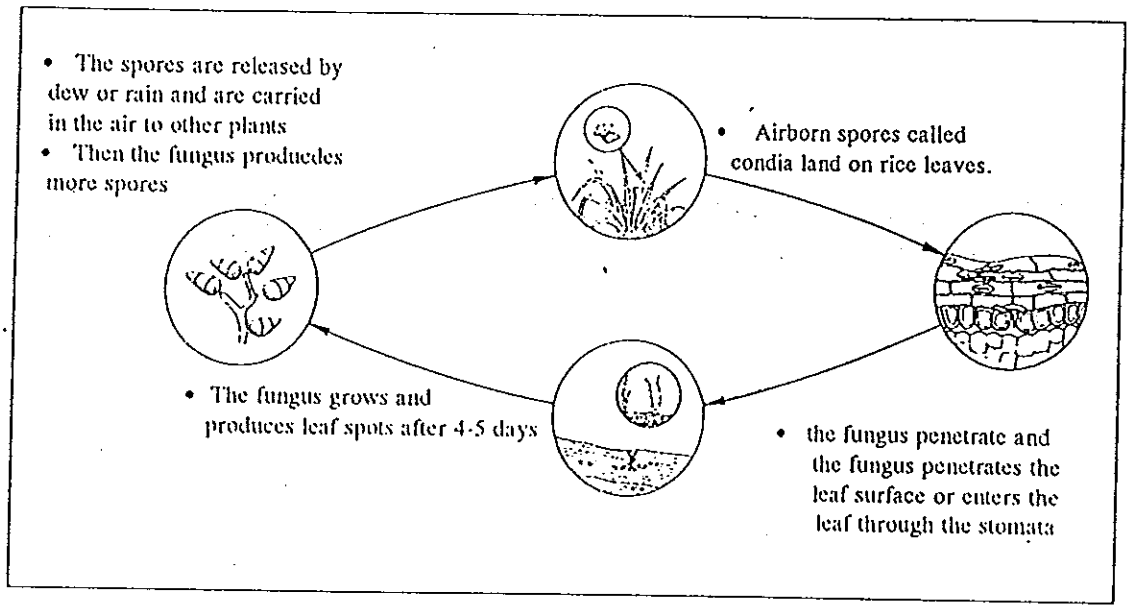
สำหรับพืชที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการใช้ชีววิธีเพื่อการควบคุมโรคพืช คือ ข้าว เนื่องจากข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ และเป็นอาหารหลักของคนไทยทั่วทุกภาค ซึ่งปัญหาหลักในการผลิตข้าวคือ การระบาดของโรคข้าว โรคที่ระบาดและก่อความเสียหายต่อนาข้าวอย่างกว้างขวาง ทำให้สูญเสียผลผลิตเป็นมูลค่ามหาศาลคือ

1.1 **โรคใบไหม้** (leaf blast) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* เป็นโรคที่ทำความเสียหายแก่ประเทศที่ปลูกข้าวมากกว่า 70 ประเทศทั่วโลก โรคนี้ได้รับการลำดับความสำคัญว่าเป็นโรคข้าวที่รุนแรงที่สุดโรคหนึ่ง เนื่องจากมีการระบาดทำความเสียหายทั่วทุกแห่งที่มีการ

เพาะปลูกข้าว เชื้อราสามารถเข้าทำลายต้นข้าวทั้งในระยะต้นกล้า ระยะแตกกอและระยะออกรวง ในประเทศไทยพบโรคนี้ระบาดรุนแรงมากในฤดูฝน เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ข้าวแทบทุกระยะของการเจริญเติบโต ทั้งในระยะต้นกล้าและออกรวง (ประพาส วีระแพทย์, 2531)

ลักษณะอาการของโรค การทำลายของเชื้อ *P. grisea* ก่อให้เกิดอาการเป็นจุดช้ำ เกิดเป็นแผลสีซีดแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จะมีลักษณะเป็นแผลที่ใบคล้ายสลักของแกนที่ใช้ปั่นฝ้าย ตรงกลางแผลกว้างและมีปลายทั้งสองข้างแคบลงและแหลม บริเวณกลางแผลเป็นสีเทา ทำให้มองเห็นคล้ายรูปตา แผลขนาดใหญ่มีความยาวประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร แผลเป็นสีน้ำตาลหรือสีเทา เมื่อแผลเหล่านี้ขยายใหญ่ขึ้นจะเชื่อมต่อกัน จึงมองเห็นเป็นลักษณะของใบที่แห้งไหม้ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดอาการไหม้หรือเน่าที่คอรวง โดยที่เชื้อราเข้าทำลายบริเวณข้อที่คอรวง เกิดเป็นแผลสีน้ำตาลทำให้คอรวงหักพับและลีบ (ลือชัย อารยะสังสฤษฎ์ และ สุภาพร จันทร์บัวทอง, 2538) ปี พ.ศ. 2535 พบโรคไหม้ระยะคอรวงระบาดทำความเสียหายแก่นาข้าวในเขตภาคเหนือตอนบนและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทั้งหมด 12 จังหวัด รวมพื้นที่เสียหายเนื่องจากโรคนี้ประมาณ 1.37 ล้านไร่ การระบาดทำลายข้าวของโรคไหม้ เกิดจากการปลิวของโคนิเดียรา(conidia) ไปกับลม ซึ่งความรุนแรงและความเสียหายเนื่องจากการปลูกข้าวที่หนาแน่น ข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อโรค และการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนปริมาณที่สูง (Prathasarathy and Ou, 1965) นอกจากนั้นสาเหตุของการระบาด เนื่องจากสภาวะอากาศแปรปรวน อุณหภูมิและความชื้น ก่อให้เกิดสภาพที่เหมาะสมต่อการแพร่ระบาดของเชื้อรา (สมคิด ดิสถาพร, 2536)

วงจรการเกิดโรค เริ่มจากสปอร์ที่เรียกว่า conidia ถูกปลดปล่อยจากพืชที่เป็นโรค ซึ่งมักเกิดในเวลากลางคืนในขณะที่มีน้ำค้างหรือน้ำฝน และถูกลมพาไปตกบนต้นพืช เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม conidia จะเริ่มงอกโดยสร้าง germ tube ออกมา ที่ปลาย germ tube จะมีการสร้าง appressorium ซึ่งเป็นส่วนที่มีบทบาทในการช่วยยึดเกาะกับส่วนของพืช หลังจากนั้นเชื้อราจะสร้างส่วนที่เป็นเส้นใยบางๆ เป็นปมเล็กๆ (peg penetration) แทงเข้าไปในผนัง



รูปที่ 1 วงจรการเกิดโรคใบไหม้จากเชื้อ *P. grisea* (ที่มา : Ou, 1973)

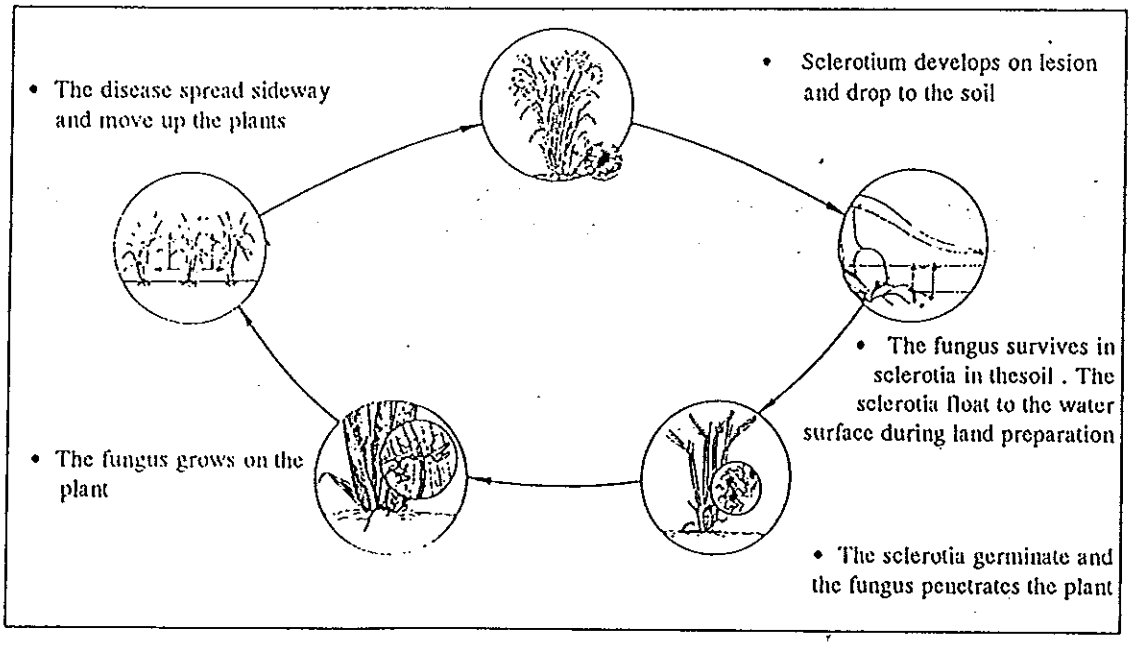
ชั้นนอกของ epidermal cell และเข้าไปเจริญภายในเซลล์ของ host เมื่อเจริญเต็มที่จะมีการสร้าง conidia พร้อมจะเข้าสู่วงจรของโรคอีกต่อไป (รูปที่ 1) (Ou, 1973)

วิธีการป้องกันกำจัดโรคใบไหม้ มักมุ่งเน้นการใช้พันธุ์ต้านทาน เช่น กข 7 และ กข 13 วิธีการเขตกรรม ไม่ควรตกกล้าข้าวจนหนาแน่นเกินไป และไม่ควรใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในอัตราที่สูงเกินไป (นลินี จาริกภากร, 2532) รวมทั้งการใช้สารเคมีควบคุมเชื้อรา การป้องกันควบคุมโรคใบไหม้โดยใช้สารเคมี ซึ่งนิยมใช้ Blasticin S, Kitazin P, Hinosan, Rabcide, Oryzaemate, Fujione และ Kasugamycin (C.A.B, 1985) หรือการใช้ร่วมกันแบบผสมผสาน (integrated control) แต่เนื่องจากเชื้อราสาเหตุของโรคใบไหม้มีหลายสายพันธุ์ จึงมีความสามารถในการทำลายพันธุ์ข้าวได้แตกต่างกันไป พันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้จะต้านทานอยู่ได้ระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งต่อมาก็จะอ่อนแอต่อเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถพัฒนาและปรับตัวได้ในเวลาต่อมา (ณรงค์ สิงห์บุระอุดม และคณะ, 2538) จึงจำเป็นต้องหากรรมวิธีการป้องกันกำจัดโรคที่ได้ผลดีในทุกๆ ด้าน นั่นคือการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) เข้าควบคุมการเกิดโรค

1.2 **โรคกาบใบแห้ง** (sheath blight) เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* เป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ พบว่ามีการแพร่ระบาดทำความเสียหายในนาข้าวเพิ่มขึ้นทุก ๆ ปี

ลักษณะอาการของโรค การระบาดจะระบาดทั้งในระยะต้นข้าวแตกกอจนถึงตั้งท้องออกรวง โดยจะติดไปกับเมล็ดพันธุ์ ตอซัง และวัชพืช อาการของโรคจะเกิดแผลสีเขียวปนเทาและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลไหม้บริเวณกาบใบใกล้ๆ ระดับน้ำในนา แผลมีลักษณะเป็นรูปไข่ยาวประมาณ 1-3 เซนติเมตร แผลสามารถขยายใหญ่จนมีขนาดไม่จำกัดและอาจลุกลามถึงกาบหุ้มรวงและใบข้าวได้ในภายหลัง ขอบของแผลจะมีสีต่างกันตามพื้นที่ที่เกิดโรค แผลสามารถขยายลุกลามถึงกาบหุ้มรวงและใบข้าว อาการของโรคจะสังเกตได้ชัดเจนในระยะที่ข้าวตั้งท้องและออกรวง

วงจรของโรค เริ่มจาก sclerotium ของ *R. solani* ซึ่งอยู่ตามพื้นดินติดเข้าสู่ส่วนลำต้นของต้นข้าว เมื่อสภาวะเหมาะสม sclerotium จะเจริญเป็นเส้นใยและเจริญยึดติดกับชั้น epidermis ซึ่งมักจะเป็นส่วนด้านในของกาบใบ หลังจากเจริญขึ้นสู่ลำต้นเป็นระยะทางหนึ่ง



รูปที่ 2 วงจรการเกิดโรคใบไหม้จากเชื้อ *R. solani* (ที่มา : Ou, 1973)

แล้วเส้นใยจะมีการสร้างแขนงแตกออกไปเรื่อยๆ การเจริญของเส้นใยช่วงนี้เรียกว่า infection cushions จากนั้นจะสร้าง peglike appressorrium จากเส้นใยของ infection cushions เจาะผ่านชั้น epidermis เข้าไปเจริญภายในเซลล์ของกาบใบจนผลิต sclerotium พร้อมจะเข้าวงจรของโรคต่อไป (รูปที่ 2) (Matsuura, 1986)

วิธีการป้องกันกำจัดโรคที่สำคัญคือ การใช้สารเคมี ได้แก่ Benomyl, Chingfengmeisu, Jinggangmycin, Polyoxin และ Validamycin นอกจากนี้การใช้พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อโรค เช่น กข 3 กข 5 กข 13 นางพญา 132 และ แก่นจันทร์ หรืออาจใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อราสาเหตุโรคข้าวในการควบคุมโรค (นลินี จาริกภากร, 2532)

2. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

2.1 ความหมายของการควบคุมโดยชีววิธี

ทางกีฏวิทยามีแนวโน้มที่จะใช้ในความหมายสำหรับผลของการใช้ตัวเบียน ตัวห้ำ หรือเชื้อโรคในการปรับระดับความหนาแน่นของประชากรสิ่งมีชีวิตของแมลงศัตรูพืช ให้อยู่ในระดับต่ำกว่าระดับเศรษฐกิจหรือลดลงหรือหมดไป ส่วนทางด้านโรคพืชจะรวมไปถึงสารปฏิชีวนะที่ถูกใช้จากการผลิต ทั้งที่ถูกสร้างขึ้นโดยตัวเชื้อหรือกระตุ้นให้ฝ่ายตรงข้ามเป็นตัวสร้าง หรือจากปฏิกิริยาสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น แล้วกระตุ้นให้พืชอาศัยเป็นตัวสร้าง การพัฒนาพืชและสัตว์ให้มีความต้านทานต่อเชื้อโรคหรือตัวเบียนและรวมไปถึงผลของสารเคมีที่เป็นพิษที่สร้างโดยสิ่งมีชีวิต เพื่อควบคุมเชื้อโรค (De Bach, 1965 อ้างโดย นลินี จาริกภากร, 2533)

Cook และ Baker (1983) ได้ให้ความหมายของการควบคุมโดยชีววิธีคือการลดปริมาณเชื้อก่อโรค หรือกิจกรรมของเชื้อโรคโดยสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่า ซึ่งรวมถึงการจัดการทางพันธุวิศวกรรมของพืชชั้นสูงโดยการถ่ายโอนยีนที่มีความต้านทานโรคพืชเข้าไปและวิธีการทางเขตกรรม เช่นการปลูกพืชปกคลุมพื้นที่เพื่อขัดขวางการเจริญเติบโตของวัชพืช

การนำจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุม ในปี ค.ศ. 1949 Steinhaus ได้ให้คำจำกัดความของการควบคุมโดยใช้จุลินทรีย์ว่า "การควบคุมโดยการใช้จุลินทรีย์เป็นส่วนหนึ่งของการควบ

คุมโดยชีววิธี เป็นการใช้จุลินทรีย์โดยมนุษย์เพื่อการควบคุมและรักษาระดับจำนวนของสัตว์หรือพืชในพื้นที่แห่งหนึ่ง (จิราพร เพชรรัตน์, 2534)

2.2 **ลักษณะการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี**

โดยทั่วไปในธรรมชาติมักมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการควบคุมโรคพืชหรือมีความสามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ นิยมเรียกจุลินทรีย์ชนิดนี้ว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganisms) หรือเชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) โดยทั่วไปกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ต่อต้านเชื้อสาเหตุของโรคพืช มีอยู่ 3 รูปแบบ ได้แก่ ฆ่า ทำให้เกิดบาดแผลและยับยั้ง โดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีผลต่อจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง โดยปราศจากการเน้นกระบวนการที่เกี่ยวข้องอย่างเฉพาะเจาะจง (นลินี จาริกภากร, 2533) กระบวนการหรือกลไกควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สามารถแบ่งออกได้ 4 ลักษณะดังนี้

2.2.1 **กระบวนการแข่งขัน** (Competition) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่างๆ เช่น การใช้อากาศ การครอบครองพื้นที่ และที่สำคัญคือการใช้ธาตุอาหารได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญหรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ พืชจะเจริญเติบโตแข็งแรงมีผลผลิตสูงขึ้น การแข่งขันที่พบมากคือการนำธาตุอาหารหรือสารต่างๆ ที่มีอยู่ในดินหรือในสภาพแวดล้อมนั้นมาใช้ประโยชน์ในการเจริญทำให้เชื้อโรคขาดสารอาหารไม่สามารถเจริญเข้าทำลายพืช กระบวนการแข่งขัน แบ่งออกเป็น

2.2.1.1 การสร้าง siderophore ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำมีความสามารถในการจับกับ ferric ion (Fe^{+3}) ได้ดี ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำ Fe^{+3} เข้าไปใช้ภายในเซลล์ของแบคทีเรียโดยกระบวนการ active transport เนื่องจากธาตุเหล็กมีมากในดินแต่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ จุลินทรีย์จึงไม่สามารถนำไปใช้ได้จึงจำเป็นต้องอาศัย siderophore เป็นตัวช่วย (Kloepper *et al.*, 1980)

Siderophores ส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียซึ่งมีหลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่ pyochelin, pyoverdins, pseudobactins, desferrioxamine E และ cepabactin ทั้งหมดนี้ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Pseudomonads นอกจากนี้ยังพบ siderophores ที่ผลิตโดยแบคทีเรียพวก Enterobacteriaceae คือ aerobactin และ enterobactin (Buyer *et al.*, 1991) กระบวนการ

สร้าง siderophores ในการควบคุมโรคพืช เช่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* จะผลิตสาร siderophore ที่ช่วยในการจับยึดธาตุเหล็ก ในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* สาเหตุโรคเหี่ยวของข้าวสาลี (Schippers *et al.*, 1987) ทำให้เชื้อรานี้ไม่สามารถทำลายรากของข้าวสาลี ช่วยให้ข้าวสาลีเจริญเป็นปกติ ให้ผลผลิตดีขึ้น จึงนิยมเรียกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีลักษณะแบบนี้ว่าแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) โดยแบคทีเรียพวกนี้ชอบอาศัยอยู่ในดินบริเวณผิวราก (rhizoplane) หรือบริเวณรอบราก (rhizosphere)

2.2.1.2 การแก่งแย่งธาตุอาหาร (nutrient competition) จุลินทรีย์โดยทั่วไปจำเป็นต้องใช้แหล่งคาร์บอนซึ่งได้รับจากคาร์โบไฮเดรทและกลูโคส เป็นสารอาหารหลักซึ่งมีอยู่อย่างจำกัดเป็นเหตุให้จุลินทรีย์เกิดการแก่งแย่งแข่งขันซึ่งกันและกันในการนำสารอาหารนี้มาใช้ จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้รวดเร็วและมีกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการนำเอาสารอาหารซึ่งมีอยู่อย่างจำกัดมาใช้ได้ย่อมมีผลกระทบต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Gilbert *et al.*,1990) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีกลไกหลักในการควบคุมโรคพืชแบบแก่งแย่งสารอาหารที่สำคัญคือ *Fusarium oxysporum* (Lemanceau *et al.*,1993) เช่น *F. oxysporum* F047bio ใช้ควบคุมเชื้อ *F. oxysporum* WES 816 ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าของมะเขือเทศ

2.2.2 **กระบวนการทำลายชีวิต** (Antibiosis) หมายถึง การที่เชื้อปฏิปักษ์มีการผลิตสารบางชนิดในกระบวนการเมตาบอลิซึมแล้วมีผลไปยับยั้งหรือทำลายสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจคัดเลือกมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้น จะเน้นคุณสมบัติการทำลายชีวิตของเชื้อโรคเป็นส่วนใหญ่ โดยเชื้อปฏิปักษ์นี้มีความสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือ สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่นำมาผลิตใช้เป็นยารักษาโรคกับมนุษย์ สัตว์ และพืชมากมายในปัจจุบัน สารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แบ่งออกเป็น

2.2.2.1 สารปฏิชีวนะ (antibiotic) สารปฏิชีวนะโดยทั่วไปหมายถึงสารประกอบอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลเล็ก ผลิตโดยจุลินทรีย์ แม้จะมีเพียงปริมาณเล็กน้อยก็สามารถทำลาย

หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ (Fravel, 1988) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้แก่ chaetomin จาก *Chaetomium globosum* (Di Pietro *et al.*, 1992) gliotoxin จาก *Gliocladium virens* (Ridout *et al.*, 1992) agrocin 84 จาก *Agrobacterium radiobacter* (Vicedo *et al.*, 1992) herbicolin A, B จาก *Erwinia herbicola* (Kempf *et al.*, 1993) จุลินทรีย์ที่ประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคพืชได้อย่างกว้างขวางส่วนใหญ่จะผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลกระทบต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช สำหรับการควบคุมโรคพืชจากแบคทีเรียโดยชีววิธีที่สำเร็จเป็นครั้งแรกเป็นกลไกที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 ผลิตสารปฏิชีวนะ bacteriocin ที่มีชื่อว่า agrocin 84 ไปยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* biotype 1 และ 2 สาเหตุโรคปุ่มปม (crown gall) ของพืช (Thomson, 1987) หรือในกรณีของการใช้ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ 2-79 ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ phenazine-1-carboxylate สามารถยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวของข้าวสาลีได้ถึงร้อยละ 50-90 (Cook *et al.*, 1995)

2.2.2.2 สารระเหย (volatile substance) การศึกษาวิจัยทางด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีพบว่าสารระเหยบางชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Howel และคณะ (1988) รายงานว่า สารระเหยแอมโมเนียซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *Pythium ultimum, Rhizoctonia solani* และ *Verticillium dahliae* Claydon และคณะ (1987) รายงานว่า alkyl pyrones ซึ่งเป็นสารระเหยที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิดโดยเฉพาะ *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคโคนเน่า (damping-off) ของผักกาดขาว นอกจากนั้นไฮโดรเจนไซยาไนด์ที่ผลิตจาก *Pseudomonas fluorescens* สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *Thielaviopsis basicola* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าของต้นยาสูบ (Schippers *et al.*, 1990)

2.2.3 **กระบวนการเป็นปรสิต** (Parasitism) เป็นวิธีการที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งได้รับประโยชน์จากจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งในรูปของสารอาหารและทำให้จุลินทรีย์ที่ถูกอาศัยถูก

ทำลายไปในที่สุด กระบวนการปรสิตมักจะพบได้มากในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลาย โดยเฉพาะการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อโรค เอนไซม์ตัวหลักที่สำคัญที่ทำหน้าที่นี้คือ เอนไซม์ chitinase และ β-1,3-glucanase ซึ่งจะย่อยสลาย chitin และ β-1,3-glucan ตามลำดับ ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในโครงสร้างผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราชั้นสูง (Tweddell *et al.*, 1992) และโครงสร้างผนังเซลล์ของ sclerotium (Benyagoub and Jabaji-Hare, 1992) ผลการย่อยขั้นสุดท้ายจะได้น้ำตาล glucose แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (parasite) เข้าไปเจริญอาศัยและทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบไม่มาก ได้แก่ *Erwinia urediniolytica* เข้าทำลาย pedicel ของสปอร์เชื้อราสนิม (rust) *Bdellovibrio bacteriovorus* เป็นปรสิตของแบคทีเรีย *P. syringae* pv *glycinea* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วเหลือง หรือเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* (Syn. *Bacillus penetrans*) ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม (Cook and Baker, 1983) แบคทีเรียเหล่านี้ยังไม่ได้รับความสนใจศึกษาปรับปรุงให้เกิดประโยชน์อย่างจริงจัง นอกจากแบคทีเรียแล้ว เชื้อราก็สามารถมีคุณสมบัติการเป็นปรสิต เช่น *Trichoderma harzianum* ซึ่งเป็นปรสิตของ เชื้อ *Rigidoporus lignosus* สาเหตุโรครากเน่าของยางพาราและโกโก้ (Adams, 1990)

2.2.4 **การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค** (Induced disease resistance) เป็นกลไกที่ปัจจุบันกำลังได้รับความสนใจศึกษากันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราหรือแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่เคยเป็นเชื้อโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคไปแล้ว สามารถชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น การกลายพันธุ์ในยีนเดียวของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ของพวกแตง (cucurbit) จะไม่ทำให้เกิดโรคแต่เชื้อจะเจริญอยู่ในพืชช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคเดิม (wild type) ได้ หรือในกรณีของแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรง (avirulant) ที่มีชีวิตอยู่ สามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine ปลดปล่อยออกมาที่บริเวณรากทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *P. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้ (Arwiyanto *et al.*, 1994)

2.3 **ปัญหาการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี**

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีในปัจจุบันมักพบปัญหาและอุปสรรคหลายประการ ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้ (นิพนธ์ ทวีชัย, 2539)

2.3.1 **ความน่าเชื่อถือ** (Reliability) เนื่องจากผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้เป็นสิ่งมีชีวิต มีความผันแปรได้ง่าย ถ้าหากไม่มีการควบคุมคุณภาพในการผลิตให้ดี แล้วจะทำให้ผลการควบคุมโรคแตกต่างกัน ก่อให้เกิดความไม่น่าเชื่อถือขึ้น นอกจากนี้การปฏิบัติต่างๆ หลังการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปแล้ว จะต้องมีการดูแลและปฏิบัติตามวิธีที่แนะนำไว้อย่างเคร่งครัด มิฉะนั้นจะทำให้การควบคุมโรคไม่ได้ผลดีหรือสม่ำเสมอทุกครั้งที่ใช้

2.3.2 **ประสิทธิภาพ** (Efficiency) การผลิตจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิดจะมีการใช้จุลินทรีย์ต่างชนิดต่างสายพันธุ์กัน ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชได้แตกต่างกัน หากผู้ทำการคัดเลือกไม่ระมัดระวังจะทำให้ได้เชื้อที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพไม่ดี เมื่อใช้ไปแล้วอาจสูญเสียคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้ หากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไม่ทนทานต่อสภาพแวดล้อม หรือจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สูญเสียชีวิตเร็ว ก็จะทำให้เสื่อมประสิทธิภาพเร็วตามไปด้วย ทำให้ควบคุมโรคไม่ได้ผล

2.3.3 **ขอบเขตในการควบคุมโรค** (Spectrum of activity) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับการคัดเลือกนำมาใช้มักจะมีคุณสมบัติควบคุมโรคได้เฉพาะโรค หรือเฉพาะเชื้อสาเหตุโรคใดโรคหนึ่งเท่านั้น แต่ก็มีการพยายามคัดเลือกหาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีขอบเขตในการควบคุมโรคได้กว้างขวางมากขึ้น คือสามารถควบคุมได้หลายพืช หลายโรค เพื่อทำให้ข้อจำกัดในการนำไปใช้ควบคุมโรคลดน้อยลง เกษตรกรอาจจะนิยมใช้มากขึ้น

3. การปรับปรุงการควบคุมโรคโดยชีววิธี

3.1 การปรับปรุงกิจกรรมการควบคุมโรคโดยชีววิธี

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สามารถนำมาเพิ่มกิจกรรมในการควบคุมโรคให้มากขึ้นได้หลายวิธี ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะเป็นการปรับปรุงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของเชื้อปฏิปักษ์ใน

ธรรมชาติซึ่งมีการศึกษาปรับปรุงในด้านปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีต่างๆ ดังนี้

3.1.1 **สภาพแวดล้อม** (Environment) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีควรจะเป็นเชื้อที่สามารถเจริญและควบคุมโรคได้ทุกสภาวะ ไม่ว่าจะมีอุณหภูมิร้อนหรือเย็น ชื้นหรือแล้ง ดินเป็นกรดหรือด่าง มีอาหารสมบูรณ์หรือขาดแคลน ดังนั้นควรคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ให้เหมาะสมกับสภาวะที่ต้องการนำไปใช้

3.1.2 **เชื้อสาเหตุโรค** (Pathogen) เชื้อสาเหตุโรคพืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคโดยชีววิธี ซึ่งเชื้อจะมีความแตกต่างกันที่ race, biovar หรือ pathovar ดังนั้น การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จะต้องมีการทดสอบให้สามารถควบคุมเชื้อโรคได้ทุก race, biovar หรือ pathovar จึงจะทำให้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

3.1.3 **พืชอาศัย** (Host) พืชอาศัยของเชื้อโรคจะเป็นแหล่งอาศัยของเชื้อโรค ดังนั้น การนำเชื้อปฏิปักษ์มาใช้จะต้องเป็นเชื้อที่สามารถอยู่ร่วมกับพืชต่างๆ เหล่านี้ได้ดี และจะดียิ่งขึ้นถ้าหากเจริญได้ดีกว่าเชื้อโรคในพืชทุกชนิด และทุกส่วนของพืช อย่างไรก็ตาม เชื้อปฏิปักษ์บางชนิดอาจเจริญได้ดีเฉพาะบนใบหรือส่วนที่อยู่เหนือดิน หรือบางชนิดชอบอยู่ในดินบริเวณรากที่อยู่ใต้ดิน ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อปฏิปักษ์จึงควรให้เหมาะสมกับสภาพที่จะนำไปใช้เพื่อให้ความคุ้มครองพืชได้เป็นอย่างดี

3.1.4 **เชื้อปฏิปักษ์** (Biocontrol agent) ความสามารถในการควบคุมเชื้อโรคของเชื้อปฏิปักษ์มักจะมีประสิทธิภาพไม่สูงนักเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมี และยังมีผลค่อนข้างแคบ หรือมีความเฉพาะเจาะจงมาก เมื่อนำมาใช้จึงค่อนข้างจะได้ผลไม่ค่อยสม่ำเสมอ ดังนั้นจึงมีความพยายามปรับปรุงกิจกรรมการควบคุมโรคของเชื้อปฏิปักษ์ให้มีคุณภาพสูงขึ้น และให้มีกิจกรรมการควบคุมได้กว้างขวางทุกพื้นที่ (นิพนธ์ ทวีชัย, 2538)

3.2 **การปรับปรุงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์**

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับการปรับปรุงให้มีคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อโรคได้ดีและมีประสิทธิภาพมากขึ้นนั้น โดยส่วนใหญ่แล้วมักจะเน้นการปรับปรุงเกี่ยวกับการอยู่รอดของเชื้อ

ในธรรมชาติให้ได้กว้างขวางทุกๆ สภาพพื้นที่ หรือพืชอาศัยหลายชนิด ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับเรื่องต่อไปนี้

3.2.1 **การอยู่รอดของเชื้อ** (Survival) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีนั้นควรที่จะมีคุณสมบัติเจริญได้ดีในทุกสภาวะแวดล้อม ตลอดจนสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ได้ดี ดังนั้นการคัดเลือกปรับปรุงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ให้มีคุณสมบัติดังกล่าวจึงมักจะต้องเสาะแสวงหาเชื้อจากแหล่งที่มีความผันแปรของสภาพแวดล้อมสูงหรือค่อนข้างแห้งแล้ง เมื่อนำไปใช้จึงจะทำให้เชื้อปฏิปักษ์สามารถอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม (adverse condition) ได้เป็นอย่างดีทำให้สามารถคุ้มครองพืชอาศัยได้ตลอดเวลา

3.2.2 **การเจริญครอบครอง** (Colonization) จุลินทรีย์ต่างๆ ในธรรมชาติจำเป็นต้องมีการแข่งขันกันเพื่อความอยู่รอด ดังนั้นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงต้องมีความสามารถเจริญครอบครองพื้นที่อยู่อาศัยเพื่อหาอาหาร และเจริญโดยเฉพาะบนพืชอาศัย ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถหาอาหารหรือครอบครองพื้นที่ได้ ส่งผลให้เจริญไม่ดี อ่อนแอ และตายไปในที่สุด จึงมักทำการคัดเลือกเชื้อที่มีการเจริญครอบครองพื้นผิวของพืชที่หนาแน่นกระจายตัวได้ดี ถ้าเป็นพวกที่อยู่ในดินก็ต้องเจริญครอบครองผิวรากได้อย่างทั่วถึง จึงจะช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคที่อยู่ในดิน ถ้าเป็นพวกที่อยู่เหนือดินส่วนใหญ่จะเน้นการครอบครองผิวใบได้ดี เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของโรคที่เกิดกับใบ เช่น พวกโรคใบจุด ใบไหม้ เป็นต้น

3.2.3 **ประสิทธิภาพ** (Effectiveness) การเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มักจะทำให้มีความสามารถทำลายเชื้อโรคได้มากขึ้น และทำลายเชื้อได้หลายชนิดยิ่งขึ้น ในขณะเดียวกันจะมีความจำเพาะในการทำลายเฉพาะเชื้อโรคเป้าหมายเท่านั้น ไม่ทำลายจุลินทรีย์อื่นๆ จึงจำเป็นต้องทราบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เจริญได้ดี และสร้างสารยับยั้งเชื้อโรคพืชในสภาพอย่างไร และในระยะใด เพื่อส่งเสริมให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เจริญอยู่ในสภาวะเช่นนั้น จะได้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชสูงขึ้น

3.2.4 **การเข้ากันได้กับวิธีอื่น** (Compatibility) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติหรือกลไกในการควบคุมเชื้อโรคได้หลายอย่างในตัวเอง จะมีความได้เปรียบกว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติหรือกลไกอย่างใดอย่างหนึ่งในการควบคุมโรค เพราะทำให้มีโอกาสมากกว่าใน

การต่อสู้กับเชื้อโรค ตลอดจนสามารถนำวิธีการอื่นๆ มาใช้ควบคู่ในการควบคุมโรคซึ่งเรียกว่า การควบคุมโรคโดยวิธีผสมผสาน (integrated control) เช่น เป็นเชื้อที่ทนทานต่อสารเคมีหรือความร้อนสูงซึ่งอาจนำเอาการใช้สารเคมีหรือความร้อนมาใช้ร่วมกับการใช้เชื้อปฏิปักษ์ จะทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมสูงกว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์อย่างเดียว หรืออาจใช้เชื้อปฏิปักษ์ร่วมกับพันธุ์ต้านทาน อาจทำให้ควบคุมโรคได้ดี และใช้ได้นานยิ่งขึ้น (นิพนธ์ ทวีชัย, 2539)

4. ชนิดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช

4.1 **แบคทีเรีย** เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจในการนำมาควบคุมโรคพืชไม่แพ้เชื้อรา ซึ่งส่วนใหญ่มักจะประสบความสำเร็จเมื่อนำไปใช้ในแปลง (Weller, 1988) การนำแบคทีเรียปฏิปักษ์มาควบคุมโรคพืช เช่น การนำเอาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรครากเน่า โคนเน่าของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* แบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นพวก *Bacillus* เช่น *B. subtilis* ซึ่งพบว่าเมื่อนำเชื้อข้นๆ ทาไปบริเวณแผล ทำให้แผลเน่าแห้ง ไม่เกิดยางไหล (มณจันทร์ เมฆธน และชัยวัฒน์ กระตุกฤกษ์, 2537) มณจันทร์ เมฆธน (2536) พบว่า เชื้อ *B. subtilis* AP01 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium roseum* สาเหตุโรคเหี่ยวและโคนเน่าของกล้วยไม้ได้ Baker และคณะ (1985) ได้ใช้เชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคราสนิมของถั่วโดยชีววิธี Islam และ Nandi (1985) รายงานว่า เชื้อ *Bacillus megaterium* สามารถควบคุมเชื้อรา *Drechslera oryzae* เชื้อสาเหตุโรคใบจุดของข้าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และ Broadbent และคณะ (1971) รายงานการใช้แบคทีเรียและ actinomycetes ในการยับยั้งเชื้อ *Phytophthora cinnamoni* สาเหตุของโรครากเน่าของสับปะรดในประเทศออสเตรเลีย เป็นต้น

ได้มีการนำเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH_4 มาควบคุมโรคเน่าเละ (soft rot) ของมันฝรั่งที่เกิดจากแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (ปริญญา จันศรี และคณะ, 2533) และได้พัฒนาเป็นผงชีวภัณฑ์ที่สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง (ช่อทิพย์ ถนอมถิ่น, 2538) นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากแบคทีเรีย *P. solanacearum* โดยพบว่าเชื้อ *B. subtilis* และ *P. fluorescens* สามารถใช้ใน

การควบคุมเชื้อโรคได้ดีอีกทั้งยังพบว่าถ้าใช้ร่วมกับพืชพันธุ์ต้านทานจะให้ผลควบคุมโรคได้ดียิ่งขึ้น (อุรัจฉทา กสิกรรมไพบูลย์ และคณะ, 2536) มณจันทร์ เมฆธน(2536) พบว่า เชื้อ *B. subtilis* AP01 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุของโรคแคงเกอร์ในพืชตระกูลส้ม และเชื้อ *Pythium* sp. สาเหตุโรครากเน่าของส้มโอ นลินี จาริกภากร และคณะ (2535) ได้ศึกษาการใช้เชื้อ *B. subtilis* ในการป้องกันกำจัดโรคขอบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อ *X. campestris* cv. *oryzae* และ Howell และ Stipanovic (1980) ใช้เชื้อ *P. fluorescens* ควบคุมเชื้อ *Pythium ultimum* สาเหตุของโรคเน่าระดับดินของกล้าพืช เป็นต้น

จากการศึกษาของ Charigkapakorn และคณะ (1991) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และ NSRS 89-26 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas campestris* cv. *oryzae* ในระดับห้องปฏิบัติการและภายใต้สภาพเรือนปลูกทดลอง นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวในระดับห้องปฏิบัติการอีก 7 ชนิด คือ *P. oryzae, Cercospora oryzae, Thanatephorus cucumeris, Curvularia lunata, Acrocylindrium oryzae, Rhynchosporium oryzae* และ *Alternaria padwickii* สำหรับโรคขอบใบแห้งที่เกิดจากเชื้อ *X. campestris* cv. *oryzae* นั้นถูกควบคุมจากการเป็นโรคระดับร้อยละ 94 เหลือเพียงร้อยละ 10 โดยเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-26 และเหลือร้อยละ 19 โดยเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 นลินี จาริกภากร และคณะ (2537) ได้ใช้วิธีคลุกผงแบคทีเรีย *B. subtilis* ในดินก่อนการปลูกข้าวไร่สามารถควบคุมการเกิดโรคข้าวในระยะต้นอ่อนได้ดีในช่วงระยะ 7-14 วัน หลังจากหว่านเมล็ดข้าว หลังจากนั้นช่วง 21-28 วันเริ่มพบโรคไหม้ของข้าว แต่ระดับความรุนแรงของโรคต่ำมากเมื่อเทียบกับแปลงทดสอบที่ไม่ใช้ผงแบคทีเรีย

การทดสอบการควบคุมโดยวิธีการคลุกเมล็ดพบว่าเชื้อ *B. subtilis* ช่วยลดอัตราการเกิดโรคของเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าได้ดี ไม่มีผลกระทบต่อการงอก และความแข็งแรงของเมล็ดต้นกล้า และสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมล็ดที่ไม่มีการคลุกแบคทีเรีย ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะใช้ในสภาพที่มีโรคระบาดหรือมีโรคที่ติดมากับเมล็ด (นลินี จาริกภากร, 2535)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* โดยอยู่ในระหว่างการคัดเลือกในห้องปฏิบัติการและแปลงปลูกทดลอง (มานะ กาญจนมณีเสถียร และคณะ, 2536)

4.2 **เชื้อรา** เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจอย่างมากในการนำมาควบคุมเชื้อรา ก่อโรคบริเวณรอบๆ รากพืช สามารถดำรงชีวิตได้ยาวนานเนื่องจากสามารถสร้างสปอร์ เชื้อรา ปฏิปักษ์ที่สำคัญในการนำมาควบคุมโรคพืชนั้นได้มีการศึกษากันอย่างมาก เช่น เกษม สร้อยทอง (2532) พบว่า เชื้อรา *Chaetomium cupreum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae, C. lunata, D. oryzae, Fusarium moniliforme, Rhizoctonia oryzae* และ *R. solani* จิรเดช และคณะ (2534) ได้ทดลองควบคุมโรคต้นแห้งของข้าวบาเลย์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* Heye และ Andrew (1983) รายงานว่า *C. cupreum* สามารถ ป้องกันโรค apple scab ที่เกิดจากเชื้อรา *Venturia inequalis* ได้ Tveit และ Moore (1954) รายงานว่า *C. globosum* สามารถใช้ในการป้องกันโรคใบไหม้ของข้าวโอ๊ตที่เกิดจากรา *Helminthosporium victoriae* ได้

4.3 **ยีสต์** เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจในการนำมาควบคุมโรคของผลไม้หลัง การเก็บเกี่ยว ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์มีคุณสมบัติที่ดีคือ

1) สามารถครอบครองพื้นที่ผิวผลไม้ภายใต้สภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ยาวนาน
2) สามารถผลิต extracellular polysaccharides ที่เพิ่มการดำรงชีวิตและป้องกัน การงอกของสปอร์เชื้อรา
3) สามารถเจริญและใช้อาหารที่หาได้ง่าย
4) ยีสต์ได้รับผลกระทบจากสารเคมีน้อย (Wilson and Wisniewski, 1989)

สำหรับการนำยีสต์มาควบคุมโรคพืชบริเวณรอบรากพืชดังเช่นเชื้อราและแบคทีเรียนั้น ไม่ค่อยได้รับความสนใจ เนื่องจากบริเวณดังกล่าวยีสต์เจริญได้ไม่ดี และไม่ค่อยพบการผลิต สารปฏิชีวนะหรือผลิตแต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเนื่องจากมีสารอินทรีย์ในดินต้านเอาไว้ (McCormack *et al.*, 1994) สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากยีสต์ส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา เช่น

aureobasidins ที่ผลิตจากเชื้อ *Aureobasidium pullulans* มีฤทธิ์ยับยั้ง *Candida albicans* ได้ดี (Andrews *et al.*, 1983 ; Takesako *et al.*,1991)

5. หลักทั่วไปในการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรคพืช

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สมบูรณ์แบบ (the ideal antagonist) ซึ่งตามความคิดของ Baker และ Cook (1974) นั้นควรมีลักษณะดังต่อไปนี้

1) มีความสามารถในการเพิ่มจำนวน เจริญได้รวดเร็ว บุกรุกและเข้าครอบครองพื้นที่ได้ดี มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ผันแปร และสามารถดำรงชีวิตและสามารถเจริญได้บริเวณรอบๆ พืช หรือบนต้นพืช
2) ผลิตสารปฏิชีวนะที่มีการออกฤทธิ์ทำลายเชื้อก่อโรคได้หลายชนิด (broad spectrum) อย่างมีประสิทธิภาพในระดับความเข้มข้นต่ำและสารปฏิชีวนะไม่ถูกดูดซับหรือถูกทำลายเมื่ออยู่ในดิน
3) สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ไม่ควรยับยั้งจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อื่นๆ ที่ใช้ร่วมกัน และไม่ควรส่งผลกระทบหรือทำความเสียหายต่อพืชที่ปลูก
4) เมื่อนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรม สปอร์หรือหน่วยขยายพันธุ์ สามารถทนทานต่อความร้อนและการถูกทำลาย รวมถึงการถูกต่อต้านจากจุลินทรีย์อื่นๆ
5) สปอร์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควรจะงอกได้ง่าย ได้เร็วกว่าหรือเท่ากับเชื้อก่อโรค
6) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควรปรับตัวได้ดีกว่าเชื้อก่อโรคในสภาวะแวดล้อมที่วิกฤต

Cook และ Baker (1983) กล่าวว่า จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสามารถนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชได้นั้นควรทำให้เกิดผลดังนี้

1) ลดจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และ/หรือ การควบคุมให้มีระดับต่ำกว่าที่จะก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ (economic threshold)
2) พืชสามารถป้องกันตนเองจากการติดเชื้อก่อโรค
3) สามารถควบคุมหรือจำกัดขอบเขตของการเกิดโรคหลังจากที่พืชติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแล้วไม่ให้แพร่กระจายมากขึ้น

Chulalongkorn University
Prince of Songkla University

Baker และคณะ (1983) กล่าวว่าการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะมาควบคุมโรคพืชจะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับ

1) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต้องมีความสามารถในการดำรงชีวิต และผลิตสารปฏิชีวนะภายใต้สภาพแวดล้อมนั้นๆ ได้
2) จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต้องสามารถผลิตสารปฏิชีวนะในปริมาณที่เพียงพอที่จะยับยั้งเชื้อที่ก่อโรค
3) สารปฏิชีวนะสามารถทำลายเชื้อก่อโรค ภายใต้สภาวะแวดล้อมนั้น โดยที่เชื้อโรคยังไม่เกิดการดื้อ

6. วิธีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาวิธีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีมาไม่ต่ำกว่า 20 ปี แต่ผลที่ได้ยังไม่ค่อยได้ผลดีเท่าที่ควรจนกระทั่งเมื่อ 10 กว่าปีที่มีการรายงานการใช้แบคทีเรียควบคุมโรคปุ่มปมสำเร็จจึงทำให้มีการสนใจศึกษากันมากขึ้น และอาจเป็นทางเลือกใหม่ของเกษตรกร การนำเอาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืช นิยมนำไปใช้กับโรคพืชที่เกิดบริเวณผิวราก หรือบริเวณผิวพืชที่อยู่เหนือดิน ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคที่บริเวณทั้งสองจะมีกรรมวิธีการใช้แตกต่างกันดังนี้ (นิพนธ์ ทวีชัย, 2539)

6.1 **บริเวณผิวราก** กรรมวิธีการใช้เชื้อปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคมีได้หลายแบบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสะดวกในการปฏิบัติของผู้ใช้และแต่ละวิธีอาจให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้ไม่เท่ากัน ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ตั้งแต่คุณสมบัติของพืชเอง ตลอดจนลักษณะผลิตภัณฑ์ของเชื้อปฏิปักษ์ (formulation) ที่มีหลายรูปแบบ ดังนี้

6.1.1 **การคลุกเมล็ด** (seed treatment) นิยมใช้กับพืชที่ใช้เมล็ดเพาะปลูก โดยเมล็ดจะต้องมีขนาดไม่ใหญ่โตมากนักช่วยให้ปฏิบัติการได้ง่ายและไม่สิ้นเปลืองผงเชื้อ หรือสารแขวนลอยเชื้อ มักนิยมคลุกเมล็ดก่อนปลูก

6.1.2 **การราดดิน** (soil drench) เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ปฏิบัติกันมาก แต่จะไม่ค่อยสะดวกหากจะนำไปใช้ในสภาพไร่ของเกษตรกรที่อาจมีน้ำไม่เพียงพอ และถ้าหากปลูกพืชในปริมาณมากจะทำให้เกิดปัญหาความไม่สะดวกในการปฏิบัติยิ่งขึ้น

6.1.3 **การคลุกดิน** (soil amendment) เป็นวิธีการนำเอาผงเชื้อ (powder) หรือสารแขวนลอย (suspension) เชื้อปฏิปักษ์ใส่ลงในดิน และคลุกเคล้าผสมให้ทั่วก่อนปลูกพืช การใส่ในรูปของผงเชื้อค่อนข้างจะสะดวกกว่าในรูปของสารละลาย

6.1.4 **การจุ่มราก** (root dipping) เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้กับพืชที่ต้องเพาะเมล็ดแล้วย้ายกล้าปลูก (transplanting) เช่น มะเขือเทศ พริก หรือพืชที่เมล็ดพันธุ์มีราคาแพง โดยจะต้องทำให้ดินบริเวณรากหลุดออกให้หมดก่อน นำไปจุ่มในสารแขวนลอยเชื้อแล้วจึงนำไปปลูกในแปลงต่อไป วิธีนี้จะทำให้เชื้อปฏิปักษ์ควบคุมโรคได้ดีเพราะรากจะสัมผัสกับเชื้อได้หมดทุกส่วน

6.2 **บริเวณผิวพืชอยู่เหนือดิน** การใช้มีรูปแบบที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก ที่นิยมใช้มีเพียง 2 วิธี คือ

6.2.1 **การทา** (paste painting) เป็นวิธีที่นิยมใช้กับพืชยืนต้นที่ถูกทำลายมีแผลปรากฏให้เห็นชัดเจนบนส่วนของต้น หรือกิ่ง เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ให้มีความเข้มข้นและเหนียวไปทา เพื่อให้ยึดติดกับผิวพืชได้คงทน สามารถป้องกันและรักษาพืชให้เป็นปกติ ถ้าหากเป็นพืชยืนต้นสูงๆ หรือพืชล้มลุกจะไม่สะดวกในการปฏิบัติ

6.2.2 **การพ่น** (spraying) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากกับพืชที่ปลูกเป็นปริมาณมาก หรือมีลำต้นสูง ซึ่งมีหลักการปฏิบัติเช่นเดียวกับการพ่นสารเคมีกำจัดโรคพืช โดยมากนิยมใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เลี้ยงบนอาหารมาทำเป็นสารละลายแล้วจึงนำไปพ่นลงบนพืชเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคที่แพร่ระบาดโดยปลิวไปกับลม หรือมากับฝน

7. ลักษณะและคุณสมบัติของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis*

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. จัดเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญที่สุดที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชและโรคพืช โดยเฉพาะ *B. thuringiensis* (B.T) มีการนำมาใช้ในการกำจัด

แมลงอย่างกว้างขวางและสามารถผลิตเป็นการค้าได้ (จิราพร เพชรรัตน์, 2534) B.T เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก สร้างสปอร์และผลิตโปรตีน เนื่องจากผลึกโปรตีนที่สร้างขึ้น มีฤทธิ์ในการทำลายแมลงศัตรูชนิดต่างๆ ทำให้เชื้อแบคทีเรียนี้เข้ามามีบทบาทในการควบคุมแมลงศัตรู ซึ่งมีความสำคัญทางด้านการเกษตรและการแพทย์ (Falcon, 1977) สำหรับในปัจจุบันแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. ที่ศึกษากันมากคือ *B. subtilis* เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งต่างจาก B.T ที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

B. subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนยาวเรียว ขนาดของเซลล์กว้าง 0.7-0.8 ไมโครเมตร ยาว 2-3 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลาด้านข้าง สามารถเคลื่อนที่ได้ มีสปอร์อยู่ตรงกลางเซลล์ สปอร์สามารถทนความร้อนได้ เซลล์เรียงตัวกันเป็นสาย เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ แต่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำสุด 5-20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงที่สุด 45-55 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ สร้างกรดจากอะราบิโนส ไซโลสและแมนนิทอลได้ สามารถใช้น้ำตาลซูโครสและราฟิโนสในการเจริญได้ บางสายพันธุ์ยังสร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยเซลล์แบคทีเรียชนิดอื่นที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ด้วย เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารแข็งจะได้โคโลนีที่มีรูปร่างกลม หรือมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน ผิวด้านหนาทึบ บางครั้งจะมีรอยย่น โคโลนีเป็นสีครีมจนถึงสีน้ำตาล เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่ต่างกัน ลักษณะโคโลนีที่ได้จะแตกต่างกัน สามารถเจริญได้รวดเร็วเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีความชื้นสูง แต่จะแพร่กระจายได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว การเลี้ยงในอาหารเหลวทำให้อาหารมีสีคล้ำขึ้น มีฝ้าที่มีลักษณะย่นติดต่อกัน อาจทำให้อาหารขุ่นเล็กน้อยหรือไม่ขุ่นเลย (Buchanan and Gibbon, 1974)

บุญส่ง แสงอ่อน (2533) อธิบายไว้ว่า *B. subtilis* สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสารประกอบอินทรีย์พวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้ จะทำงานได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ ไม่ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ผันแปรมาก ๆ ในธรรมชาติจะพบ *B. subtilis* ได้ในดินเป็นส่วนใหญ่ แต่บางครั้งก็สามารถพบได้ในน้ำ Sinclair และคณะ (1989) พบว่า เชื้อ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ในสภาพธรรมชาติโดยทั่วไป ไม่ก่อให้

เกิดความเสียหายหรือเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ และ Reddy และ Rahe (1989) พบว่า ไม่ทำให้เกิดผลเสียหายต่อพืชที่อาศัยอยู่

การจัดจำแนกหมวดหมู่ทางวิทยาศาสตร์ (classification and nomenclature) ของ *B. subtilis* ใน Bergey's Manaul of Determinative Bacteriology พิมพ์ครั้งที่ 8 โดย Cowan และคณะ (1974) มีดังนี้

Kingdom	Procaryotae
Division	Bacteria
Order	Cytophagaceae
Family	Bacillaceae
Genus	*Bacillus*

สารปฏิชีวนะเปปไทด์ที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. ส่วนมากเป็นสารต้านแบคทีเรีย เช่น bacitracin ซึ่งมีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวก และไม่มีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากแกรมลบรูปร่างกลม gramicidin ให้ผลดีเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ขณะที่ tyrocidin ให้ผลดีต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ อย่างไรก็ตามสารปฏิชีวนะเปปไทด์จาก *Bacillus* บางชนิดที่มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบได้เป็นส่วนใหญ่ โดยไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ polymyxin, colistin และ curculin และมีบางชนิดที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อราโดยมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราและยีสต์ ได้แก่ iturin A, bacilomycin, mycosubtilin, fungistatin และ subsporin ซึ่งสารต้านเชื้อราส่วนใหญ่จะผลิตได้จาก *B. cereus* สารปฏิชีวนะเปปไทด์จัดเป็น bactericidal antibiotic (มาลิน จุลศิริ, 2532) ส่วน *B. subtilis* นั้นสามารถสร้างสารได้หลายชนิดเช่น xanthobacidin, subtilin, bacilysin และ fengymycin (Huang and Chang, 1975; Jansen, 1944; Loeffler *et al*, 1986) คุณสมบัติของ *B. subtilis* ที่เหมาะจะเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มีดังนี้

1) สามารถเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้โดยตรงทั้งยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิดในขณะเดียวกัน และสามารถแก่งแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ ในสภาพ

แวดล้อมที่ขาดแคลน (Huang and Chang, 1975 ; Katz and Demain, 1978 ; Krezel and Leszezynska, 1978 ; Nandi and Sen, 1953 ; Sinclair *et al.*,1989)

2) เป็นจุลินทรีย์ที่โดยปกติมักจะพบอาศัยอยู่ในพืช และในสภาพธรรมชาติโดยทั่วไปโดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียหายต่อพืชที่อาศัยอยู่ หรือเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (Jacobs *et al.*, 1985 ; Reddy and Rahe, 1989)

3) สามารถปรับตัวและทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แปรเปลี่ยนและสภาวะที่วิกฤติโดยการสร้างสปอร์และทนทานต่อสภาพอากาศร้อนชื้นได้ดี (Corke and Rishbeth, 1981 ; Dickinson and Peerce, 1976)

4) *B. subtilis* บางสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารพวก toxic metabolite บางชนิดซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้กระตุ้นการเกิดความต้านทานของพืชต่อเชื้อสาเหตุของโรคพืชที่เข้าทำลาย (Stenzel *et al.*, 1985 ; Von-Alten and Schoenbeck, 1985 ; Steiner *et al.*, 1988)

จากคุณสมบัติดังกล่าวพอสรุปได้ว่า *B. subtilis* มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีได้

8. การพัฒนาชีวภัณฑ์

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ได้มีการศึกษาทั้งในประเทศและต่างประเทศมาเป็นเวลานานหลายสิบปี แต่ในปัจจุบันเพิ่งเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงในการนำไปเป็นกลยุทธป้องกันกำจัดโรคเนื่องจากมีการนำไปใช้อย่างได้ผลดีในขั้นทำเป็นการค้าโดยจดลิขสิทธิ์ที่สหรัฐอเมริกา เช่น *A. radiobacter* K-84 ใช้สำหรับควบคุมโรคปุ่มปมของพืชได้หลายชนิด *P. fluorescens* ใช้ควบคุมโรคของฝ้ายที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia* และ *Pythium* spp. มีชื่อทางการค้าว่า Dagger G และ *B. subtilis* ใช้เป็นสารคลุกเมล็ดพันธุ์พืชป้องกันเชื้อราที่ก่อโรคจากดิน มีชื่อทางการค้าว่า Rodiak ซึ่งจะมีบทบาทที่สำคัญมากในศตวรรษที่ 21 (Cook, 1993) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เพียงจำนวนน้อยที่ผ่านการรับรองจากสำนักงานพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) โดยเฉพาะ

การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช (ตารางที่ 1) ทั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นนอกจากจะมีประสิทธิภาพดีในการควบคุมโรคพืชแล้ว ยังต้องผ่านการยอมรับในมาตรฐานความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและความเป็นพิษ และเนื่องจากแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิต เมื่อจะนำมาใช้ในการควบคุมศัตรูพืชจึงถูกควบคุมโดย EPA กฎเดียวกับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่สังเคราะห์ขึ้นมา นอกจากนี้ยังต้องผ่านการควบคุมก่อนการนำไปใช้ในธรรมชาติโดย USDA-APHIS (Animal and Plant Health Inspection Service) เนื่องจากถือว่าเป็นเชื้อที่อาจมีพันธุกรรมพิเศษหรือเป็นเชื้อแปลกปลอม (exotic) ที่มีอยู่ในธรรมชาติ (Jacobsen and Backman, 1993)

นอกจากปัญหาด้านกฎหมายความปลอดภัยดังกล่าวแล้ว การพัฒนาผลิตภัณฑ์จะต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องมากมาย ที่มักเป็นปัญหาและอุปสรรค เช่น ประสิทธิภาพ ความน่าเชื่อถือในคุณภาพ และขอบข่ายในการควบคุมโรคกว้างขวางเพียงใด ซึ่งจะต้องอาศัยการศึกษาค้นคว้าทำความเข้าใจในเรื่องต่างๆ เช่น นิเวศวิทยาของพืชและจุลินทรีย์ กลไกในการควบคุมโรคของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยจะมีผลเกี่ยวข้องทั้งทางตรงและทางอ้อม สิ่งเหล่านี้ถ้าได้มีการศึกษาและทำความเข้าใจอย่างละเอียดดีแล้วจะช่วยให้การพัฒนาผลิตภัณฑ์ และการนำไปใช้ควบคุมโรคประสบความสำเร็จตามวัตถุประสงค์ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีบริษัทต่างๆ มีการพัฒนาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในเชิงการค้ามากขึ้น (ตารางที่ 2)

8.1 ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการพัฒนาชีวภัณฑ์

เชื้อปฏิปักษ์ที่ได้ทำการคัดเลือกทดสอบว่ามีความสามารถควบคุมโรคได้ดีในห้องปฏิบัติการและในสภาพไร่แล้ว จำเป็นจะต้องมีการศึกษาพัฒนาเป็นชีวผลิตภัณฑ์เพื่อนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในเชิงการค้าต่อไป ซึ่งนิพนธ์ ทวีชัย (2539) กล่าวว่าจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ

8.1.1 **มีมาตรฐานที่เชื่อถือได้** (Acceptable standard) เชื้อปฏิปักษ์ที่พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จะต้องมีปริมาณของเชื้อที่ใช้ได้มาตรฐานทุกๆ ครั้งที่ผลิต ไม่มีเชื้ออื่นปะปน และประสิทธิภาพการควบคุมโรคคงที่สม่ำเสมอ

ตารางที่ 1 ชีวภัณฑ์ที่ผ่านการยอมรับจากสำนักงานพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา

ชีวภัณฑ์	จุลินทรีย์ปฏิปักษ์	การควบคุม
BINAB-T	*Trichoderma* spp.	ป้องกันเชื้อโรคจากแผลที่ตัดแต่ง
Galltrol-A	*Agrobacterium radiobacter* K84	ควบคุมโรคปุ่มปม
Dagger G	*Pseudomonas fluorescens*	ควบคุมโรคที่ติดจากเมล็ดของฝ้าย
F-Stop	*Trichoderma harzianum*	ควบคุมโรคโคนเน่าของถั่วและข้าวโพด
GL-21	*Gliocladium virens*	ควบคุมโรครากเน่า ที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* และ *Rhizoctonia*
Quantum 4000 HB	*Bacillus subtilis* A-13/GB03	คลุกเมล็ดป้องกันโรครากเน่าของถั่ว และฝ้าย ที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia*

ดัดแปลงจาก :Jacobsen และ Backman (1993)

8.1.2 **มีอายุเก็บรักษานาน** (Acceptable shelf-life) ชีวภัณฑ์ที่ดีจะต้องเก็บรักษาในบรรยากาศร้อนชื้นของประเทศไทยได้นานโดยไม่ต้องดูแลรักษามากนัก ทั้งในขณะที่จำหน่ายอยู่ในร้านค้า หรือที่เกษตรกรเก็บไว้ใช้

8.1.3 **มีความปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม** (Environmental safety) ชีวภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นจะต้องไม่มีโทษต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทำความเสียหายต่อสิ่งแวดล้อม

8.1.4 **การใช้ร่วมกับวิธีอื่น** (Combine use) ชีวภัณฑ์หากสามารถนำไปใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ ได้แล้ว จะทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดียิ่งขึ้น เป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย มีความสะดวกสบายในการปฏิบัติ และไม่ต้องเสียเวลามาก

8.2 การใช้สารเคมีในการยืดอายุการเก็บรักษาเชื้อ

Trevors และ คณะ (1993) ได้ใช้โซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2 กับเชื้อ *P. fluorescens* พบว่าเชื้อสามารถรอดชีวิตในดินได้ดีขึ้นและนานขึ้น โดยตรวจพบเชื้อถึง 10^4-10^6 CFU ต่อกรัมของดินแห้ง Elcin (1995) พบว่า การใช้แคลเซียมอัลจิเนตในการเก็บรักษาเชื้อ *Bacillus sphaericus* 2362 สามารถยืดอายุเชื้อได้ อีกทั้งทำให้เชื้อมีความต้านทานต่อรังสี UV ความร้อนและสารเคมีต่าง ๆ ได้ดีขึ้น Kanjanamaneesathian และคณะ (1995) ได้ทำการเตรียมสูตรเม็ดของเชื้อ *Trichoderma harzianum* โดยใช้ avicell พบว่า สูตรเม็ดที่ผลิตได้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปกติได้นานถึง 6 เดือน เมื่อทำการตรวจความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อราในห้องปฏิบัติการและโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่า เชื้อราสามารถมีชีวิตรอด และเจริญเติบโตได้ดี วิทยา มีวุฒิสม (2537) ทำการเก็บรักษาเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* LA_2 และ *Streptococcus faecium* SA_1 โดยผสมกับถั่วเหลืองอบบด ในอัตราส่วน สารแขวนลอยเชื้อ 75 มิลลิลิตรต่อถั่วเหลืองอบบด 100 กรัม ปรับความชื้นให้อยู่ประมาณร้อยละ 45 พร้อมกับเติมน้ำมันรำข้าว 100 มิลลิลิตร พบว่า สามารถเก็บเชื้อได้ดีที่สุดโดยใน 99 วัน เชื้อ *L. acidophilus* LA_2 จะลดลงประมาณ 3 log cycle และใน 98 วันเชื้อ *S. faecium* SA_1 จะลดปริมาณลงมาประมาณ 2 log cycle และพบว่า เมื่อนำเชื้อ *S. faecium* SA_1 มาหุ้มด้วย อัลจิเนตร้อยละ 50 ปริมาณเชื้อจะลดลงเพียง 1 log cycle ในเวลา 60 วัน นลินี จาริกภากร และ คณะ (2535) ได้ใช้เมทธิลเซลลูโลสร้อยละ 1 ผสมกับเชื้อ *B. subtilis* ก่อนนำไปใช้คลุกเมล็ดข้าว และนลินี จาริกภากร (2537) ได้ผลิตผงแบคทีเรีย *B. subtilis* โดยใช้ผงทัลคัมและหินฝุ่นโดโลไมท์ผสมกับเชื้อ นำไปทำให้แห้งโดยวิธีการเป่าแห้งในเครื่องฉีดพ่นผ่านความร้อน พบว่า สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานเกินกว่า 1 ปี และเมื่อนำไปทดสอบในสภาพธรรมชาติ พบว่า สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคข้าวและอัตราการเกิดโรคได้ดีมาก

ตารางที่ 2 การพัฒนาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของบริษัทต่างๆ เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช

จุลินทรีย์ (ชื่อผลิตภัณฑ์)	โรคที่ควบคุม	ประเทศ/บริษัทที่ผลิต
กลุ่มเชื้อรา		
Chaetomium globosum	โรคเน่าระดับดินในผักกาดหวาน	สวิสเซอร์แลนด์
Gliocladium viren	โรคเน่าระดับดินในไม้ประดับ	สหรัฐอเมริกาจำหน่าย และผ่านการจดทะเบียน โดยองค์กรเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม(EPA)แล้ว
Trichoderma tri-4	โรคเน่าระดับดินในไม้ประดับ	อเมริกา
G. *roseum*	โรคเหี่ยวในมันฝรั่ง	อเมริกา
T. harzianum	โรคเน่าในผักกาดหวาน	อิตาลี
T. harzianum	โรคเน่าในหอม	อียิปต์
C. minitans	ควบคุมเชื้อ *Botrytis* และ *Sclerotinia*	เนเธอร์แลนด์
T. harzianum และ *T. polysporum*	ควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวในผักและผลไม้	อเมริกา
T. polysporum ATCC 2045 และ *T. harzianum* ATCC 20476	ควบคุมเชื้อ Basidiomycetes และเชื้ออื่นๆ ที่เกิดในดิน	Eastman Kodak
T. harzianum F-stop	โรคที่เกิดจากเชื้อราในดิน	Bionab Bioinnovation-AB

ที่มา : เปรมปรีย์, 2537

ตารางที่ 2 (ต่อ)

จุลินทรีย์ (ชื่อผลิตภัณฑ์)	โรคที่ควบคุม	ประเทศ/บริษัทที่ผลิต
กลุ่มเชื้อแบคทีเรีย		
Agrobacterium radiobacter (Strain 84) (Galltrol-A)	ควบคุมโรคปุ่มปมของโคนต้นไม้และผลไม้	Ag Biochem
Bacillus subtilis (Kodiak)	ควบคุมโรคที่เกิดกับระบบราก	Gustafson
Bacillus subtilis (Quantum 4000 HB)	ควบคุมโรคที่เกิดกับระบบราก	Gustafson
Bacillus subtilis (Quantum 4000 P)	ควบคุมโรคที่เกิดกับระบบราก	Gustafson
Pseudomonas fluorescens (Dagger G)	ควบคุมโรคในกล้าของเชื้อ *Pythium* และ *Rhizoctonia*	Ecogen
Steptomyces griseoviridis (Mycostop)	ควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราหลายชนิด	Kemira OY.

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกส่วนผสมที่เหมาะสมในการเตรียมสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 และการนำสูตรเชื้อไปใช้ให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคข้าว

ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ เชื้อ *Bacillus* sp. LN 007

2. ศึกษาความคงตัวของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ต่อสภาวะแวดล้อม

3. ศึกษาส่วนประกอบที่เหมาะสมในการเตรียมสูตรเชื้อ การผลิตสูตรเชื้อ ตลอดจนอายุการเก็บรักษาสูตรเชื้อ

4. ศึกษาถึงประสิทธิภาพของสูตรเชื้อที่เตรียมในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. จุลินทรีย์

1.1 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 แยกได้โดยคุณนลินี จาริกภากร ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง กรมวิชาการเกษตร และ *Bacillus* sp. LN 007 แยกได้โดยอาจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เก็บรักษาเชื้อในหลอดอาหารวุ้นเอียง Nutrient Agar (NA slant) เก็บในตู้เก็บเชื้อ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 เชื้อราสาเหตุโรคข้าว *Pyricularia grisea* และ *Rhizoctonia solani* จากกรมวิชาการเกษตร เก็บรักษาเชื้อในหลอดอาหารวุ้นเอียง 1/10 Potato Dextrose Agar (1/10 PDA) และเก็บรักษาโดยให้เชื้อราที่เจริญในต้นข้าว(ฟางข้าว) ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร เก็บในหลอดเก็บเชื้อ ปิดด้วยพาราฟิล์ม เก็บในตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. พันธุ์ข้าวทดสอบ

2.1 เมล็ดข้าวพันธุ์ กข.23 จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

2.2 ต้นข้าวพันธุ์ กข.23 อายุ 15, 30 และ 45 วัน ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 เซนติเมตร กระถางละ 4 ต้นและกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15 เซนติเมตร กระถางละ 1 ต้น

3. สารเคมี

3.1 preservative (methyl-4-hydroxybenzoate, lactic acid, potassium sorbate)

3.2 emulsifier (soy bean oil, tween 80, tween 20)

3.3 binder (carboxymethyl cellulose, alginate, carrageenan)

3.4 protectant (glutamate, glycerol)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 อาหาร LB ประกอบด้วย ทริบโตน 0.5 กรัม,ยีสต์สกัด 1.0 กรัม NaCl 0.5 กรัม และน้ำ 100 มิลลิลิตร สำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

4.2 อาหาร Mckeen ประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัม, ดีแอล-กลูตามิค แอสิค 5.0 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 1.02 กรัม, K_2HPO_4 1.0 กรัม, KCl 0.5 กรัม, Trace element solution 1.0 มิลลิลิตร ($MnSO_4.4H_2O$ 0.5 กรัม, $CuSO_4.5H_2O$ 0.16 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.015 กรัม และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.0-6.2 สำหรับเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

4.3 Potato Dextrose Agar (PDA) (บริษัท Merck) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *P. grisea* และ *R. solani*

4.4 Nutrient Agar (NA) (บริษัท Merck) สำหรับตรวจนับเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Lab-Line Instruments Co., Ltd.

2. เครื่องวัดพีเอช รุ่น 320 บริษัท Denver Instrument

3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W350 บริษัท Memmert GmbH Co.

4. เครื่องเขย่าหลอด บริษัท P. Intertrade Equipments Co., Ltd.

5. เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi Ltd.

6. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น himac SCR 20 B บริษัท Hitachi Koki Co., Ltd.

7. กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus บริษัท Olympus Optical Co., Ltd.

8. ตู้อบอากาศร้อน รุ่น 350 บริษัท Memmert GmbH Co.

9. ตู้ปลอดเชื้อแบบลมเป่า รุ่น HS-225 บริษัท International Scientific Supply Co.,Ltd.

วิธีการทดลอง

1. การเจริญของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (seed inoculum) เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* LN 007 บนอาหารวุ้นเอียง NA นาน 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ 2 ลูปมาตรฐาน ลงในอาหารเหลว LB 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 16-18 ชั่วโมง

1.2 ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* LN 007 เพื่อหาระยะที่เหมาะสมในการนำไปเตรียมสูตรเชื้อ โดยถ่ายกล้าเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mckeen 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง โดยแต่ละครั้งจะเก็บตัวอย่างละ 3 ฟลาสก์ นำแต่ละตัวอย่างไปทดสอบดังนี้

1.2.1 วัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

1.2.2 ตรวจวัดพีเอช โดยใช้เครื่องวัดพีเอช

1.2.3 การสร้างสปอร์ของเชื้อ โดยการย้อมสปอร์ (ภาคผนวก ก) และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.2.4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (Dubois, *et al.*, 1956) (ภาคผนวก ก)

1.2.5 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* ของสารปฏิปักษ์ที่ผลิตได้ (ดัดแปลงจาก Mckeen *et al.*, 1986)

1.2.5.1 การเตรียมสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราที่ผลิตโดยแบคทีเรีย เลี้ยงเชื้อเมื่อครบกำหนดเวลาการเพาะเลี้ยง นำน้ำหมักไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนใสไปทดสอบฤทธิ์สารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani*

1.2.5.2 การเตรียมจานเพาะเชื้อรา

(1) เชื้อรา *P. grisea* เลี้ยงเชื้อราในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน จะได้โคโลนีของเชื้อราใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะจากขอบๆ โคโลนี นำไปวางที่กลางจานอาหาร PDA จานใหม่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 4 วัน จะได้โคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร

(2) เชื้อรา *R. solani* เลี้ยงเชื้อราในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 วัน จะได้โคโลนีของเชื้อราใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะจากขอบๆ โคโลนี นำไปวางที่กลางจานอาหาร PDA จานใหม่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน จะได้โคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9 เซนติเมตร (เจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อ)

1.2.5.3 การทดสอบ

(1) เตรียมอาหาร PDA double strength ผสมกับส่วนใสที่ได้จากข้อ 1 ในอัตราส่วน 1:1 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ ส่วนในจานควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนส่วนใส

(2) เมื่ออาหารแข็งตัวดีแล้วให้นำเชื้อราจากข้อ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาวางลงตรงกลางจานอาหาร

(3) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (34 องศาเซลเซียส) แล้วสังเกตการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของชุดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราจากสูตร (Gamliel และคณะ, 1989)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง $= 100 - \left[\frac{(r^2 \times 100)}{R^2}\right]$

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดควบคุม

r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อราชุดทดสอบ

2. การทนต่อสภาวะต่าง ๆ ของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

2.1 **ทดสอบการทนความร้อนของเชื้อ**

2.1.1 **การทดสอบการทนความร้อนของเซลล์** เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mckeen จนได้ระยะ mid log phase (12 ชั่วโมง) ปิเปตเชื้อแขวนลอย 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลาง นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 5,10, 20, 30 และ 60 นาที นำมาตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตโดยเทคนิค spread plate บนอาหาร Nutrient Agar

2.1.2 **การทดสอบการทนความร้อนของสปอร์** เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mckeen จนได้ระยะที่สร้างสปอร์ (48 ชั่วโมง) ทำการแยกสปอร์ออกจากเซลล์ โดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาจากข้อ 2.1.1 ที่สามารถฆ่าตัวเซลล์ได้ ปิเปตสปอร์แขวนลอย 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลาง นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 และ 100 องศาเซลเซียส และใส่ในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 และ 121 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 5,10, 20, 30 และ 60 นาที นำมาตรวจนับจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิตโดยเทคนิค spread plate

2.2 **ผลของพีเอชต่อการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007**

2.2.1 **การเจริญของเซลล์** เตรียมเชื้อให้ได้ระยะ mid log phase (12 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mckeen ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 นำไปเลี้ยงบน

เครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำมาวัดพีเอชและการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

2.2.2 **การงอกของสปอร์** เตรียมเชื้อให้ได้ระยะสปอร์ (48 ชั่วโมง) แล้วให้ความร้อนและระยะเวลาที่สามารถทำลายเซลล์ได้ตามข้อ 2.1.1 ถ่ายสปอร์ร้อยละ 5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mckeen ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำมาวัดพีเอชและการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

2.3 **ผลของรังสี UV ต่อความคงตัวของเชื้อ** *B. subtilis* **NSRS 89-24 และ** *Bacillus* sp. LN 007

2.3.1 **ความคงตัวของเซลล์** เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารเหลว Mckeen จนได้ระยะ mid log phase (12 ชั่วโมง) นำมาเจือจางในน้ำกลั่นเป็น 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} เท่า ปิเปตใส่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร จานละ 2 มิลลิลิตร นำไปวางบน magnetic stirrer ที่อยู่ภายใต้แสง UV เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 5, 10, 30 และ 60 นาที นำไป spread plate บนอาหาร NA เพื่อตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อ (สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์, 2532)

2.3.2 **ความคงตัวของสปอร์** เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารเหลว Mckeen จนได้ระยะสปอร์ (48 ชั่วโมง) แยกสปอร์ออกจากเซลล์โดยใช้ความร้อนและระยะเวลาตามข้อ 2.1.1 นำสปอร์แขวนลอยลอยมาเจือจางในน้ำกลั่นเป็น 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} เท่า ปิเปตใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 2 มิลลิลิตร นำไปวางบน magnetic stirrer ที่อยู่ภายใต้แสง UV เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 5, 10, 30 และ 60 นาที นำไป spread plate บนอาหาร NA เพื่อตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อ

2.4 **ผลของแสงแดดต่อความคงตัวของเชื้อ** *B. subtilis* **NSRS 89-24 และ** *Bacillus* sp. LN 007

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ในอาหารเหลว Mckeen จนอายุได้ 48 ชั่วโมง นำมาเจือจางในน้ำกลั่นให้เหมาะสม นำไป spread plate บนอาหาร NA ทำการทดสอบโดยนำไปผึ่งแดดโดยใช้แสงแดดในช่วงเวลา 11.00-13.00 นาฬิกา แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองควบคุมเป็นชุดที่คว่ำจานเพาะเชื้อขณะที่นำไปผึ่งแดดเนื่องจากรังสี UV ซึ่งมีอยู่ในแสงแดดมีอำนาจทะลุทลวงน้อยไม่สามารถผ่านแก้วได้ ส่วนอีกชุดการทดลองให้หงายจานเพาะเชื้อขึ้นและเปิดฝาออก ทำการเก็บตัวอย่างจานเพาะเชื้อที่เวลา 0 5 10 20 30 60 และ 120 นาที นำไปเก็บในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต

3. อิทธิพลของส่วนผสมที่ใช้เตรียมสูตรเชื้อต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข.23

ใช้สารเคมีดังนี้

-preservative

1) กรดแลคติก (lactic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.5 และ 1.0

2) เมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท (methyl hydroxybenzoate) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.5, และ 1.0

3) โปแตสเซียมซอร์เบท (potassium sorbate) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.5, และ 1.0

-emulsifier

1) น้ำมันถั่วเหลือง (soy bean oil) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.2 และ 0.4

2) tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.2 และ 0.4

3) tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.2 และ 0.4

-binder

1) คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (carboxy methyl cellulose) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 2.5 และ 5.0

2) อัลจีเนต (alginate) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 2.5 และ 5.0

3) คาราจีแนน (carrageenan) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 2.5 และ 5.0

-protectant

1) กลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.6 และ 1.0

2) กลูตาเมต (glutamate) ความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.6 และ 1.0

การเตรียมเมล็ดพันธุ์ทดสอบ โดยฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง โดยทำการทดลองในตู้ปลอดเชื้อแบบลมเป่า ใช้เมล็ดพันธุ์ทดสอบชุดการทดลองละ 100 เมล็ด แบ่งเป็น 4 ซ้ำ ซ้ำละ 25 เมล็ด ทำการจุ่มเมล็ดพันธุ์ทดสอบกับสารในแต่ละชุดการทดลองนาน 5 นาที ให้สารละลายเคลือบผิวเมล็ดเป็นเยื่อบาง ๆ ให้ทั่วถึง นำเมล็ดไปวางในจานเพาะเชื้อ ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งให้แห้งภายใต้กระแสลมที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์นาน 15 นาที นำเมล็ดไปเพาะในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร โดยใช้กระดาษกรอง 3 ชั้น ดูดซับน้ำไว้ในปริมาณที่เพียงพอตลอดระยะเวลาของการทดสอบ นำจานเพาะเมล็ดไปวางที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับการงอกทุกวันจนครบ 14 วัน บันทึกข้อมูลและประเมินผลดัชนีการงอกของเมล็ด และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด โดยเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใช้สารเคมีคลุกเมล็ด ส่วนการทดสอบความงอกมาตรฐาน ทำการตรวจนับครั้งแรกวันที่ 5 หลังเพาะเมล็ด และตรวจนับครั้งที่ 2 ในวันที่ 14 หลังเพาะเมล็ด บันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ ต้นกล้าปกติ ต้นกล้าผิดปกติ และเมล็ดตาย (จวงจันทร์ ดวงพัตรา, 2529) โดยทำการประเมินผลดังนี้

1) ดัชนีการงอกของเมล็ด โดยทำการตรวจนับเมล็ดที่มีการงอกตามปกติ เริ่มตรวจนับตั้งแต่เห็นส่วนรากงอกออกจากเมล็ด ตรวจนับทุกวันจนถึง 14 วันหลังเพาะ นำมาคำนวณค่าดัชนีการงอกของเมล็ดดังสูตร

$$\text{ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์} = \text{ผลบวกของ} \left[\frac{\text{จำนวนต้นกล้าที่งอก}}{\text{จำนวนวันหลังเพาะ}} \right]$$

2) เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด เริ่มนับตั้งแต่เห็นส่วนรากงอกออกจากเมล็ด ตรวจนับทุกวันจนถึง 14 วันหลังเพาะ นำเมล็ดที่งอกทุกเมล็ดมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

3) กล้างอกปกติ คือต้นกล้าที่มีส่วนประกอบครบถ้วน มีรากชั่วคราวที่แข็งแรงอย่างน้อยหนึ่งราก ยอดอ่อนสีเขียวสดแข็งแรง ส่วนยอดอ่อนมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของปลอกหุ้มยอด บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 5 วัน และ 14 วัน

4) กล้างอกผิดปกติ คือต้นกล้าที่มีลักษณะอ่อนแอ หงิกงอ มีรอยไหม้หรือจุดแผล บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 5 วัน และ 14 วัน

5) เมล็ดตาย คือเมล็ดที่เน่าตาย ไม่มีการเจริญของต้นกล้า บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 14 วัน

จากการทดลองขั้นนี้ เลือกชนิดและความเข้มข้นของสารที่ไม่มีผลในทางลบต่อเมล็ดข้าวอย่างละ 2 ชุดการทดลอง มาใช้ในการทดลองต่อไป

นำสารเคมีที่คัดเลือกได้มารวมเป็นสูตรต่างๆ ได้ 12 ชุดการทดลอง แล้วทำการทดลองกับเมล็ดข้าวเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวมาแล้วอีกครั้ง ตรวจนับการงอกทุกวันจนครบ 14 วัน ประเมินผลดัชนีการงอกของเมล็ด และความแข็งแรงของเมล็ด เลือกชุดการทดลองที่ดีที่สุด 9 ชุดการทดลอง ไปศึกษาต่อ

4. อิทธิพลของส่วนผสมในการเตรียมสูตรเชื้อต่อต้นข้าว

นำชุดการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง ที่เลือกจากข้อ 3 มาทดสอบ ใช้ต้นพันธุ์ข้าว กข. 23 ที่มีอายุ 15, 30 และ 45 วัน ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร กระถางละ 4 ต้น ฉีดพ่นสารเคมีลงบนต้นด้วย foggy เป็นเวลา 30 วินาที ทำการบันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของต้นข้าว (บิดเบี้ยว แคระแกร็น) สีต้นข้าว ความสูง การแตกกอของต้นข้าว นอกจากนี้บันทึกการเกิด phytotoxic ต่อใบข้าวและต้นข้าว โดยให้เป็นคะแนนตามวิธีการให้คะแนนมาตรฐานของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRTP, 1980) หลังทำการทดลอง 14 วัน เลือกชุดการทดลองที่ดีที่สุด 4 ชุดการทดลอง ไปศึกษาต่อ

5. การผลิตและการเก็บรักษาสูตรเชื้อ

เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mckeen 100 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนได้ตามระยะที่เหมาะสมตามข้อ 2 นำไปเหวี่ยงแยกเชื้อด้วยความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที (4031X*g*)อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำเซลล์ที่ได้ล้างด้วยน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ ทำการเตรียมสูตรเชื้อที่เลือกได้ตามข้อ 4 โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 นำไปละลายในน้ำกลั่น โดยให้ได้เชื้อประมาณ $5X10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร นำสูตรเชื้อที่ผลิตได้ทั้งหมดไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างสูตรเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องครั้งละ 10 มิลลิลิตร ที่เวลาเริ่มต้น ทุก 15 วัน ในเดือนแรก ทุก 30 วันใน 2 เดือนถัดไป และหลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 60 วัน จนถึงระยะเวลา 1 ปี นำมาหาอัตราการรอดชีวิตโดยวิธี spread plate บนอาหาร NA ส่วนสูตรเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะนำมาหาอัตราการรอดชีวิตเมื่อสูตรเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำกว่า 10^3 CFU ต่อ มิลลิลิตร

6. ประสิทธิภาพของสูตรเชื้อ *Bacillus* spp. ต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23

ทำการเตรียมสูตรเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 5 นำมาทดสอบ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 10 ชุดการทดลอง คือ

-เมล็ดฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่เมล็ดข้าวในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้นร้อยละ 2.5 เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ผึ่งให้แห้ง

- เมล็ดปกติ

- เมล็ดปกติคลุกสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 จำนวน 4สูตร

- เมล็ดปกติคลุกสูตรเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 จำนวน 4สูตร

ใช้เมล็ดข้าวทดสอบพันธุ์ กข. 23 ชุดการทดลองละ 100 เมล็ด แบ่งเป็น 4 ซ้ำ ซ้ำละ 25 เมล็ด นำเมล็ดไปเพาะบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 ดูดซับน้ำในปริมาณที่พอเหมาะ วางซ้อนกัน 3 ชั้น วางจานเพาะเมล็ดไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการงอกของเมล็ดทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน บันทึกข้อมูล

และประเมินผลดัชนีการงอกของเมล็ด นำผลการตรวจนับเมล็ดที่งอกปกติมาคำนวณหาค่าดัชนีการงอกของเมล็ด และ วิเคราะห์ความแข็งแรงของเมล็ด ในวันที่ 5 และ 14 หลังการเพาะเมล็ด บันทึกลักษณะต่างๆ ของเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ ต้นกล้าปกติ ต้นกล้าผิดปกติ และเมล็ดตาย

7. ประสิทธิภาพของสูตรเชื้อ *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งการเกิดโรคของข้าว

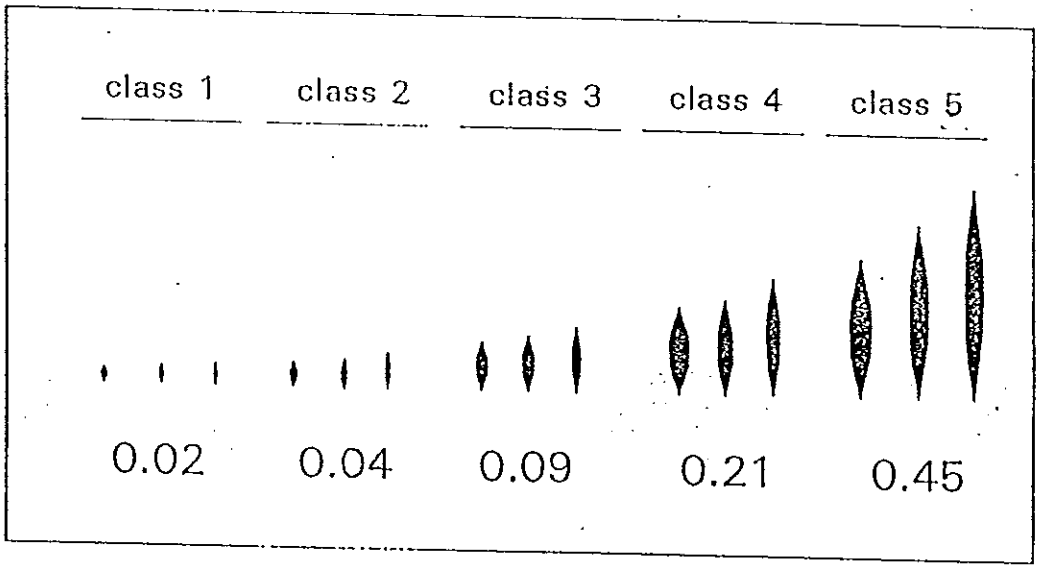
7.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรเชื้อต่อการยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้

การทดสอบกับเชื้อ *P. grisea* โดยทำการเพาะต้นข้าวพันธุ์ กข 23 ในกระบะขนาด 40x25 เซนติเมตร ใช้เมล็ดข้าวปริมาณ 10 กรัม จนอายุได้ 14 วัน นับตั้งแต่ต้นข้าวเริ่มงอกออกจากเมล็ด ทำการปลูกเชื้อ โดยวิธีดักล่อ โดยนำไปวางในแปลงข้าวพันธุ์ขาวตาแห้งซึ่งเกิดโรคใบไหม้ (รูปที่ 3) เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งจะมีโรคเกิดให้เห็นเล็กน้อย จากนั้นนำเข้ามาทำการทดลองในเรือนทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design, CRD) โดยทำการฉีดพ่นสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อ 1 ซ้ำ (1 กระบะ) ซึ่ง 1 ชุดการทดลอง มีทั้งหมด 4 ซ้ำ ทำการฉีดพ่นสูตรเชื้อ 3 ครั้ง คือ 2, 7 และ 12 วันหลังจากปลูกเชื้อรา *P. grisea* (นับจากวันแรกที่นำต้นข้าวไปวางในแปลงล่อ) โดยใช้ foggy และทำการฉีดพ่นในช่วงเวลาเย็นเพื่อป้องกันการถูกทำลายของเชื้อโดยรังสี UV ทำการตรวจผลการทดลองหลังจากการฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งแรก 7, 14 และ 21 วัน โดยตรวจดูขนาดของแผล ของใบที่ 2 และ 3 นับจากยอดของต้นข้าว (ใบที่ 2 และ 3 นับจากยอดต้นข้าวที่ทำการตรวจผลในแต่ละครั้งจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเรื่อยๆ เนื่องจากต้นข้าวมีการเจริญเติบโต) โดยแต่ละซ้ำจะทำการตรวจผลแบบสุ่มจำนวน 25 ต้น โดยวิธีเปรียบเทียบกับขนาดบาดแผลมาตรฐานของโรคใบไหม้ (รูปที่ 4) นำมาทำการหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการทางสถิติในเรื่องความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT VERSION 9.2 การทดลองนี้ใช้ชุดการทดลอง 10 ชุดการทดลอง คือ

-สูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 4 ชุดการทดลอง

-สูตรเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 4 ชุดการทดลอง

-ชุดควบคุม สูตรเชื้อ (ไม่มีเชื้อ *Bacillus* spp.) 1 ชุดการทดลอง



รูปที่ 3 ขนาดบาดแผลมาตรฐานของโรคใบไหม้ (ที่มา : IRTP, 1980)

A

B

รูปที่ 4 แปลงล่อเชื้อโรคใบไหม้ข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง (A) และลักษณะการเกิดโรคใบไหม้ข้าวพันธุ์ กข 23 (B)

-ชุดควบคุม น้ำกลั่น 1 ชุดการทดลอง

-ชุดควบคุม สารป้องกันกำจัดเชื้อรา (beam ; Kasugamycin) 1 ชุดการทดลอง

7.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรเชื้อต่อการยับยั้งการเกิดโรคกาบใบแห้ง

การทดสอบกับเชื้อ *R. solani* ทำการปลูกต้นข้าวพันธุ์ กข 23 ลงในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร กระถางละ 4 ต้น เลี้ยงไว้ในเรือนทดลอง จนมีอายุได้ 25 วัน นับตั้งแต่เริ่มงอกจากเมล็ด ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design, CRD) ทำการปลูกเชื้อ *R. solani* โดยใช้เชื้อ *R. solani* ที่เลี้ยงเตรียมไว้ในท่อนฟางขนาด 1 เซนติเมตร นำมาติดที่ต้นข้าวทุกหน่อในแต่ละต้น (1 ต้นจะมี 3 หน่อ) ในแต่ละชุดการทดลอง ที่ระดับผิวน้ำใช้พาราฟิล์มพันให้ท่อนฟางติดอยู่กับต้นข้าว ทำการฉีดพ่นสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อ 1 ซ้ำ (1 กระถาง) ซึ่ง 1 ชุดการทดลอง มีทั้งหมด 4 ซ้ำ ทำการฉีดพ่นสูตรเชื้อทำ 3 ครั้ง คือ 1, 5 และ 10 วันหลังจากปลูกเชื้อรา *R. solani* โดยใช้ foggy และทำการฉีดพ่นในช่วงเวลาเย็นเพื่อป้องกันการถูกทำลายของเชื้อโดยรังสี UV ทำการตรวจผลหลังจากการฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งแรก 7 14 21 และ 28 วัน โดยวิธีวัดความยาวของแผล (ที่เกิดจากเชื้อโรค) ทุกแผลบนต้นข้าวทุกหน่อและทุกต้นที่ทำการทดลอง จากนั้นนำมาคำนวณหาความยาวของแผลต่อหน่อในแต่ละซ้ำ โดยนำความยาวของแผลทุกแผลที่วัดได้มาบวกกันจากนั้นหารด้วยจำนวนหน่อที่ทดลองจะได้หาค่าเฉลี่ย นำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการทางสถิติในเรื่องความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT VERSION 9.2 การทดลองนี้ใช้ชุดการทดลอง 11 ชุดการทดลอง คือ

-สูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 4 ชุดการทดลอง

-สูตรเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 4 ชุดการทดลอง

-ชุดควบคุม สูตรเชื้อ (ไม่มีเชื้อ *Bacillus* spp.) 1 ชุดการทดลอง

-ชุดควบคุม น้ำกลั่น 1 ชุดการทดลอง

-ชุดควบคุม ไม่ปลูกเชื้อรา *R. solani* 1 ชุดการทดลอง

8. การศึกษาคุณภาพของสูตรเชื้อหลังทำการเก็บรักษา

8.1 **การทดสอบการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อ** *Bacillus* spp. **ที่เก็บรักษาไว้ในสูตรเชื้อ (สูตรน้ำ) นาน 12 เดือน** โดยถ่ายเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ที่เก็บรักษาไว้ในสูตรเชื้อนาน 12 เดือนลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA นาน 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ 2 ลูปมาตรฐาน ลงในอาหารเหลว LB 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 16-18 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อ ถ่ายกล้าเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mckeen 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0 6 12 18 24 30 36 42 และ 48 ชั่วโมง นำไปวัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง นำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* เช่นเดียวกับข้อ 1.2.5

8.2 **การทดสอบความคงตัวต่อแสงแดดของสูตรเชื้อ** นำสูตรเชื้อที่ผลิตได้ทุกสูตรมาเจือจางในน้ำกลั่นให้เหมาะสม นำไป spread plate บนอาหาร NA จากนั้นนำไปทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4

บทที่ 3

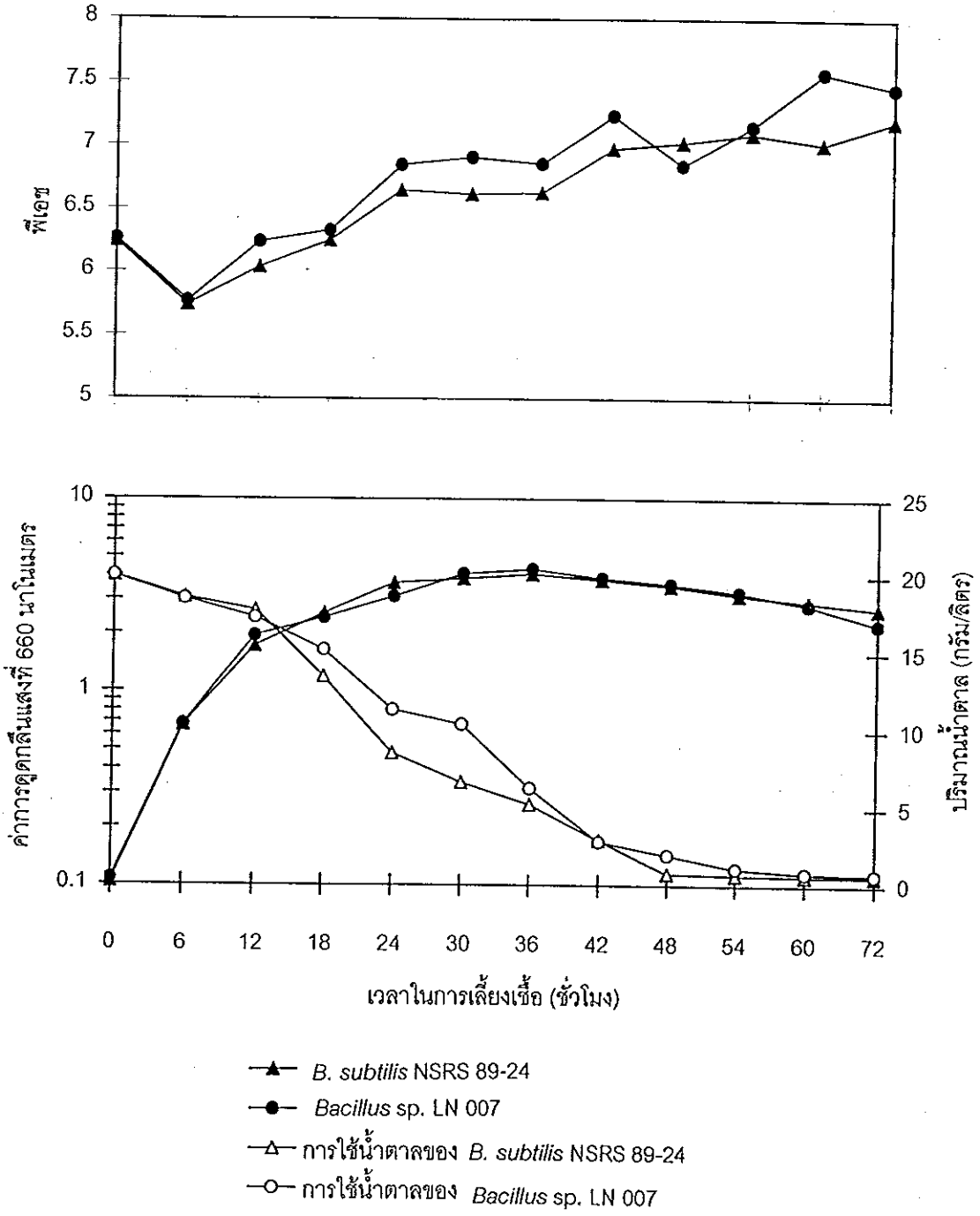
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเจริญของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารเหลว Mckeen พบว่าเชื้อเจริญได้ในอัตราที่สูงสุดในชั่วโมงที่ 6-12 และให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมงของการเลี้ยง หลังจากนั้นการเจริญมีแนวโน้มคงที่และค่อย ๆ ลดลง เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงมีค่าเป็น 4.09 (OD_{660}) หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงจนเหลือ 2.71 (OD_{660}) เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่เวลา 72 ชั่วโมง ในทำนองเดียวกันเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารเหลว Mckeen พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมงของการเลี้ยง มีค่าเป็น 4.33 (OD_{660}) หลังจากนั้นค่าการดูดกลืนแสงจะค่อย ๆ ลดลงจนเหลือ 2.25 (OD_{660}) เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่เวลา 72 ชั่วโมง สำหรับพีเอชมีค่าที่สูงขึ้นเมื่อมีการเลี้ยงเชื้อนานขึ้น โดยเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 มีพีเอชเริ่มต้นที่ 6.24 และ 6.26 เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 72 ชั่วโมง ค่าพีเอชจะเพิ่มเป็น 7.20 และ 7.46 ตามลำดับ (รูปที่ 5)

การตรวจดูการสร้างสปอร์ของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 ชนิด เริ่มสร้างสปอร์หลังการเลี้ยงเชื้อ 36 ชั่วโมง (ตารางที่ 3) ซึ่งให้ผลตรงกับคำกล่าวของ บัญญัติ สุขศรีงาม (2534) ที่ว่าการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียจะเกิดในระยะ stationary ซึ่งจากการทดลองระยะเริ่มต้น stationary อยู่ที่ 18 ชั่วโมง

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mckeen จะแปรผกผันกับการเจริญของเชื้อ *Bacillus* spp. ซึ่งในระยะที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว (log phase) ปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อก็ลดลงอย่างมาก จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 5.23 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และลดลงเหลือ 6.28 กรัมต่อลิตรในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่ช่วงปลายระยะ stationary ปริมาณน้ำตาลยังคงลดลงในอัตราที่ต่ำลง (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การเจริญของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารเหลว Mckeen ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

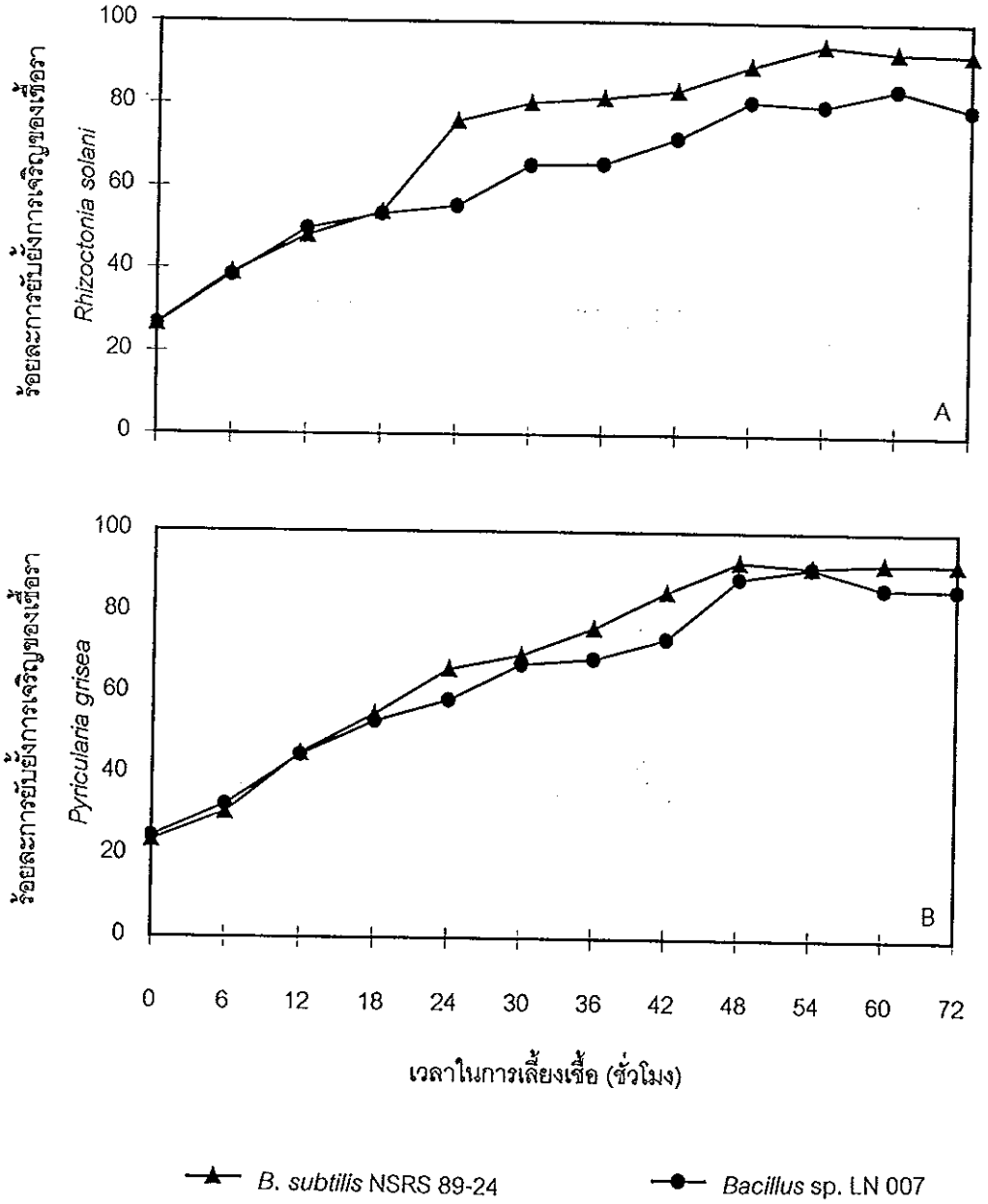
ตารางที่ 3 ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

ระยะเวลา	*Bacillus subtilis* NSRS 89-24	*Bacillus* sp. LN 007
0	–	–
6	–	–
12	–	–
18	–	–
24	–	–
30	–	–
36	+	+
42	+	+
48	+	+
54	+	+
60	+	+
72	+	+

- ไม่มีการสร้างสปอร์

+ มีการสร้างสปอร์

การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* โดยน้ำหมัก (culture broth) หลังจากเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 พบว่า การยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงมากขึ้น หลังจาก 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วง late stationary phase หรือหลังจากเชื้อมีการเจริญสูงสุดแล้ว น้ำหมักหลังการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้สูงสุด โดยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ได้สูงถึงร้อยละ 91.65-92.64 และ ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้สูงถึงร้อยละ 89.53-94.56 (รูปที่ 6) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Brana และคณะ (1985) ซึ่งพบว่า การผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดนั้นการผลิตจะเริ่มขึ้นหลังจากที่เชื้อเจริญได้สูงสุดแล้ว เช่นเดียวกับการทดลองของ Ohno และคณะ (1995) ที่ศึกษาการผลิต surfactin จาก *B. subtilis* MI 113 โดยเลี้ยงแบบอาหารแข็ง ใช้ okara (soybean curd residues) เป็นสับสเตรท พบว่าเชื้อมีการผลิต surfactin ในช่วงชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเป็นช่วง late stationary phase โดยเชื้อเจริญได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ส่วนการผลิต Iturin A จาก *B. subtilis* NB 22 โดยใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทพบว่าเชื้อผลิต Iturin A ได้ดีในชั่วโมงที่ 48 เช่นกัน (Ohno *et al.*, 1992) Pusey และคณะ (1988) และ Pusey (1989) ศึกษาการผลิต Iturin A จาก *B. subtilis* B-3 โดยเลี้ยงในอาหาร nutrient-yeast-dextrose broth (NYDB) สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้นี้มีผลยับยั้งเชื้อรา *M. fructicola*, *B. cinerea* และ *Glomerella cingulata* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าในแอปเปิลและโรคราสีเทาในองุ่น พบว่าเชื้อสร้างสารยับยั้งได้มากที่สุดในชั่วโมงที่ 60 แต่ในทางตรงกันข้าม Haavik และ Thomasson (1973) ก็กล่าวว่า การที่มีการผลิตสารปฏิชีวนะพวกเปปไทด์ในช่วงหลังจากที่มีการเจริญแล้วนั้นไม่เป็นความจริงเสมอไป ถ้าอาหารนั้นมีสภาวะที่เหมาะสม เชื้อก็สามารถผลิตสารปฏิชีวนะในช่วงที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วได้ (rapid growth) ส่วนในชั่วโมงที่ 0 จะเห็นได้ว่ามีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* เป็นร้อยละ 23.52 และ 26.52 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากในอาหาร Mckeen มีส่วนประกอบของ คอปเปอร์ซัลเฟต และเฟอร์รัสซัลเฟต ซึ่งโดยทั่วไปจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ดังนั้นเมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ในระดับหนึ่ง



รูปที่ 6 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* (A) และ *R. solani* (B) โดยน้ำหมักของ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

ในทำนองเดียวกันการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทั้ง 2 ชนิด โดยน้ำหมักหลังการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 พบว่าจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีการยับยั้งสูงสุดเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 48-72 ชั่วโมง โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. grisea* ได้ร้อยละ 86.16-91.26 และยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solani* ได้ร้อยละ 79.05-83.81 (รูปที่ 6) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทั้ง 2 ชนิด พบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดย *B. subtilis* NSRS 89-24 จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการยับยั้งโดยเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007

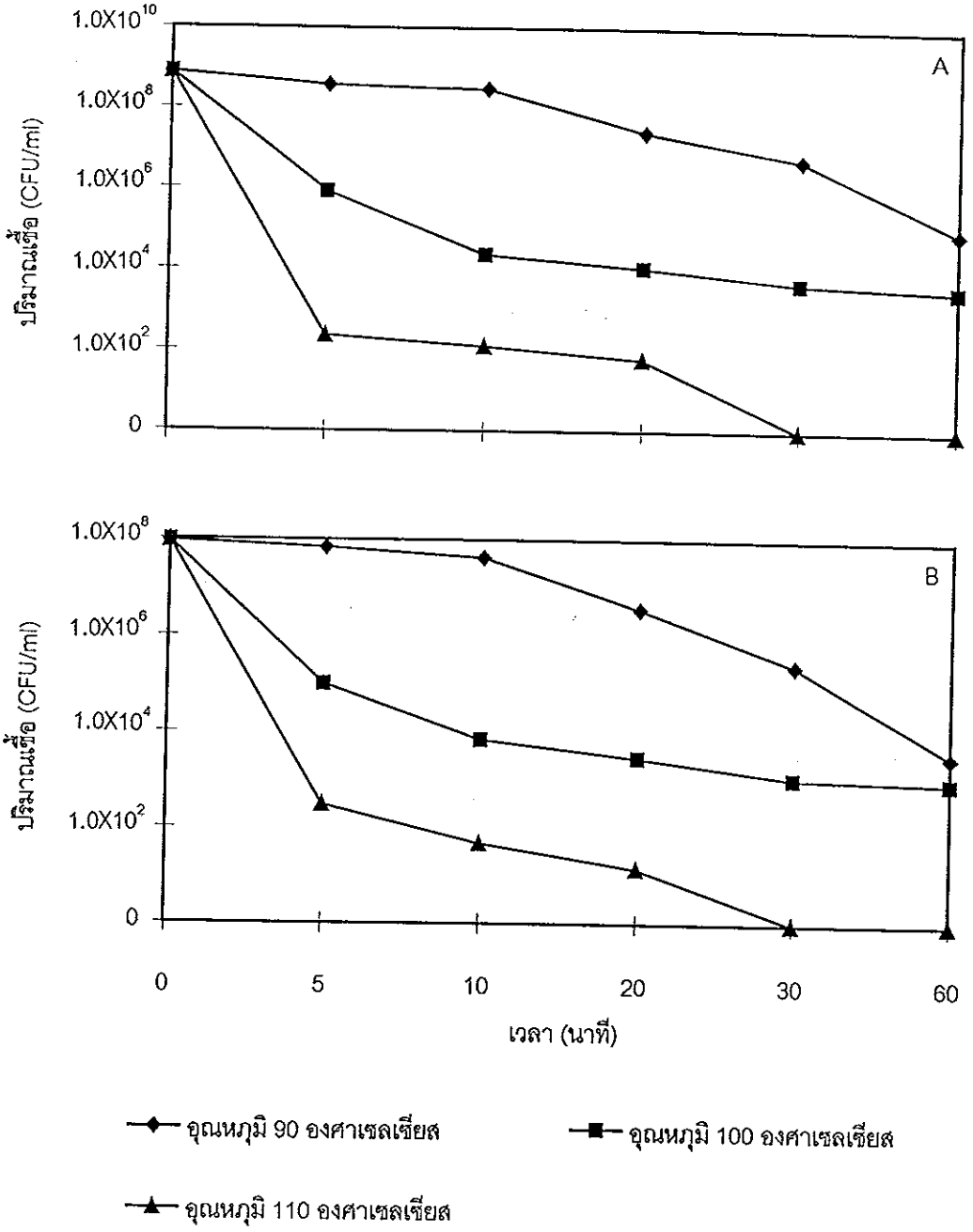
2. การทนต่อสภาวะต่างๆ ของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

2.1 ผลของการทนความร้อนของเชื้อ

2.1.1 ผลของการทนความร้อนของเซลล์

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 นาน 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะ mid log phase (รูปที่ 5) แล้วใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดสอบ พบว่ามีปริมาณเชื้อ 1.19×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ 3 log cycle คือปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 2.16×10^3 และ 1.93×10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ทำให้ปริมาณเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ลดลงเหลือ 3.20×10^2 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 และ 10 นาที ทำให้ปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 1.13×10^3 และ 2.35×10^2 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเพิ่มเวลาการให้ความร้อนเป็น 20 นาที สามารถฆ่าตัวเซลล์ของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ได้ทั้งหมด (รูปที่ 7A)

ในทำนองเดียวกันการทดสอบการทนความร้อนของเซลล์เชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 จากเชื้อเริ่มต้นที่เลี้ยงนาน 12 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อ 1.47×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ทำให้ปริมาณเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ลดลงเหลือ 2.12×10^3 และ 1.02×10^3 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ทำให้ปริมาณเชื้อ *Bacillus*



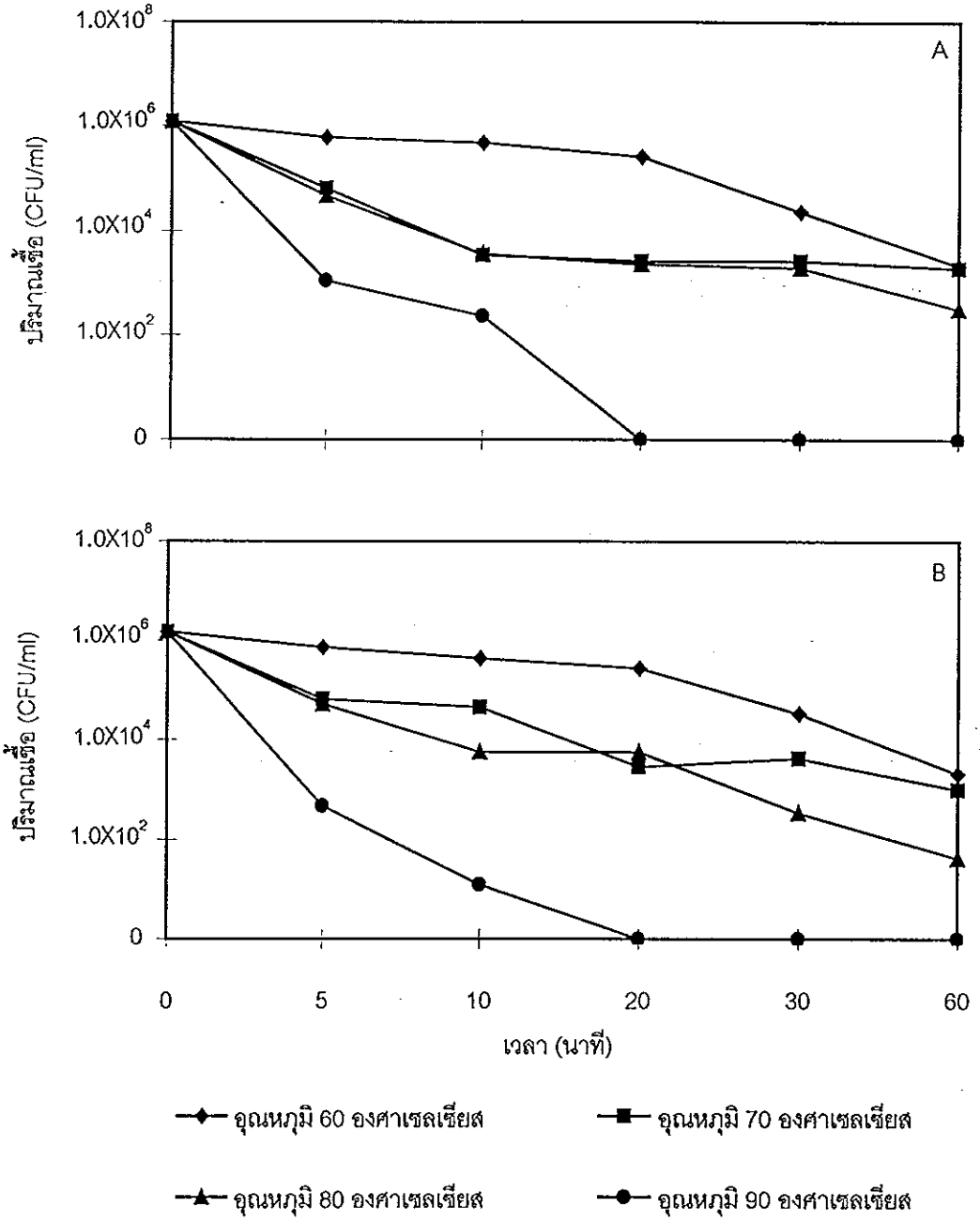
รูปที่ 7 ผลของความร้อนต่อการรอดชีวิตของเซลล์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24(A) และ *Bacillus* sp. LN 007(B)

sp. LN 007 ลดลงถึง 5 log cycle คือเหลือปริมาณเชื้อ 4.17x10 CFU ต่อมิลลิลิตร และการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 และ 10 นาที ทำให้ปริมาณเชื้อลดลงเหลือ $4.65x10^{2}$ และ 1.24x10 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเพิ่มเวลาให้ความร้อนเป็น 20 นาทีสามารถฆ่าตัวเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ได้ทั้งหมดเช่นกัน (รูปที่ 7B) เช่นเดียวกับ William และ Dennis (1988) กล่าวว่าที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส สามารถฆ่าเซลล์ของ *B. subtilis* ได้หมด ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น สภาพแวดล้อมของการเลี้ยงเชื้อ อายุของเซลล์ ความเข้มข้นของปริมาณเซลล์ ตลอดจนสภาวะของการให้ความร้อน

2.1.2 ผลการทนความร้อนของสปอร์

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 นาน 48 ชั่วโมง ทำการฆ่าตัวเซลล์แบคทีเรียโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำมาเป็นสปอร์เริ่มต้นในการทดสอบ พบว่ามีปริมาณสปอร์ $7.60x10^{8}$ CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที สามารถลดปริมาณสปอร์ลงเหลือ $8.90x10^{4}$ และ $3.23x10^{3}$ CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 5 10 และ 20 นาที ทำให้ปริมาณสปอร์ของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ลดลงเหลือ $2.30x10^{2}$ $1.26x10^{2}$ และ 6.00x10 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และการเพิ่มเวลาให้ความร้อนเป็น 30 นาทีสามารถฆ่าสปอร์ของ *B. subtilis* NSRS 89-24 ได้ทั้งหมด (รูปที่ 8A)

ในทำนองเดียวกันการทดสอบการทนความร้อนของสปอร์เชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 เตรียมสปอร์โดยเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง แล้วทำลายตัวเซลล์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที พบว่ามีปริมาณสปอร์เริ่มต้น $9.25x10^{7}$ CFU ต่อมิลลิลิตร การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ทำให้ปริมาณสปอร์ของ *Bacillus* sp. LN 007 ลดลงเหลือ $3.41x10^{3}$ และ $9.50x10^{2}$ CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 5 10 และ 20 นาที ทำให้ปริมาณสปอร์ของ *Bacillus* sp. LN 007 ลดลงเหลือ $3.00x10^{2}$ 4.70x10 และ 1.43x10 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มเวลาให้ความร้อนเป็นเวลา 30 นาทีสามารถฆ่าสปอร์ของ *Bacillus* sp. LN 007 ได้ทั้งหมดเช่นกัน (รูปที่ 8B) ส่วน



รูปที่ 8 ผลของความร้อนต่อการรอดชีวิตของสปอร์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24(A) และ *Bacillus* sp. LN 007(B)

William และ Dennis (1988) กล่าวว่าสปอร์ของ *B. subtilis* จะถูกฆ่าตายหมดเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ซึ่งให้ผลที่แตกต่างจากผลการทดลองที่ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องทำให้สปอร์ของ *B. subtilis* มีความทนทานต่อความร้อนได้แตกต่างกัน ได้แก่ สายพันธุ์ของ *Bacillus* ที่แตกต่างกัน และ พีเอชของอาหารที่แตกต่างกัน จะมีผลต่อการทนความร้อนของสปอร์ที่แตกต่างกัน

2.2 **ผลของพีเอชต่อการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus*** sp. LN 007

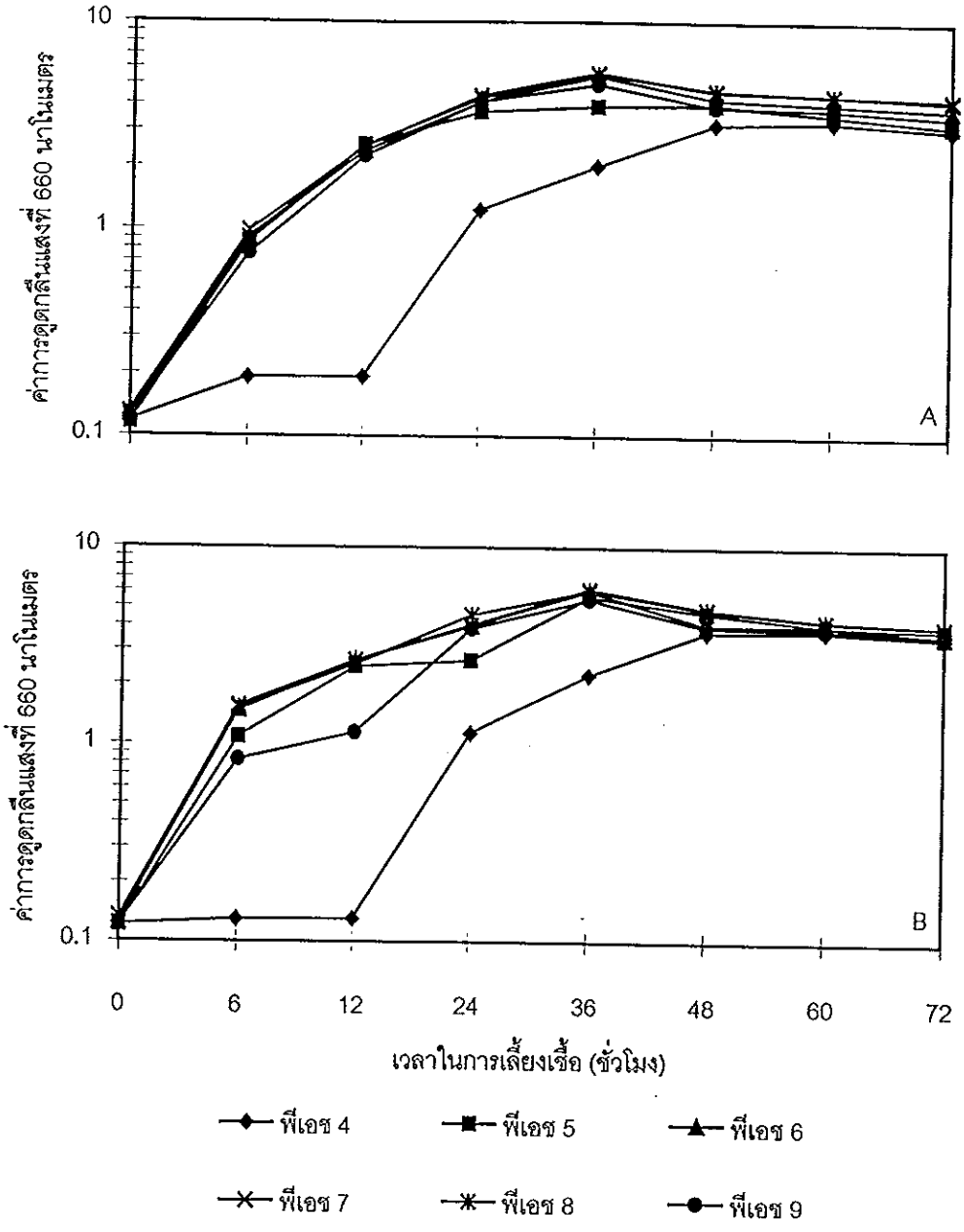
2.2.1 **การเจริญของเซลล์**

การทดสอบการเจริญของเชื้อในอาหาร Mckeen ที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆ กัน โดยใช้เชื้อที่เลี้ยงนาน 12 ชั่วโมงเป็นเชื้อเริ่มต้น พบว่า ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4 *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์จะมีอัตราการเจริญที่ช้าอีกทั้งยังมี lag phase นานถึง 12 ชั่วโมง และมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 3.33 สำหรับเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ 3.78 สำหรับเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ส่วนในชุดการทดลองที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 5 ถึงแม้จะพบว่ามีช่วง lag phase ที่สั้นแต่มีการเจริญของเชื้อค่อนข้างต่ำ และมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยจะให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 4.01 และ 5.61 สำหรับเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ เชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ตามลำดับ (รูปที่ 9) (ตารางภาคผนวกที่ 1)

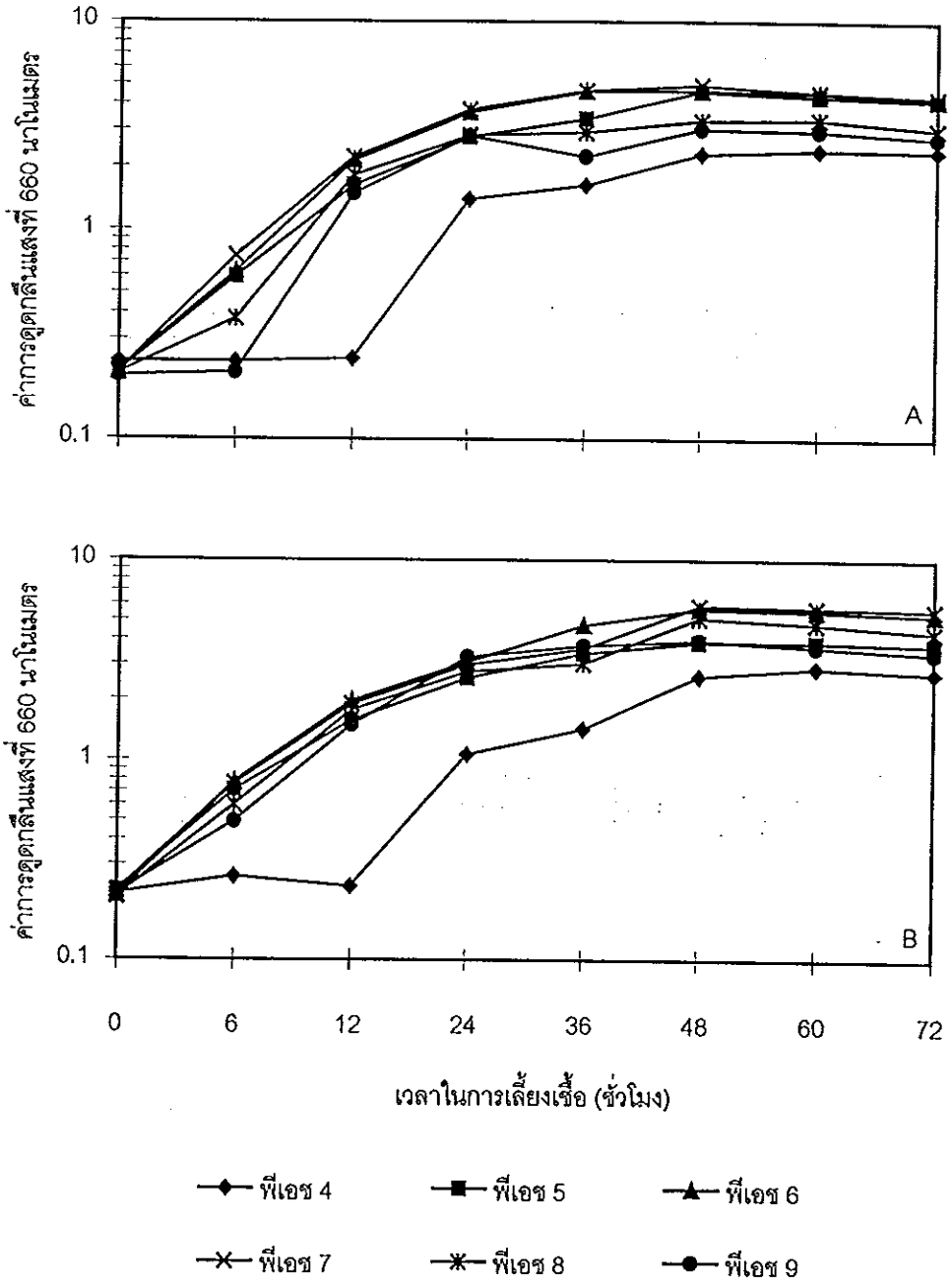
สำหรับในอาหาร Mckeen ที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 6 7 8 และ 9 นั้นเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีกว่าชุดการทดลองข้างต้น แต่พีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus* คือพีเอช 7 โดยมีการเจริญที่สูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมงให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 5.68 และ 6.16 สำหรับเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ เชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ตามลำดับ (รูปที่ 9) เช่นเดียวกับการศึกษาของวาสนา มู่สา (2542) ที่พบว่าการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 สามารถเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร Mckeen ที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 7

2.2.2 **การงอกและการเจริญของสปอร์**

เตรียมสปอร์สำหรับทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 จากการทดลองพบว่าผลที่ได้จะไปในทำนองเดียวกันกับข้อ 2.2.1 แต่จะแตกต่างกันที่อัตราการเจริญของสปอร์ค่อนข้างจะ



รูปที่ 9 การเจริญของเซลล์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24(A) และ *Bacillus* sp. LN 007(B) ที่พีเอชต่างๆ



รูปที่ 10 การเจริญของสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24(A) และ *Bacillus* sp. LN 007(B) ที่พีเอชต่างๆ

ต่ำกว่าเซลล์ มีระยะ lag phase ที่นานกว่า ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เป็นสปอร์จึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการงอกก่อนที่จะมีการเจริญต่อไป อีกทั้งเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ยังต้องผ่านการให้ความร้อนเพื่อแยกตัวเซลล์ออกจากสปอร์ทำให้สปอร์บางส่วนเกิดการบาดเจ็บไม่สามารถเจริญต่อไปได้หรือเจริญได้ช้าลง สำหรับการงอกของสปอร์และการเจริญที่ดีที่สุดคือที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 7 โดยเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ เชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 มีการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 4.96 และ 5.88 ตามลำดับ (รูปที่ 10) (ตารางภาคผนวกที่ 2)

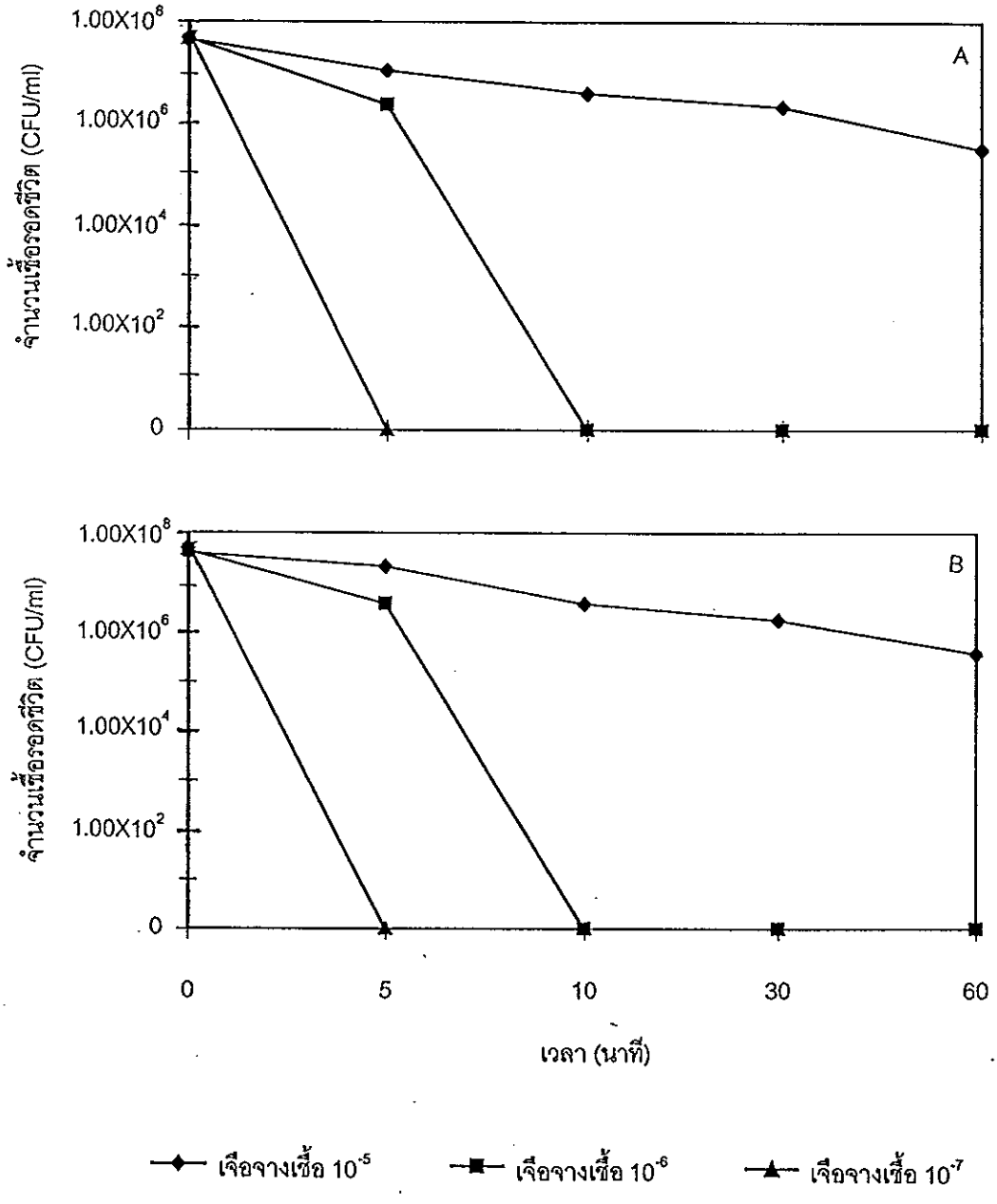
2.3 ผลของรังสี UV ต่อความคงตัวของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

2.3.1 **ความคงตัวของเซลล์**

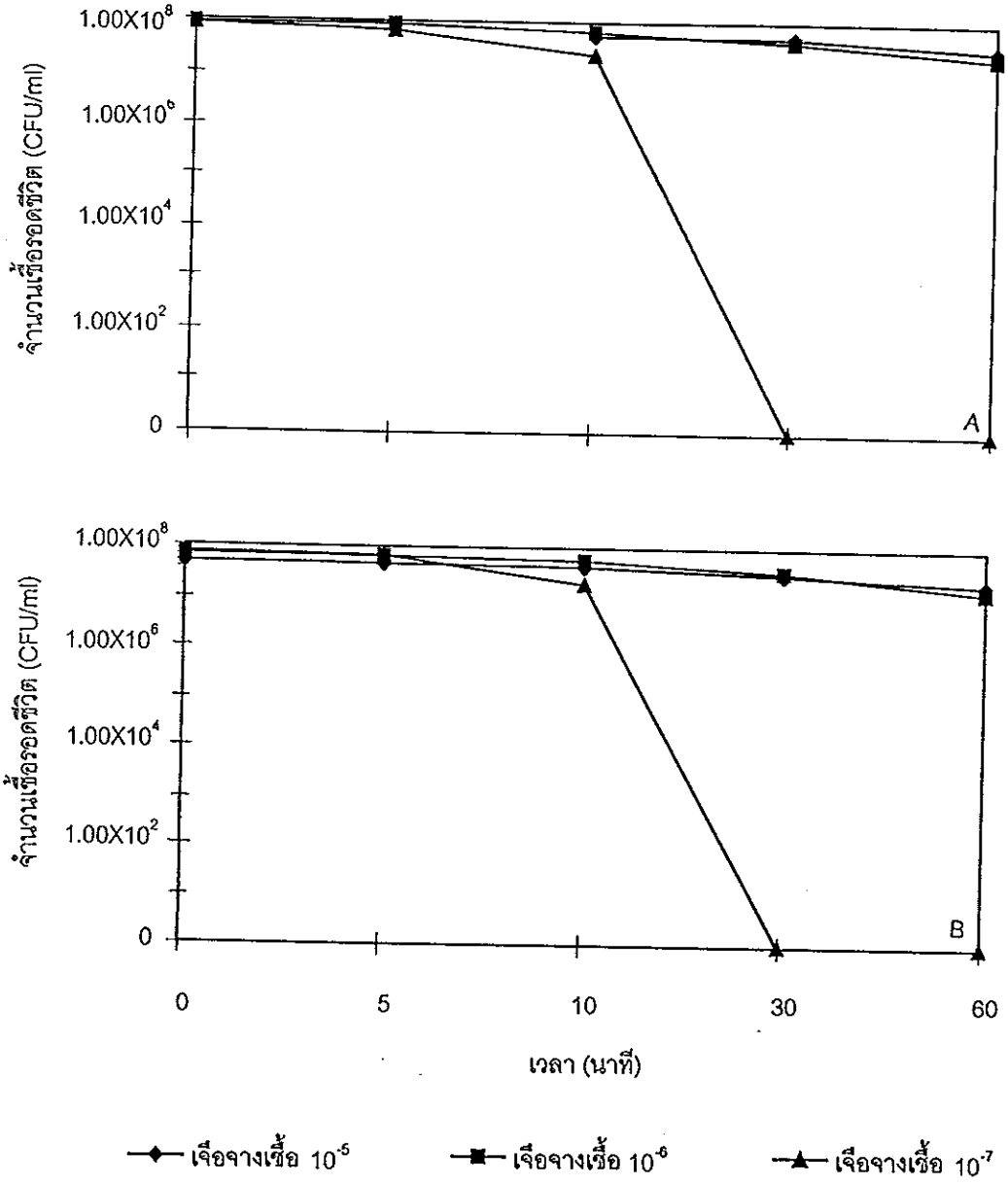
ใช้เชื้อในระยะ mid log phase (12 ชั่วโมง) มาทำการทดลอง พบว่าเมื่อนำสารแขวนลอยเชื้อที่เจือจางในน้ำกลั่นเป็น 10^{-5} เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ เชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 4.51×10^{7} และ 3.95×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาทดสอบกับรังสี UV เป็นเวลานาน 60 นาที พบว่ามีเชื้อที่รอดชีวิตเป็น 3.21×10^{5} และ 3.67×10^{5} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่เจือจางเป็น 10^{-6} และ 10^{-7} เมื่อนำมาทดสอบกับรังสี UV พบว่าตัวเซลล์ถูกฆ่าหมดโดยใช้เวลา 5 และ 10 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 11) ทั้งนี้เนื่องจากรังสี UV ซึ่งเป็นแสงสีม่วงน้ำเงิน มีความยาวคลื่นระหว่าง 13.6-396 นาโนเมตร สำหรับความยาวคลื่นที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้คือ 200-290 นาโนเมตร เป็นรังสีที่มีพลังงานต่ำ ทำให้มีอำนาจการทะลุทลวงน้อย ไม่สามารถผ่านแก้ว พลาสติก สารละลายที่มีความขุ่น (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) ดังนั้นการเจือจางเชื้อทำให้ความเข้มข้นของเชื้อน้อยลง และเซลล์มีโอกาสสัมผัสกับรังสี UV ได้ดีขึ้น ทำให้เซลล์ตายหรือบาดเจ็บได้มากขึ้น

2.3.2 **ความคงตัวของสปอร์**

เตรียมสปอร์สำหรับทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 ผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกับข้อ 2.3.1 แต่พบว่าสปอร์ของเชื้อ *Bacillus* สามารถทนทานต่อรังสี UV ได้ดีกว่าตัวเซลล์ เมื่อนำสารแขวนลอยของสปอร์ที่เจือจาง 10^{-5} และ 10^{-6} ซึ่งมีปริมาณเชื้อมากกว่า 5.62×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร และ 8.80×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร (*B. subtilis* NSRS 89-24)



รูปที่ 11 การทนต่อรังสี UV ของเซลล์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24(A) และ *Bacillus* sp. LN 007(B)

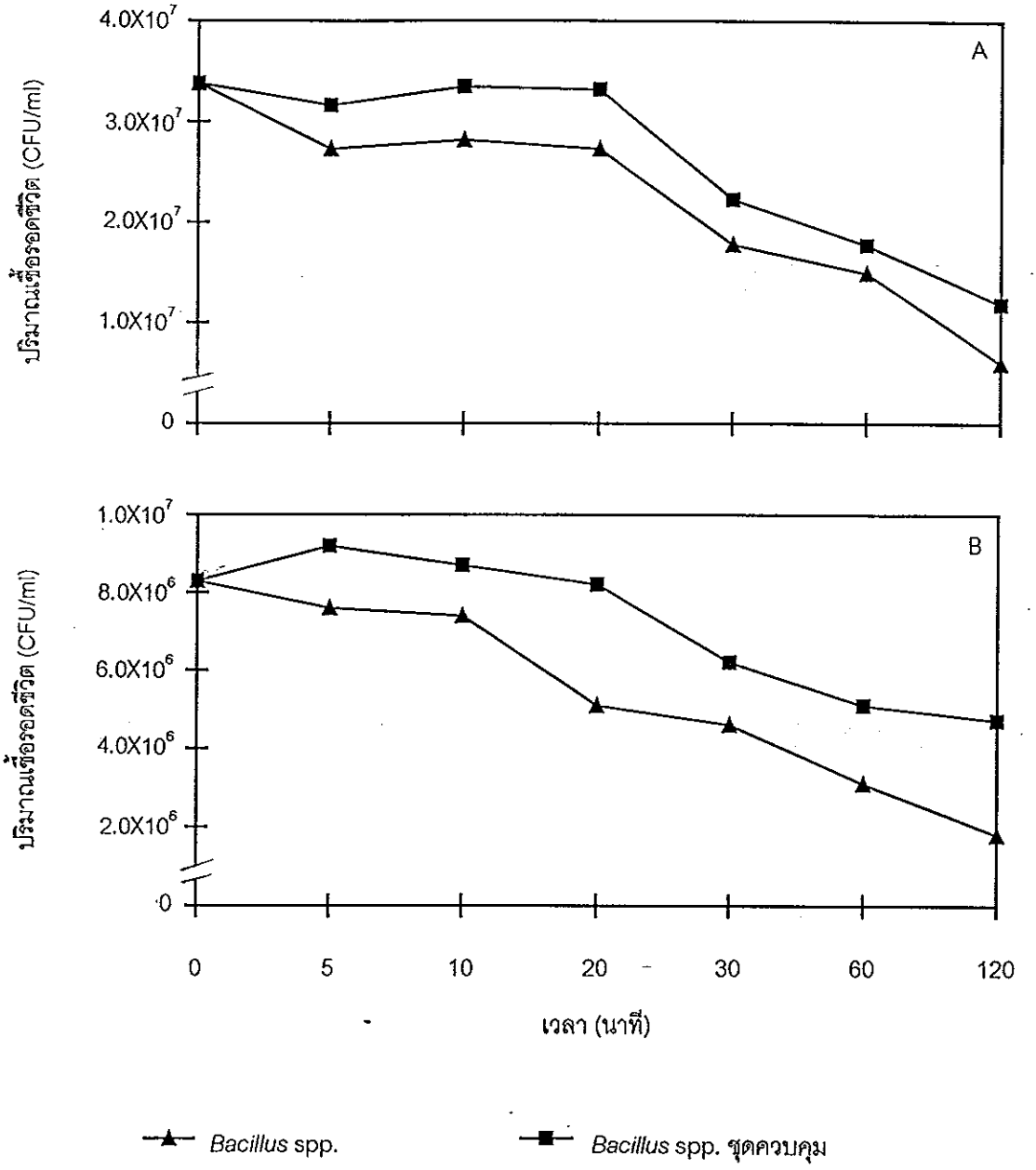


รูปที่ 12 การทนรังสี UV ของสปอร์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24(A) และ *Bacillus* sp. LN 007(B)

และ $4.86X10^7$ CFU ต่อมิลลิลิตร และ $6.78X10^7$ CFU ต่อมิลลิลิตร (*Bacillus* sp. LN 007) ไปทดสอบกับรังสี UV เป็นเวลานาน 60 นาที สปอร์ของเชื้อก็ยังคงเหลือรอดชีวิตอยู่ ส่วนสปอร์ที่เจือจางเป็น 10^{-7} ซึ่งมีปริมาณเชื้อ $8.46X10^7$ CFU ต่อมิลลิลิตร และ $7.58X10^7$ CFU ต่อมิลลิลิตร จะต้องทดสอบกับรังสี UV นาน 30 นาที จึงจะสามารถฆ่าสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ เชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ได้หมด (รูปที่ 12)

2.4 ผลของแสงแดดต่อความคงตัวของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

ใช้เชื้อที่เลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบความคงตัวของเชื้อ *Bacillus* ต่อแสงแดด พบว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถทนต่อแสงแดดได้ดี คือเมื่อทำการทดลองกับแสงแดดนาน 120 นาที ปริมาณของเชื้อจะลดลงประมาณ 1 log cycle โดยเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 จะลดลงจาก $3.38x10^7$ CFU ต่อมิลลิลิตร เหลือ $5.90x10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ลดลงจาก $8.30x10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร เหลือ $1.80x10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 13) การลดลงของปริมาณเชื้อ *Bacillus* เนื่องมาจากการทำลายโดยรังสี UV ที่มีอยู่ในแสงแดด รังสี UV ที่ได้รับจากแสงของดวงอาทิตย์ ในแต่ละปีโลกจะได้รับรังสี UV (ที่มีความยาวคลื่นน้อยกว่า 250 นาโนเมตร) ประมาณ $300X10^{19}$ แคลอรี รังสี UV จะมีผลต่อโครงสร้างของเซลล์ที่ดูดซับรังสีนี้ไว้ได้ดี เช่น DNA, RNA, โปรตีนและสารอินทรีย์อื่นๆ โครงสร้างที่ดูดซับรังสี UV ไว้นี้พบว่าผลที่เกิดขึ้นกับ DNA จะมีผลต่อเซลล์มากที่สุด เพราะ DNA เป็นสารพันธุกรรมจึงควบคุมกลไกในการดำเนินชีวิตของเซลล์ โครงสร้างสำคัญในการทดูดซับรังสี UV ของ DNA ก็คือ เบสชนิดต่างๆ ดังนั้นเมื่อเซลล์ได้รับรังสี UV จะทำให้เกิดการรวมตัวกันของเบส เป็น dimer ทำให้ hydrogen bond ที่ยึดระหว่างสายของ DNA ถูกทำลาย เป็นผลให้ลักษณะเกลียวของ DNA ถูกทำลาย อย่างไรก็ตาม การเกิด dimer ดังกล่าวนี้ จะทำให้เซลล์ตายได้ก็ต่อเมื่อไปมีผลทำให้ DNA ไม่สามารถจำลองตัวเองได้ หรือทำให้ยีนส์ที่ควบคุมหน้าที่สำคัญของเซลล์ผิดปกติไป (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534) นอกจากนี้การลดลงของปริมาณเชื้อ *Bacillus* อาจเกิดจากสาเหตุจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นขณะทำการทดลอง เนื่องจากในชุดการทดลองควบคุมที่ค่อนข้างเพาะเชื้อปริมาณเชื้อ *Bacillus* มีการลดลงบ้างเล็กน้อย



รูปที่ 13 การทนแสงแดดของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24(A) และ *Bacillus* sp. LN 007 (B)

3. อิทธิพลของส่วนผสมที่ใช้เตรียมสูตรเชื้อต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23

ส่วนผสมในการเตรียมสูตรเชื้อประกอบด้วยสารเคมีทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ สารเคมีที่ใช้เป็น preservative ที่ใช้ในการทดสอบ คือ กรดแลคติก เมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท และโปแตสเซียมซอร์เบท ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.4 ซึ่งจะมีผลช่วยในการเก็บรักษาสูตรเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น สารเคมีที่ใช้เป็น emulsifier ประกอบด้วย น้ำมันถั่วเหลือง tween 80 และ tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 0.2 และ 0.4 เพื่อช่วยในการรวมเป็นเนื้อเดียวกันของเชื้อและสูตรเชื้อได้ดียิ่งขึ้น สารเคมีที่ใช้เป็น binder ที่ใช้ในการทดสอบคือ คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส อัลจีเนต และคาราจีแนน ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 2.5 และ 5.0 ซึ่งจะช่วยทำให้การยึดเกาะของสูตรเชื้อต่อต้นพืชได้ดียิ่งขึ้นเมื่อมีการนำไปใช้ และสารเคมีที่ใช้เป็น protectant ประกอบด้วย กลีเซอรอล และกลูตาเมต ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 0.6 และ 1.2 ซึ่งจะช่วยในการปกป้องเชื้อ *Bacillus* ช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาสูตรเชื้อได้นานยิ่งขึ้น โดยทำการคัดเลือกสารที่มีผลต่อการงอกและความแข็งแรงต่อเมล็ดข้าวน้อยที่สุดเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

จากการศึกษาอิทธิพลของสารในกลุ่ม preservative ต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 พบว่า เมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท ร้อยละ 1.0 จะมีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดข้าวมากที่สุด ซึ่งจะให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดต่ำที่สุดเพียง 0.69 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเพียงร้อยละ 9 ไม่พบต้นกล้าที่งอกปกติ และจำนวนเมล็ดตายมีสูงถึงร้อยละ 91 สารเคมีในกลุ่มนี้ที่มีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดน้อยที่สุด ได้แก่ โปแตสเซียมซอร์เบท ร้อยละ 0.1 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ด 9.11 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดร้อยละ 99 และจำนวนต้นกล้าที่งอกปกติร้อยละ 95 ส่วนจำนวนต้นกล้าที่งอกผิดปกติและเมล็ดตายมีเพียงร้อยละ 4 และร้อยละ 1 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม ที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทดสอบ ให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดเป็น 8.73 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดร้อยละ 96 จำนวนต้นกล้าที่งอกปกติร้อยละ 94 จำนวนต้นกล้าที่งอกผิดปกติร้อยละ 2 และเมล็ดตายร้อยละ 4 ซึ่งจะเห็นว่าชุดการทดลองที่ใช้โปแตสเซียมซอร์เบท ร้อยละ 0.1 จะมีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดข้าวน้อยเช่นเดียวกับชุดการทดลองควบคุม หรืออาจจะมีผลดีต่อการงอกของเมล็ดข้าวมากกว่าชุดการทดลองควบคุมอีกด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชุดการ

ตารางที่ 4 ผลของสารเคมีในกลุ่ม preservative ต่อการงอกและความแข็งแรงของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23

Preservative	ดัชนีการงอกของเมล็ด(GI)[v]	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด(%)[w]	กล้างอกปกติ (%)[x]	กล้างอกผิดปกติ (%)[y]	เมล็ดตาย (%)[z]
Lactic acid					
0.1 %	8.79[c]	98	96	2	2
0.5 %	8.73[c]	99	93	5	2
1.0 %	8.40[b]	97	92	5	3
Methyl hydroxy benzoate					
0.1 %	8.79[c]	97	94	3	3
0.5 %	8.18[b]	96	84	12	4
1.0 %	0.69[a]	9	0	9	91
Potassium sorbate					
0.1 %	9.11[c]	99	95	4	1
0.5 %	8.56[bc]	97	91	6	3
1.0%	8.36[b]	97	89	8	3
ชุดควบคุม	8.73[c]	96	94	2	4

[v] ตรวจนับเมล็ดที่มีการงอกตามปกติ เริ่มนับตั้งแต่เห็นส่วนรากงอกออกจากเมล็ด ตรวจนับทุกวันจนถึง 14 วันหลังเพาะ

[w] เริ่มนับตั้งแต่เห็นส่วนรากงอกออกจากเมล็ด ตรวจนับทุกวันจนถึง 14 วันหลังเพาะ

[x] ต้นกล้าที่มีส่วนประกอบครบถ้วน มีรากชั่วคราวที่แข็งแรงอย่างน้อยหนึ่งราก ยอดอ่อนสีเขียวสดแข็งแรง ส่วนยอดอ่อนมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของปลอกหุ้มยอด บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 5 วัน และ 14 วัน

[y] ต้นกล้าที่มีลักษณะอ่อนแอ หงิกงอ มีรอยไหม้หรือจุดแผล บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 5 วัน และ 14 วัน

[z] เมล็ดที่เน่าตาย ไม่มีการเจริญของต้นกล้า บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 14 วัน

หมายเหตุ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P=0.5

ทดลองที่ประกอบด้วยโปแตสเซียมซอร์เบท ร้อยละ 0.1 อาจจะมีคุณสมบัติในการช่วยให้เมล็ดข้าวงอกได้ดีขึ้น สำหรับชุดการทดลองที่ใช้กรดแลคติก หรือเมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ก็ให้ผลกระทบต่อเมล็ดข้าวน้อยกว่าชุดการทดลองควบคุม คือให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดเป็น 8.79 ทั้งสองชุดการทดลอง ค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดร้อยละ 98 และ 97 ต้นกล้าปกติร้อยละ 96 และ 94 และมีจำนวนเมล็ดตายเพียงร้อยละ 2 และ 3 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ดังนั้นในการศึกษาอิทธิพลของสารในกลุ่ม preservative ต่อการงอกของเมล็ดข้าว จึงเลือกชุดการทดลองที่จะนำไปศึกษาต่อได้ 3 ชุดการทดลอง คือ กรดแลคติก ร้อยละ 0.1 เมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท ร้อยละ 0.1 และ โปแตสเซียมซอร์เบท ร้อยละ 0.1 ซึ่งทั้ง 3 ชุดการทดลองจะมีผลต่อการงอกของเมล็ดข้าวที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองในชุดควบคุม

การศึกษาอิทธิพลของสารในกลุ่ม emulsifier ต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23 พบว่า tween 80 และ tween 20 ทั้ง 3 ความเข้มข้นมีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดข้าวน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม คือให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดอยู่ในช่วง 8.31-8.79 ค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดอยู่ระหว่างร้อยละ 96-98 และจำนวนต้นกล้าที่งอกปกติอยู่ในช่วงร้อยละ 81-97 ส่วนจำนวนต้นกล้าที่งอกผิดปกติและเมล็ดตายมีปริมาณต่ำ คืออยู่ในช่วงร้อยละ 1-8 และ ร้อยละ 2-4 ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองทุกความเข้มข้น พบว่ามีผลต่อการงอกของเมล็ดข้าวมาก คือให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดต่ำอยู่ในช่วง 4.84-6.96 และมีจำนวนเมล็ดตายสูงถึงร้อยละ 9-20 ชุดการทดลองที่คัดเลือกนำไปศึกษาต่อ คือ tween 80 ร้อยละ 0.1 เนื่องจากให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดสูงที่สุดเป็น 8.79 ค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และจำนวนต้นกล้าที่งอกปกติสูงที่สุดคือ ร้อยละ 98 และ 97 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ผลการศึกษาอิทธิพลของสารในกลุ่ม binder ต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23 สามารถเลือกชุดการทดลองที่จะนำไปศึกษาต่อ 2 ชุดการทดลอง คือ คาราจีแนน ร้อยละ 1.0 ซึ่งให้ผลในการงอกของเมล็ดดีที่สุด คือให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดเป็น 9.04 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และจำนวนต้นกล้าที่งอกปกติ ร้อยละ 99 และ ร้อยละ 97 ส่วนจำนวนต้นกล้าที่งอกผิดปกติและจำนวนเมล็ดตาย ต่ำเพียงร้อยละ 2 และร้อยละ 1 ตามลำดับ ส่วนอีกอีกชุดการทดลองที่จะนำมาศึกษาต่อ คือ คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส

ตารางที่ 5 ผลของสารเคมีในกลุ่ม emulsifier ต่อการงอกและความแข็งแรงของเมล็ดข้าว พันธุ์ กข 23

Emulsifier	ดัชนีการงอกของเมล็ด(GI)[y]	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด(%)[w]	กล้างอกปกติ (%)[x]	กล้างอกผิดปกติ (%)[y]	เมล็ดตาย (%)[z]
Soy bean oil					
0.1%	6.96[c]	91	49	42	9
0.2%	5.78[b]	87	29	58	13
0.4%	4.84[a]	80	18	62	20
Tween 80					
0.1%	8.79[e]	98	97	1	2
0.2%	8.45[de]	97	94	3	3
0.4%	8.47[de]	96	95	1	4
Tween 20					
0.1%	8.49[de]	96	91	5	4
0.2%	8.50[de]	97	92	5	3
0.4%	8.31[d]	96	81	8	4
ชุดควบคุม	8.73[de]	96	94	2	4

[y] ตรวจนับเมล็ดที่มีการงอกตามปกติ เริ่มนับตั้งแต่เห็นส่วนรากงอกออกจากเมล็ด ตรวจนับทุกวันจนถึง 14 วันหลังเพาะ

[w] เริ่มนับตั้งแต่เห็นส่วนรากงอกออกจากเมล็ด ตรวจนับทุกวันจนถึง 14 วันหลังเพาะ

[x] ต้นกล้าที่มีส่วนประกอบครบถ้วน มีรากชั่วคราวที่แข็งแรงอย่างน้อยหนึ่งราก ยอดอ่อนสีเขียวสดแข็งแรง ส่วนยอดอ่อนมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของปลอกหุ้มยอด บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 5 วัน และ 14 วัน

[y] ต้นกล้าที่มีลักษณะอ่อนแอ หงิกงอ มีรอยไหม้หรือจุดแผล บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 5 วัน และ 14 วัน

[z] เมล็ดที่เน่าตาย ไม่มีการเจริญของต้นกล้า บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 14 วัน

หมายเหตุ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P=0.5

ร้อยละ 1.0 ซึ่งให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดเป็น 8.51 แม้ค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเป็นร้อยละ 96 ซึ่งต่ำกว่าค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดของชุดการทดลองอัลจีเนต ร้อยละ 1.0 แต่ชุดการทดลองคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส ร้อยละ 1.0 ก็ยังให้ค่าจำนวนต้นกล้าที่งอกปกติสูงกว่าคือร้อยละ 93 นอกจากนี้ยังให้ค่าต้นกล้าที่งอกผิดปกติต่ำกว่า คือ ร้อยละ 3 ส่วนในชุดการทดลองอัลจีเนต ร้อยละ 1.0 จะให้ค่าจำนวนต้นกล้าที่งอกผิดปกติสูงถึงร้อยละ 6 (ตารางที่ 6)

ส่วนผลการศึกษาอิทธิพลของสารเคมีในกลุ่ม protectant ต่อการงอกของเมล็ดข้าว (ตารางที่ 7) พบว่า ชุดการทดลองทุกชุดมีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดข้าวน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม ดังนั้นจึงเลือกชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดเพื่อไปศึกษาต่อ 2 ชุดการทดลอง คือ กลีเซอรอล ร้อยละ 0.3 และ กลูตาเมต ร้อยละ 0.3

จากนั้นนำสารเคมีที่คัดเลือกได้ดังกล่าวข้างต้น คือ preservative ที่จะนำไปศึกษาต่อคือ กรดแลคติก เมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท และ โปแตสเซียมซอร์เบท ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 emulsifier ที่จะนำไปศึกษาต่อคือ tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 binder ที่จะนำไปศึกษาต่อคือ คาราจีแนน และ คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ protectant ที่จะนำไปศึกษาต่อคือ กลีเซอรอล และ กลูตาเมต ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยนำไปผสมเป็นสูตรได้ 12 สูตรดังตารางที่ 8

การศึกษาผลกระทบของสูตรต่าง ๆ ต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9 สามารถคัดสูตรที่มีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดข้าวมากที่สุด 3 สูตรทิ้งไป คือ สูตรที่ 4 8 และ 12 ซึ่งให้ค่าดัชนีการงอกต่ำสุดคือ 7.56 7.74 และ 7.96 ตามลำดับ ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และจำนวนต้นกล้าที่งอกปกติก็มีค่าต่ำกว่าสูตรอื่น ๆ เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนต้นกล้าที่งอกผิดปกติ และจำนวนเมล็ดตายมีค่าสูงกว่าสูตรอื่น ๆ คือในสูตรอื่นจะมีจำนวนต้นกล้าที่งอกผิดปกติอยู่ระหว่างร้อยละ 1-3 และจำนวนเมล็ดตายอยู่ระหว่างร้อยละ 1-5 ส่วนในสูตรที่ 4 8 และ 12 มีจำนวนต้นกล้าที่งอกผิดปกติอยู่ระหว่างร้อยละ 5-8 และจำนวนเมล็ดตายมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 7-13 เป็นที่น่าสังเกตว่าในสูตรที่ 4 8 และ 12 นั้นจะมีส่วนประกอบของกลูตาเมต และ คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสร่วมกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารเคมีทั้ง 2 ชนิดนี้

ตารางที่ 6 ผลของสารเคมีในกลุ่ม binder ต่อการงอกและความแข็งแรงของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23

Binder	ดัชนีการงอกของเมล็ด(GI)[v]	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด(%)[w]	กล้างอกปกติ (%)[x]	กล้างอกผิดปกติ (%)[y]	เมล็ดตาย (%)[z]
Carboxy methyl cellulose					
1.0 %	8.51[abc]	96	93	3	4
2.5 %	8.29[ab]	95	94	1	5
5.0 %	8.23[ab]	95	89	6	5
Alginate					
1.0 %	8.46[abc]	97	91	6	3
2.5 %	8.21[ab]	94	90	4	6
5.0 %	7.87[a]	91	85	6	9
Carrageenan					
1.0 %	9.04[c]	99	97	2	1
2.5 %	8.81[bc]	97	96	1	3
5.0%	8.83[bc]	98	93	5	2
ชุดควบคุม	8.73[bc]	96	94	2	4

[v] ตรวจนับเมล็ดที่มีการงอกตามปกติ เริ่มนับตั้งแต่เห็นส่วนรากงอกออกจากเมล็ด ตรวจนับทุกวันจนถึง 14 วันหลังเพาะ

[w] เริ่มนับตั้งแต่เห็นส่วนรากงอกออกจากเมล็ด ตรวจนับทุกวันจนถึง 14 วันหลังเพาะ

[x] ต้นกล้าที่มีส่วนประกอบครบถ้วน มีรากชั่วคราวที่แข็งแรงอย่างน้อยหนึ่งราก ยอดอ่อนสีเขียวสดแข็งแรง ส่วนยอดอ่อนมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของปลอกหุ้มยอด บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 5 วัน และ 14 วัน

[y] ต้นกล้าที่มีลักษณะอ่อนแอ หงิกงอ มีรอยไหม้หรือจุดแผล บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 5 วัน และ 14 วัน

[z] เมล็ดที่เน่าตาย ไม่มีการเจริญของต้นกล้า บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 14 วัน

หมายเหตุ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P=0.5

ตารางที่ 7 ผลของสารเคมีในกลุ่ม protectant ต่อการงอกและความแข็งแรงของเมล็ดข้าว พันธุ์ กข 23

Protectant	ดัชนีการงอกของเมล็ด(GI)[y]	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด(%)[w]	กล้างอกปกติ (%)[x]	กล้างอกผิดปกติ (%)[y]	เมล็ดตาย (%)[z]
Glycerol					
0.3 %	9.11[b]	98	94	4	2
0.6 %	8.94[b]	97	95	2	3
1.2 %	8.58[ab]	96	94	2	4
Glutamate					
0.3 %	8.71[b]	97	91	6	3
0.6 %	8.71[b]	95	90	5	5
1.2%	8.33[a]	95	92	3	5
ชุดควบคุม	8.73[b]	96	94	2	4

[y] ตรวจนับเมล็ดที่มีการงอกตามปกติ เริ่มนับตั้งแต่เห็นส่วนรากงอกออกจากเมล็ด ตรวจนับทุกวันจนถึง 14 วันหลังเพาะ

[w] เริ่มนับตั้งแต่เห็นส่วนรากงอกออกจากเมล็ด ตรวจนับทุกวันจนถึง 14 วันหลังเพาะ

[x] ต้นกล้าที่มีส่วนประกอบครบถ้วน มีรากชั่วคราวที่แข็งแรงอย่างน้อยหนึ่งราก ยอดอ่อนสีเขียวสดแข็งแรง ส่วนยอดอ่อนมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของปลอกหุ้มยอด บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 5 วัน และ 14 วัน

[y] ต้นกล้าที่มีลักษณะอ่อนแอ หงิกงอ มีรอยไหม้หรือจุดแผล บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 5 วัน และ 14 วัน

[z] เมล็ดที่เน่าตาย ไม่มีการเจริญของต้นกล้า บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 14 วัน

หมายเหตุ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P=0.5

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบของสูตรต่าง ๆ

สูตรที่	Preservative (0.1%)	Emulsifier (0.1%)	Binder (1.0%)	protectant (0.3%)
1	โปแตสเซียมซอร์เบท	Tween 80	คาราจีแนน	กลีเซอรอล
2	โปแตสเซียมซอร์เบท	Tween 80	คาราจีแนน	กลูตาเมต
3	โปแตสเซียมซอร์เบท	Tween 80	คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	กลีเซอรอล
4	โปแตสเซียมซอร์เบท	Tween 80	คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	กลูตาเมต
5	กรดแลคติก	Tween 80	คาราจีแนน	กลีเซอรอล
6	กรดแลคติก	Tween 80	คาราจีแนน	กลูตาเมต
7	กรดแลคติก	Tween 80	คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	กลีเซอรอล
8	กรดแลคติก	Tween 80	คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	กลูตาเมต
9	เมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท	Tween 80	คาราจีแนน	กลีเซอรอล
10	เมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท	Tween 80	คาราจีแนน	กลูตาเมต
11	เมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท	Tween 80	คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	กลีเซอรอล
12	เมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท	Tween 80	คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	กลูตาเมต

ตารางที่ 9 ผลของสูตรต่าง ๆ ต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23

สูตรที่ [u]	ดัชนีการงอกของเมล็ด(GI) [v]	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด(%) [w]	กล้างอกปกติ (%) [x]	กล้างอกผิดปกติ (%) [y]	เมล็ดตาย (%) [z]
1	9.01[c]	96	95	1	4
2	8.72[bc]	96	94	2	4
3	8.21[b]	94	93	1	6
4	7.56[a]	89	81	8	11
5	8.45[b]	98	95	3	2
6	8.73[bc]	98	96	2	2
7	8.25[b]	99	94	3	3
8	7.74[a]	87	82	5	13
9	8.27[b]	97	96	3	1
10	8.23[b]	95	91	3	5
11	8.29[b]	98	95	3	2
12	7.96[a]	93	87	6	7
ชุดการทดลองควบคุม	8.35[b]	96	94	2	4

[u] สูตรต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบตามตารางที่ 8 ซึ่งไม่มีเชื้อ *Bacillus* spp.

[v] ตรวจนับเมล็ดที่มีการงอกตามปกติ เริ่มนับตั้งแต่เห็นส่วนรากงอกออกจากเมล็ด ตรวจนับทุกวันจนถึง 14 วันหลังเพาะ

[w] เริ่มนับตั้งแต่เห็นส่วนรากงอกออกจากเมล็ด ตรวจนับทุกวันจนถึง 14 วันหลังเพาะ

[x] ต้นกล้าที่มีส่วนประกอบครบถ้วน มีรากขั้วคราวที่แข็งแรงอย่างน้อยหนึ่งราก ยอดอ่อนสีเขียวสดแข็งแรง ส่วนยอดอ่อนมีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของปลอกหุ้มยอด บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 5 วัน และ 14 วัน

[y] ต้นกล้าที่มีลักษณะอ่อนแอ หงิกงอ มีรอยไหม้หรือจุดแผล บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 5 วัน และ 14 วัน

[z] เมล็ดที่เน่าตาย ไม่มีการเจริญของต้นกล้า บันทึกผลหลังเพาะเมล็ด 14 วัน

หมายเหตุ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P=0.5

จะมีผลร่วมกันในการยับยั้งการงอกของเมล็ดได้ ส่วนสูตรที่เหลือ 9 สูตร (ตารางที่ 10) ซึ่งเป็นสูตรที่มีผลต่อการงอกของเมล็ด และผลต่อการเจริญของต้นกล้าข้าวไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองควบคุม เพื่อที่จะนำมาทดสอบและคัดเลือกสูตรที่มีผลต่อต้นข้าวน้อยที่สุด ซึ่งจะนำไปทดสอบกับต้นข้าวพันธุ์ กข 23 ต่อไป

4. ผลของสูตรที่จะใช้ผลิตสูตรเชื้อต่อต้นข้าวพันธุ์ กข 23

การทดสอบสูตรที่มีองค์ประกอบต่างๆ ตามตารางที่ 10 กับต้นข้าวพันธุ์ กข 23 ที่มีอายุ 15 30 และ 45 วัน โดยวิธีฉีดพ่นด้วย foggy เป็นเวลา 30 วินาที ให้เปียกทั่วทั้งต้น ทำการบันทึกการเกิด phytotoxic ต่อใบและต้นข้าวหลังทำการฉีดพ่นสูตรนาน 14 วัน ด้วยคะแนนมาตรฐานของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRTP, 1980) พบว่ามีสูตรเชื้อ 4 สูตร ที่มีผลต่อการเกิด phytotoxic ต่อต้นข้าวน้อยที่สุด ได้แก่ สูตรที่ 1 5 7 และ 9 (ตารางที่ 11) ซึ่งให้ขนาดของแผลอยู่ในระดับคะแนน 1 มีขนาดของแผลร้อยละ 0-3 โดยสูตรที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย โปแตสเซียมซอร์เบท ร้อยละ 0.1 tween 80 ร้อยละ 0.1 คาราจีแนน ร้อยละ 1.0 และ กลีเซอรอล ร้อยละ 0.3 ให้ขนาดแผลของต้นข้าวน้อยที่สุด คือ ขนาดแผลร้อยละ 0.34 0.92 และ 0.08 ในต้นข้าวที่มีอายุ 15 30 และ 45 วัน ตามลำดับ ส่วนในสูตรที่มีผลกระทบต่อต้นข้าวมากที่สุด คือ สูตรที่ 3 4 และ 8 ซึ่งให้ขนาดแผลอยู่ในระดับคะแนน 4 มีขนาดแผลอยู่ที่ ร้อยละ 13.48-24.69 ดังนั้นสูตรที่จะนำไปศึกษาต่อคือสูตรที่ 1 5 7 และ 9 ที่มีส่วนประกอบดังตารางที่ 12

ในการทดลองต่อไปจะมีการเติมเชื้อ *Bacillus* spp. ลงไปในสูตรทั้ง 4 แล้วนำไปศึกษาอายุการเก็บรักษา และนำสูตรเชื้อที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทั้งโรคที่ติดมาจากเมล็ดและโรคที่เกิดกับต้นข้าว (โรคใบไหม้และกาบใบแห้ง)

5. การผลิตและการเก็บรักษาสูตรเชื้อ

การเตรียมสูตรเชื้อและผลการเก็บรักษาสูตรเชื้อ (สูตรน้ำ) เริ่มต้นโดยการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ในอาหารเหลว Mckeen บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 10 ส่วนประกอบของสูตรต่างๆ ที่จะใช้ทดสอบกับต้นข้าว

สูตรที่	preservative (0.1%)	Emulsifier (0.1%)	Binder (1.0%)	protectant (0.3%)
1	โปแตสเซียมซอร์เบท	Tween 80	คาราจีแนน	กลีเซอรอล
2	โปแตสเซียมซอร์เบท	Tween 80	คาราจีแนน	กลูตาเมต
3	เมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท	Tween 80	คาราจีแนน	กลีเซอรอล
4	เมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท	Tween 80	คาราจีแนน	กลูตาเมต
5	กรดแลคติก	Tween 80	คาราจีแนน	กลีเซอรอล
6	กรดแลคติก	Tween 80	คาราจีแนน	กลูตาเมต
7	โปแตสเซียมซอร์เบท	Tween 80	คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	กลีเซอรอล
8	เมธิลไฮดรอกซีเบนโซเอท	Tween 80	คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	กลีเซอรอล
9	กรดแลคติก	Tween 80	คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	กลีเซอรอล

ตารางที่ 11 ผลของสูตรที่จะใช้ผลิตสูตรเชื้อต่อต้นข้าวพันธุ์ กข 23

สูตรที่ [a]	ขนาดแผล (%)[b]		
ต้นข้าวอายุ	15 วัน	30 วัน	45 วัน
1	0.34[c](1)[d]	0.92 (1)	0.08 (1)
2	5.62 (2)	5.46 (2)	4.12 (2)
3	19.25 (4)	13.48 (4)	16.64 (4)
4	20.40 (4)	18.52 (4)	14.21 (4)
5	0.48 (1)	0.68 (1)	0.12 (1)
6	5.82 (2)	5.36 (2)	5.11 (2)
7	1.34 (1)	1.06 (1)	1.12 (1)
8	24.69 (4)	23.41 (4)	24.32 (4)
9	0.94 (1)	1.21 (1)	0.68 (1)
ชุดการทดลองควบคุม	0.00 (1)	0.00 (1)	0.00 (1)

[a] สูตรต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบตามตารางที่ 10 ซึ่งไม่มีเชื้อ *Bacillus* spp.

[b] ขนาดแผลทำการบันทึกหลังฉีดพ่นสูตร 14 วัน

[c] ขนาดบาดแผลคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

[d] ระดับคะแนนตามสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ(International Rice Testing Program) ดังนี้

ระดับคะแนน 1 มีขนาดแผล 0-3 %
ระดับคะแนน 2 มีขนาดแผล 4-6 %
ระดับคะแนน 3 มีขนาดแผล 7-12 %
ระดับคะแนน 4 มีขนาดแผล 13-25 %
ระดับคะแนน 5 มีขนาดแผล 26-50 %
ระดับคะแนน 6 มีขนาดแผล 51-75 %
ระดับคะแนน 7 มีขนาดแผล 76-87 %
ระดับคะแนน 8 มีขนาดแผล 88-94 %
ระดับคะแนน 9 มีขนาดแผล 95-100 %

ตารางที่ 12 ส่วนประกอบของสูตรต่างๆ ที่จะใช้เตรียมสูตรเชื้อ *Bacillus* spp.

สูตรที่	preservative (0.1 %)	Emulsifier (0.1 %)	Binder (1.0 %)	protectant (0.3 %)
1	โปแตสเซียมซอร์เบท	Tween 80	คาราจีแนน	กลีเซอรอล
5	กรดแลคติก	Tween 80	คาราจีแนน	กลีเซอรอล
7	โปแตสเซียมซอร์เบท	Tween 80	คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	กลีเซอรอล
9	กรดแลคติก	Tween 80	คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	กลีเซอรอล

จนอายุได้ 48 ชั่วโมง นำไปเหวี่ยงแยกเชื้อด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำเซลล์ที่ได้ล้างด้วยสารละลายเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ ทำการเตรียมสูตรโดยทำการละลายสารเคมีที่ใช้ในแต่ละสูตรให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากทิ้งไว้ให้เย็นเติมสารแขวนลอยเชื้อที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากันจะได้สูตรเชื้อที่มีปริมาณเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ประมาณ 10^{12} CFU ต่อมิลลิลิตร

ผลการเก็บรักษาสูตรเชื้อที่อุณหภูมิห้อง พบว่าในช่วง 30 วันแรกของการเก็บรักษาปริมาณเชื้อลดลง 2-3 log cycle (ตารางที่ 13 และ 14) เนื่องจากเซลล์เหล่านี้ตายไป และเมื่อได้ทำการทดลองฆ่าตัวเซลล์โดยให้ความร้อนแก่เชื้อเริ่มต้นที่นำไปผลิตสูตรเชื้อที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที พบว่าปริมาณเชื้อลดลงถึง 3 log cycle โดยเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ลดลงจาก 7.60×10^{10} เหลือ 3.10×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ปริมาณเชื้อลดลงจาก 9.25×10^{10} เหลือ 4.30×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร จึงพอสรุปได้ว่าปริมาณเชื้อที่ลดลงในช่วง 30 วันแรกของการเก็บรักษา คือตัวเซลล์ที่เหลืออยู่จากการเลี้ยงเชื้อ

สำหรับการเก็บรักษาสูตรเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 12 เดือนมีปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 เดือน พบว่า สูตรเชื้อ *Bacillus* ทุกสูตร มีปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร โดยที่ลักษณะของสูตรน้ำที่มีส่วนผสมของคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสที่เก็บรักษายังคงมีลักษณะที่เหมือนเดิม ส่วนในสูตรที่มีส่วนผสมของคาราจีแนน พบว่าจะมีลักษณะจับตัวกันและมีลักษณะแข็งขึ้นเล็กน้อย ทำให้การนำมาเจือจางใหม่เพื่อทำการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อค่อนข้างลำบากขึ้น สำหรับนลินี จาริกภากร และคณะ (2537) ทำการเก็บรักษาเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ NSRS 89-26 ในรูปผงแห้งโดยใช้ผงทัลคัม และหินฝุ่นโดโลไมท์ สามารถเก็บรักษาสูตรเชื้อได้นานกว่า 12 เดือน นอกจากนี้ ปริญญา จันศรี และคณะ(2533) ได้พัฒนาเชื้อ *B. subtilis* CH4 เป็นผงชีวภัณฑ์ ที่สามารถเก็บได้นานถึง 6 เดือนที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 13 ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาสูตรเชื้อต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ที่อยู่ในสูตรเชื้อต่าง ๆ

ระยะเวลาในการเก็บ	จำนวนเซลล์รอดชีวิต (CFU/ml) ในแต่ละสูตรเชื้อ[x]			
(วัน)	1	5	7	9
0	$1.58x10^{12}$	$1.62x10^{12}$	$2.37x10^{12}$	$1.05x10^{12}$
15	$1.78x10^{11}$	$1.40x10^{11}$	$1.66x10^{11}$	$1.64x10^{11}$
30	$1.16x10^{10}$	$1.27x10^{10}$	$1.01x10^{10}$	$8.46x10^{9}$
60	$5.69x10^{9}$	$3.80x10^{9}$	$3.47x10^{9}$	$2.80x10^{9}$
90	$1.68x10^{9}$	$9.53x10^{8}$	$9.82x10^{8}$	$1.44x10^{9}$
180	$7.32x10^{8}$	$6.59x10^{8}$	$8.78x10^{8}$	$6.32x10^{8}$
270	$8.27x10^{8}$	$6.60x10^{8}$	$8.00x10^{8}$	$7.23x10^{8}$
360	$7.53x10^{7}$	$9.03x10^{7}$	$6.77x10^{7}$	$7.40x10^{7}$

[x] สูตรต่างๆ ที่ใช้ทดสอบตามตารางที่ 12

ตารางที่ 14 ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาสูตรเชื้อต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ที่อยู่ในสูตรเชื้อต่าง ๆ

ระยะเวลาในการเก็บ	จำนวนเซลล์รอดชีวิต (CFU/ml) ในแต่ละสูตรเชื้อ[x]			
(วัน)	1	5	7	9
0	$1.56x10^{12}$	$1.28x10^{12}$	$1.62x10^{12}$	$1.55x10^{12}$
15	$5.80x10^{11}$	$5.40x10^{11}$	$5.90x10^{11}$	$6.80x10^{11}$
30	$1.08x10^{10}$	$9.47x10^{9}$	$8.50x10^{9}$	$9.43x10^{9}$
60	$6.42x10^{9}$	$4.30x10^{9}$	$4.12x10^{9}$	$3.56x10^{9}$
90	$8.76x10^{8}$	$9.40x10^{8}$	$6.43x10^{8}$	$7.54x10^{8}$
180	$6.53x10^{8}$	$6.93x10^{8}$	$7.68x10^{8}$	$6.44x10^{8}$
270	$7.30x10^{8}$	$6.17x10^{8}$	$7.57x10^{8}$	$5.20x10^{8}$
360	$8.87x10^{7}$	$6.83x10^{7}$	$5.87x10^{7}$	$6.05x10^{7}$

[x] สูตรต่างๆ ที่ใช้ทดสอบตามตารางที่ 12

6. ประสิทธิภาพของสูตรเชื้อ *Bacillus* spp. ต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23

จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่าทุกชุดการทดลองจะให้ค่าดัชนีการงอกของเมล็ดที่แตกต่างกันทางสถิติเพียงเล็กน้อยคืออยู่ในช่วง 8.29-8.98 ชุดการทดลองที่ 10 ซึ่งเป็นชุดการทดลองเมล็ดข้าวปกติซึ่งไม่มีการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด และไม่มีการคลุกเมล็ดด้วยสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและจำนวนต้นกล้าปกติต่ำกว่าทุกชุดการทดลอง คือร้อยละ 91 และ 84 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองอื่นๆ มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดอยู่ในช่วง ร้อยละ 95-98 และมีจำนวนต้นกล้าปกติอยู่ในช่วงร้อยละ 92-96 ในทางกลับกันจะพบว่า ในชุดการทดลองที่ 10 จะมีจำนวนต้นกล้าผิดปกติและเมล็ดตายสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ คือร้อยละ 7 และร้อยละ 9 ส่วนในชุดการทดลองอื่นจะมีจำนวนต้นกล้าผิดปกติและเมล็ดตายอยู่ในช่วง ร้อยละ 1-4 และร้อยละ 2-5 ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

จำนวนต้นกล้าผิดปกติและเมล็ดตายนั้นขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของเมล็ด หรือเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช ในชุดการทดลองที่ 9 ซึ่งมีการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดก่อนทำการทดลอง ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าต้นกล้าที่ผิดปกติและเมล็ดที่ตายจากการทดลองนี้ น่าจะเกิดมาจากเมล็ดข้าวดังกล่าวสูญเสียความสมบูรณ์ของเมล็ด ส่วนในชุดการทดลองที่ 10 ซึ่งเป็นเมล็ดข้าวปกติซึ่งไม่มีการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด และไม่มีการคลุกเมล็ดด้วยสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ดังนั้นต้นกล้าที่ผิดปกติและเมล็ดที่ตายจากชุดการทดลองนี้ น่าจะเกิดมาจากเมล็ดข้าวดังกล่าวสูญเสียความสมบูรณ์ของเมล็ด และเกิดจากการทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชร่วมกัน ส่วนในชุดการทดลองที่ 1-8 นั้นมีการคลุกเมล็ดด้วยสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 ซึ่งจะเห็นว่ามีจำนวนต้นกล้าที่ผิดปกติและเมล็ดที่ตายต่ำกว่าในชุดการทดลองที่ 10 ถึงสองเท่าหรือมากกว่า ดังนั้นต้นกล้าที่ผิดปกติและเมล็ดที่ตายจากชุดการทดลองนี้ น่าจะเกิดมาจากเมล็ดข้าวดังกล่าวขาดความสมบูรณ์ของเมล็ด และพอสรุปได้ว่าสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถที่จะควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับเมล็ดข้าวได้ในระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองต่อไปในสภาพธรรมชาติ เช่นเดียวกับการทดลองของนลินี จาริภากร และคณะ (2535) ซึ่งได้ทดลองคลุกเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 1 ที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดด้วยเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *B. subtilis* NSRS 89-26 พบว่าจะมี

ตารางที่ 15 ผลของสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23

ชุดการทดลองที่ [A]	ดัชนีการงอกของเมล็ด(GI)	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด(%)	กล้างอกปกติ (%)	กล้างอกผิดปกติ (%)	เมล็ดตาย (%)
1	8.76[b]	98	94	4	2
2	8.45[ab]	96	92	4	4
3	8.73[b]	97	96	1	3
4	8.29[a]	97	95	2	3
5	8.34[a]	95	93	2	5
6	8.63[ab]	96	94	2	4
7	8.91[b]	98	96	2	2
8	8.98[b]	98	95	3	2
9	8.84[b]	95	94	3	4
10	8.36[a]	91	84	7	9

[A] = ชุดการทดลองต่างๆ คือ

1 = *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 1

2 = *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 5

3 = *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 7

4 = *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 9

5 = *Bacillus* sp. LN 007 สูตรที่ 1

6 = *Bacillus* sp. LN 007 สูตรที่ 5

7 = *Bacillus* sp. LN 007 สูตรที่ 7

8 = *Bacillus* sp. LN 007 สูตรที่ 9

9 = ชุดการทดลองควบคุม (เมล็ดฆ่าเชื้อที่ผิว)

10 = ชุดการทดลองควบคุม (เมล็ดปกติ)

หมายเหตุ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวหมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P=0.5

ค่าดัชนีการงอกของเมล็ด 9.57 และ 10.81 และมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดร้อยละ 99 และ 95 ตามลำดับส่วนเมล็ดปกติที่ไม่ได้คลุกเชื้อ *Bacillus* จะมีดัชนีการงอกของเมล็ด 9.44 และเมื่อนำมาตรวจเมล็ดเป็นโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าเมล็ดที่คลุกเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *B. subtilis* NSRS 89-26 จะพบเมล็ดเป็นโรคร้อยละ 0 และ ร้อยละ 2 ตามลำดับ ส่วนเมล็ดปกติจะพบโรคถึง ร้อยละ 100

7. ประสิทธิภาพของสูตรเชื้อ *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งการเกิดโรคของข้าว

7.1 ผลทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ (*P. oryzae*)

หลังจากการฉีดพ่นสูตรเชื้อ 7 วัน พบว่า ในใบที่ 2 ของต้นข้าว (นับจากใบบนสุด) ของชุดการทดลองที่ใช้สารกำจัดเชื้อรา (Beam) จะยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด มีขนาดแผลที่ค่อนข้างเล็ก คือ 0.12 ตารางเซนติเมตรต่อใบ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองอื่น ส่วนในชุดการทดลองสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ทุกชุดการทดลองสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* ได้ดีกว่า สูตรเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ทุกสูตร ชุดการทดลองควบคุม(น้ำกลั่น) และชุดการทดลองควบคุม(สูตรที่ 7) แต่เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าส่วนมากไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ชุดการทดลองสูตรเชื้อ *Bacillus* spp. ที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ได้ดีรองจากชุดการทดลองสารกำจัดเชื้อรา คือชุดการทดลองสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 1 และ สูตรที่ 9 ซึ่งจะให้ขนาดบาดแผลค่อนข้างเล็ก คือ 0.89 ตารางเซนติเมตรต่อใบ และ 0.90 ตารางเซนติเมตรต่อใบ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม(น้ำกลั่น) และชุดการทดลองควบคุม(สูตรที่ 7) ซึ่งจะให้ขนาดแผล 1.08 ตารางเซนติเมตรต่อใบ และ 1.13 ตารางเซนติเมตรต่อใบตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่มีผลในการยับยั้งน้อยที่สุด คือ *Bacillus* sp. LN 007 สูตรที่ 5 ซึ่งให้ขนาดแผล 1.24 ตารางเซนติเมตรต่อใบ ซึ่งจะให้ค่าทางสถิติที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 16)

ส่วนในใบที่ 3 ก็ให้ผลที่ใกล้เคียงกับในใบที่ 2 ชุดการทดลองสารกำจัดเชื้อรายังคงยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด คือให้ขนาดแผล 0.04 ตารางเซนติเมตรต่อใบ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลอง *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 1 และสูตรที่ 5 ซึ่งให้ขนาดแผล 0.16 ตารางเซนติเมตรต่อใบ และ 0.18 ตารางเซนติเมตรต่อใบ ส่วนชุดการ

ทดลองที่ให้ผลในการยับยั้งโรคใบไหม้ได้น้อยที่สุด คือชุดการทดลองควบคุม(น้ำกลั่น) ซึ่งให้ขนาดแผล 0.74 ตารางเซนติเมตรต่อใบ แต่จะให้ค่าที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลอง *Bacillus* sp. LN 007 สูตรที่ 1 และสูตรที่ 7 และ ชุดการทดลองควบคุม(สูตรที่ 7)

หลังจากฉีดพ่น 14 วัน ในใบที่ 2 ของต้นข้าว ชุดการทดลองสารกำจัดเชื้อราและชุดการทดลอง *Bacillus* sp. LN 007 สูตรที่ 9 จะยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด ให้ขนาดแผล 0.17 ตารางเซนติเมตรต่อใบ และ 0.18 ตารางเซนติเมตรต่อใบ แต่จะไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลอง *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 1 สูตรที่ 5 และสูตรที่ 7 ชุดการทดลอง *Bacillus* sp. LN 007 สูตรที่ 1 และสูตรที่ 7 และชุดการทดลองควบคุม(สูตรที่ 7) ซึ่งให้ขนาดแผล 0.21 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 0.26 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 0.26 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 0.26 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 0.27 ตารางเซนติเมตรต่อใบ และ 0.26 ตารางเซนติเมตรต่อใบ ตามลำดับ

ส่วนในใบที่ 3 ชุดการทดลองสารกำจัดเชื้อรายังคงเป็นชุดการทดลองที่ยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด คือให้ขนาดแผล 0.25 ตารางเซนติเมตรต่อใบ และให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลอง รองลงมา คือชุดการทดลอง *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 1 สูตรที่ 5 และสูตรที่ 7 ซึ่งให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลองอื่นเช่นกัน โดยมีขนาดแผล 0.90 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 1.04 ตารางเซนติเมตรต่อใบ และ 1.16 ตารางเซนติเมตรต่อใบ ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ให้ผลในการยับยั้งโรคใบไหม้ได้น้อยที่สุด คือชุดการทดลองควบคุม(สูตรที่ 7) ให้ขนาดแผลเป็น 2.58 ตารางเซนติเมตรต่อใบแต่จะให้ค่าที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลอง *Bacillus* sp. LN 007 ทั้ง 4 สูตร และ ชุดการทดลองควบคุม(น้ำกลั่น) (ตารางที่ 16)

หลังจากฉีดพ่น 21 วัน พบว่าในใบที่ 2 ของต้นข้าว ชุดการทดลองสารกำจัดเชื้อราและชุดการทดลอง *Bacillus* sp. LN 007 สูตรที่ 1 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด ให้ขนาดแผล 0.03 ตารางเซนติเมตรต่อใบ และ 0.05 ตารางเซนติเมตรต่อใบ แต่จะไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลอง *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 5 และสูตรที่ 7 และชุดการทดลอง *Bacillus* sp. LN 007 สูตรที่ 9 ซึ่งให้ขนาดแผล 0.12 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 0.13 ตารางเซนติเมตรต่อใบ และ 0.12 ตารางเซนติเมตรต่อใบ ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคใบไหม้ได้น้อยที่สุด คือชุดการทดลอง *Bacillus* sp. LN

ตารางที่ 16 ผลของสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ต่อต้นข้าวพันธุ์ กข 23 ที่ปลูกเชื้อ *P. grisea* หลังฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งแรก 7 14 และ 21 วัน

สูตรที่	พื้นที่แผล (ซม^2) ต่อใบ[x]					
	7 วัน		14 วัน		21 วัน	
	ใบที่ 2	ใบที่ 3	ใบที่ 2	ใบที่ 3	ใบที่ 2	ใบที่ 3
1 + *B. subtilis* NSRS 89-24	0.89^{b}	0.16^{ab}	0.21^{bc}	0.90^{c}	0.05^{a}	0.84^{a}
5 + *B. subtilis* NSRS 89-24	0.95^{bc}	0.18^{ab}	0.26^{abc}	1.04^{c}	0.12^{ab}	1.02^{a}
7 + *B. subtilis* NSRS 89-24	0.94^{bc}	0.44^{c}	0.26^{abc}	1.16^{c}	0.13^{ab}	0.95^{a}
9 + *B. subtilis* NSRS 89-24	0.90^{b}	0.24^{b}	0.32^{a}	1.41^{b}	0.21^{bcd}	1.02^{a}
1 + *Bacillus* sp. LN007	0.96^{bc}	0.67^{de}	0.26^{abc}	1.98^{ab}	0.22^{bcd}	1.64^{b}
5 + *Bacillus* sp. LN007	1.24^{d}	0.56^{cd}	0.31^{ab}	2.17^{ab}	0.30^{cd}	1.68^{b}
7 + *Bacillus* sp. LN007	1.08^{bcd}	0.66^{de}	0.27^{abc}	2.44^{ab}	0.32^{d}	1.52^{b}
9 + *Bacillus* sp. LN007	1.10^{cd}	0.58^{cd}	0.18^{c}	2.13^{ab}	0.12^{ab}	1.48^{b}
7[Y]	1.13^{cd}	0.62^{de}	0.26^{abc}	2.58^{a}	0.18^{bc}	1.59^{b}
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1.08^{bcd}	0.74^{e}	0.29^{ab}	2.39^{ab}	0.21^{bcd}	1.64^{b}
สารกำจัดเชื้อรา (Beam)[z]	0.12^{a}	0.04^{a}	0.17^{c}	0.25^{d}	0.03^{a}	0.68^{a}

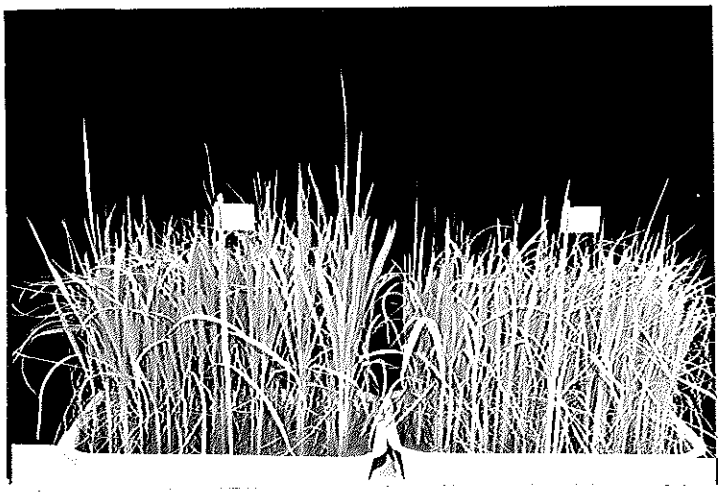
[x] บันทึกการเกิดโรคหลังหลังทำการทดลอง 7 14 และ 21 วัน ตามมาตรฐานการเกิดโรคใบไหม้

[Y] ชุดการทดลองควบคุมที่ใช้สูตรที่ 7 โดยไม่มีเชื้อ *Bacillus* spp.

[z] ชื่อสามัญ Kasugamycin

หมายเหตุ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์หมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P=0.05



ชุดการทดลองควบคุมยากำจัดเชื้อรา (ซ้าย) และชุดการทดลองควบคุมไม่ฉีดสูตรเชื้อ *Bacillus* spp. (ขวา)

ชุดการทดลองสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 1 (ซ้าย)
และชุดการทดลองควบคุมไม่ฉีดสูตรเชื้อ *Bacillus* spp. (ขวา)

รูปที่ 14 การเกิดโรคใบไหม้ในต้นข้าวพันธุ์ กข 23 หลังฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งแรก 21 วัน

007 สูตรที่ 7 ซึ่งให้ขนาดบาดแผลมากกว่าในชุดการทดลองควบคุม แต่เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติแล้วไม่มีความแตกต่าง (ตารางที่ 16)

ส่วนในใบที่ 3 พบว่าชุดการทดลองสารกำจัดเชื้อรา และชุดการทดลอง *B. subtilis* NSRS 89-24 ทุกสูตรเป็นชุดการทดลองที่ยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ได้ดี โดยให้ขนาดแผล 0.68 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 0.84 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 1.02 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 0.95 ตารางเซนติเมตรต่อใบ และ 1.02 ตารางเซนติเมตรต่อใบ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติแต่จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลอง *Bacillus* sp. LN 007 ทุกสูตร ชุดการทดลองควบคุม (สูตรที่ 7) และชุดการทดลองควบคุม (น้ำกลั่น) ซึ่งให้ขนาดแผล 1.64 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 1.68 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 1.52 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 1.48 ตารางเซนติเมตรต่อใบ 1.59 ตารางเซนติเมตรต่อใบ และ 1.64 ตารางเซนติเมตรต่อใบ ตามลำดับ (ตารางที่ 16) ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่าชุดการทดลองสารกำจัดเชื้อรามีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคใบไหม้ได้ดีที่สุด ส่วนสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าสูตรเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ส่วนในสูตรแต่ละสูตรพบว่าสูตรเชื้อสูตรที่ 1 ค่อนข้างให้ผลที่ดีกว่าสูตรอื่นๆ (รูปที่ 14) แต่ความเป็นไปได้ในการนำไปใช้คงเป็นไปได้ยาก เนื่องจากสูตรที่ 1 จะมีต้นทุนในการผลิตที่สูงเนื่องจากคาราจีแนนมีราคาแพง คือ 181.29 บาทต่อมิลลิลิตร ส่วนในสูตรที่ 7 จะมีราคาถูกกว่ามาก คือ 25.52 บาท (ตารางภาคผนวกที่ 3) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ในสูตรที่ 1 ถึงแม้จะดีกว่าสูตรที่ 7 แต่เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันสำหรับการทดลองของนลินี จาริกภากร และคณะ (2537) พบว่าการใช้ผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* คลุกลงในดินก่อนการปลูกข้าวไร่ สามารถควบคุมการเกิดโรคไหม้ของข้าวในระยะต้นอ่อนได้ดีในช่วงระยะ 7-14 วัน ส่วนวิธีการฉีดพ่นจะได้ผลปานกลาง และพบแผลบนใบข้าวน้อยกว่าแปลงที่ไม่ได้ใช้ผงเชื้อแบคทีเรีย

7.2 **ผลทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคกาบใบแห้ง** (*R. solani*)

หลังการทดลอง 7 วัน พบว่าขนาดความยาวของแผลที่เกิดจากโรคกาบใบแห้ง จะมีขนาดที่ใกล้เคียงกันมากทุดชุดการทดลอง ยกเว้นในชุดการทดลองที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา *R. solani* จะไม่เกิดบาดแผลที่เกิดจากโรคกาบใบแห้ง ส่วนในชุดการทดลองอื่นจะมีขนาดบาดแผลอยู่ในช่วง 7.42-9.04 เซนติเมตรต่อหน่อ หลังจากนั้น 14 วันหลังการทดลองจะ

เริ่มเห็นความแตกต่างของขนาดบาดแผลในแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งพบว่าขนาดบาดแผลชุดการทดลองสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 1 ให้ผลในการควบคุมโรคที่ดีที่สุด มีขนาดบาดแผลเล็กกว่าชุดการทดลองอื่นๆ คือมีความยาวของแผล 5.64 เซนติเมตรต่อหน่อ ชุดการทดลองสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 7 5 และ 9 จะให้ผลการทดลองที่ดีรองลงมาคือมีขนาดบาดแผล 6.64 6.88 และ 6.98 เซนติเมตรต่อหน่อ ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลองสูตรเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 พบว่ายังคงให้ผลดีกว่าในชุดการทดลองควบคุม คือมีขนาดความยาวของแผล 7.44 7.41 8.01 และ 6.98 เซนติเมตรต่อหน่อ ในสูตรที่ 1 5 7 และ 9 ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลองควบคุมนั้นให้ขนาดความยาวของแผลมากที่สุด คือ 8.40 เซนติเมตร (ตารางที่ 17)

หลังการทดลอง 21 วัน พบว่าผลการทดลองที่ได้เป็นไปในทางเดียวกัน คือชุดการทดลองสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ทุกสูตรยังคงให้ผลการทดลองที่ดีกว่าชุดการทดลองสูตรเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 และชุดการทดลองควบคุม โดยที่ชุดการทดลองสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 7 ให้ขนาดแผลที่เล็กที่สุด คือ 4.31 เซนติเมตรต่อหน่อ ส่วนในชุดการทดลองควบคุมจะให้ขนาดแผลที่ใหญ่ที่สุด คือ มีความยาว 6.08 เซนติเมตรต่อหน่อ ส่วนผลการทดลองหลังทำการทดลอง 28 วัน (รูปที่ 15) นั้นก็ยังคงให้ผลการทดลองที่ไปในทำนองเดียวกันคือในชุดการทดลองสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 1 จะให้ผลในการทดลองดีที่สุด คือมีขนาดบาดแผล 1.06 เซนติเมตรต่อหน่อ รองลงมาคือสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 5 7 และ 9 ให้ขนาดแผล 1.60 1.89 และ 2.01 เซนติเมตรต่อหน่อ ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลองสูตรเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 สูตรที่ 1 5 7 และ 9 ให้ขนาดบาดแผล 2.41 2.16 2.10 และ 2.44 เซนติเมตรต่อหน่อ ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลองควบคุมให้ขนาดบาดแผล 3.71 เซนติเมตรต่อหน่อ (ตารางที่ 17)

จากการทดลองที่ได้จะเห็นว่าขนาดบาดแผลที่เกิดจากโรคกาบใบแห้งของต้นข้าวจะมีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ เมื่ออายุต้นข้าวเพิ่มขึ้น ซึ่งในความเป็นจริงแล้วชุดการทดลองควบคุมขนาดของแผลน่าจะขยายใหญ่ขึ้น อันเนื่องมาจากการลุกลามของโรครุนแรงขึ้น แต่ผลการทดลองที่เป็นเช่นนี้น่าจะเป็นเพราะเหตุที่ว่าเวลาในการทำการทดลองขณะนั้นเป็นช่วงฤดูแล้งที่มีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศค่อนข้างต่ำ ทั้งๆ ที่มีการฉีดพ่นน้ำให้แก่ต้นข้าวเป็น

ตารางที่ 17 ผลของสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus*. sp.ต่อต้นข้าวพันธุ์ กข 23 ที่ปลูกเชื้อ *R. solani* หลังฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งแรก 7 14 21 และ 28 วัน

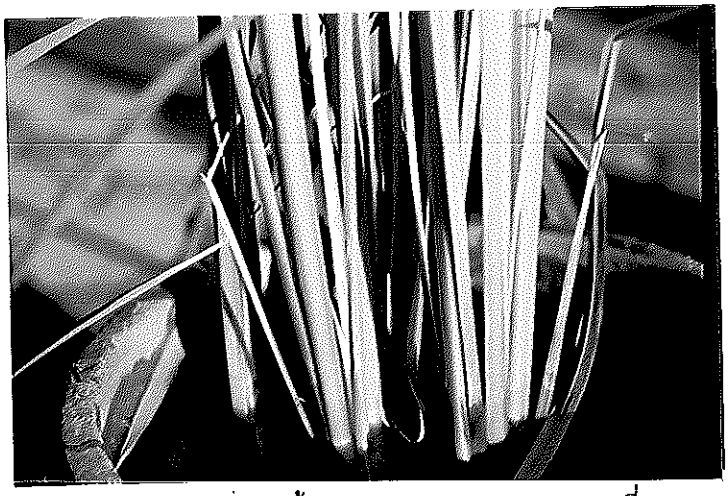
สูตรที่	ขนาดแผลต่อต้น (ซม)			
	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน
1 + *B. subtilis* NSRS 89-24	7.42^{a}	5.64^{d}	4.88^{bc}	1.06^{f}
5 + *B. subtilis* NSRS 89-24	8.29^{bc}	6.88^{bc}	4.46^{ab}	1.60^{e}
7 + *B. subtilis* NSRS 89-24	8.84^{de}	6.64^{c}	4.31^{a}	1.89^{de}
9 + *B. subtilis* NSRS 89-24	8.64^{cde}	6.98^{bc}	4.69^{abc}	2.01^{cde}
1 + *Bacillus* sp. LN007	8.64^{cde}	7.14^{bc}	6.79^{g}	2.41^{bc}
5 + *Bacillus* sp. LN007	8.96^{de}	7.41^{b}	5.04^{cd}	2.16^{cd}
7 + *Bacillus* sp. LN007	9.04^{e}	8.01^{a}	5.43^{de}	2.10^{cd}
9 + *Bacillus* sp. LN007	8.04^{b}	6.98^{bc}	5.47^{de}	2.44^{bc}
7^{Y}	8.58^{cd}	8.10^{a}	5.68^{ef}	2.78^{b}
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	8.91^{de}	8.40^{a}	6.08^{f}	3.71^{a}
ชุดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ *R. solani*)	0.00	0.00	0.00	0.00

^{Y}ชุดการทดลองควบคุมที่ใช้สูตรที่ 7 โดยไม่มีเชื้อ *Bacillus* spp.

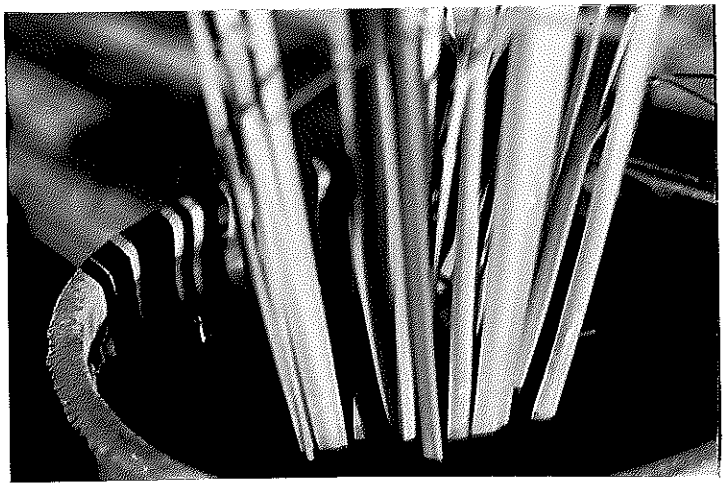
หมายเหตุ

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์หมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ P=0.05

ชุดการทดลองควบคุมปลูกเชื้อ *R. solani*



ชุดการทดลองสูตรเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 1



ชุดการทดลองควบคุมไม่ปลูกเชื้อ *R. solani*

รูปที่ 15 การเกิดโรคกาบใบแห้งในต้นข้าวพันธุ์ กข 23 หลังฉีดพ่นสูตรเชื้อครั้งแรก 28 วัน

ระยะๆ แล้วก็ตาม ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคข้าวเจริญได้ไม่ดี เนื่องจากโดยปกติการระบาดของโรคกาบใบแห้งมักเกิดในฤดูฝนที่มีความชื้นค่อนข้างสูง แต่จากการทดลองที่ได้ก็ยังสามารถระบุได้ว่าสูตรเชื้อที่ทำการทดลองยังคงมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

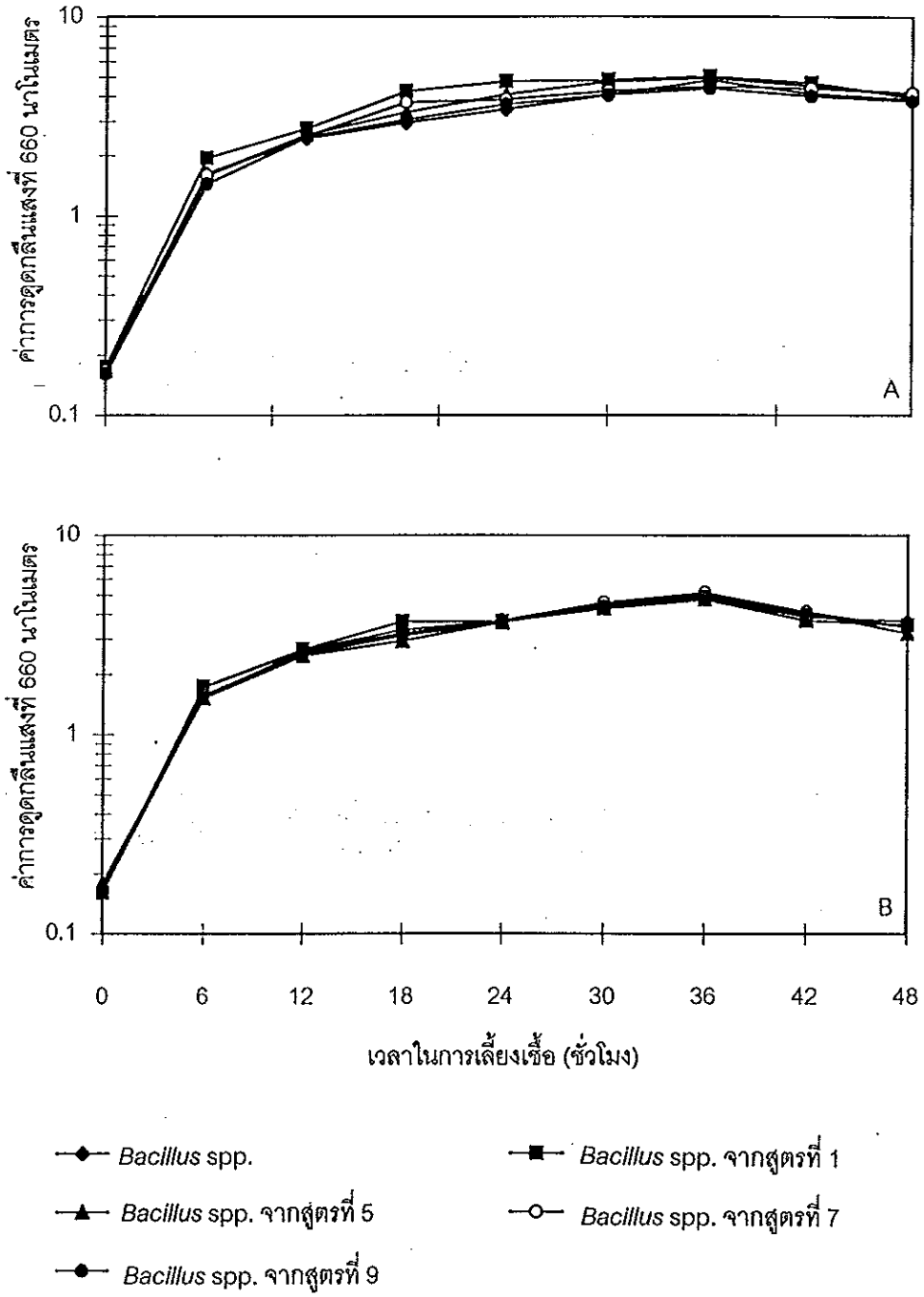
จากการทดลองความสามารถในการควบคุมโรคข้าวของสูตรเชื้อ *Bacillus* จะพบว่าการควบคุมโรคข้าวโดยเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 จะมีประสิทธิภาพดีกว่าเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 แสดงว่าการอยู่รอดและการปรับตัวของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ในสภาพธรรมชาติดีกว่า *Bacillus* sp. LN 007

8. ผลการศึกษาคุณภาพของสูตรเชื้อหลังทำการเก็บรักษา

8.1 ผลการทดสอบการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เก็บรักษาในสูตรเชื้อ

จากการทดลองพบว่าการเจริญของเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ทำการเก็บรักษาในสูตรเชื้อนาน 12 เดือน เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร Mckeen ยังคงสามารถเจริญได้ดีไม่แตกต่างจากเชื้อ *Bacillus* ปกติ (รูปที่ 16) นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* ได้ตามปกติ โดยเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 ที่เก็บรักษาไว้ในสูตรต่างๆ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ได้ร้อยละ 93.10-96.03 และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้ร้อยละ 89.62-96.84 ซึ่งเชื้อปกติสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* ได้ร้อยละ 94.76 และ 89.80 ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

สำหรับเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ที่เก็บรักษาไว้ในสูตรต่างๆ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ได้ร้อยละ 93.96-95.86 และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้ร้อยละ 90.49-94.29 ซึ่งเชื้อปกติสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* ได้ร้อยละ 95.15 และ 89.50 ตามลำดับ (ตารางที่ 18) นั่นแสดงให้เห็นว่าสปอร์ของเชื้อ *Bacillus* สามารถพักตัวได้นานถึง 12 เดือน โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติในการเจริญ และคุณสมบัติในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคข้าว



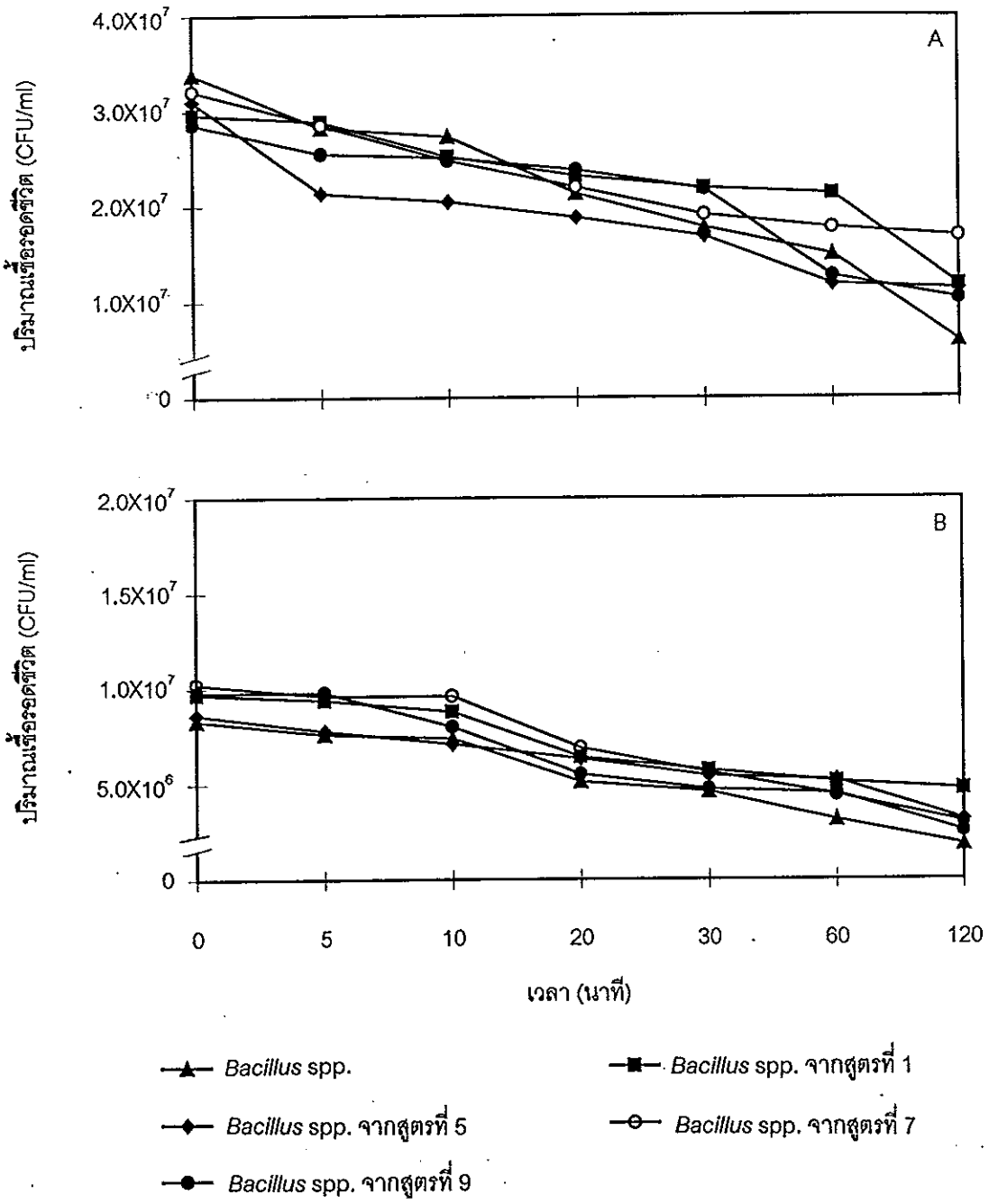
รูปที่ 16 การเจริญของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24(A) และ *Bacillus* sp. LN 007(B) ที่เก็บรักษาในสูตรเชื้อนาน 12 เดือน

ตารางที่ 18 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดยเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เก็บรักษาในสูตรเชื้อนาน 12 เดือน

เชื้อ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *P. grisea*	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *R. solani*
B. subtilis 89-24	94.76	90.80
B. subtilis NSRS 89-24 ในสูตรที่ 1	95.69	96.84
B. subtilis NSRS 89-24 ในสูตรที่ 5	93.10	89.62
B. subtilis NSRS 89-24 ในสูตรที่ 7	95.51	90.32
B. subtilis NSRS 89-24 ในสูตรที่ 9	96.03	90.32
Bacillus sp. LN 007	95.15	89.50
Bacillus sp. LN 007 ในสูตรที่ 1	95.15	91.49
Bacillus sp. LN 007ในสูตรที่ 5	94.57	90.49
Bacillus sp. LN 007 ในสูตรที่ 7	93.96	93.18
Bacillus sp. LN 007 ในสูตรที่ 9	95.86	94.29

8.2 **การทดสอบความคงตัวต่อแสงแดดของสูตรเชื้อปฏิปักษ์** *Bacillus* spp.

สูตรเชื้อปฏิปักษ์ที่ผลิตได้เมื่อนำไปทดสอบความคงตัวต่อแสงแดด พบว่าสูตรเชื้อทั้ง 4 สูตร มีความคงตัวต่อแสงแดดได้ดี เมื่อนำไปผึ่งแดดนาน 120 นาที มีปริมาณเชื้อลดลงไม่ถึง 1 log cycle ตัวอย่างเช่น สูตรเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS 89-24 สูตรที่ 1 ปริมาณเชื้อจะลดลงจาก 2.96×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร เหลือ 1.17×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *Bacillus* ปกติ เมื่อนำไปผึ่งแดดนาน 120 นาที ปริมาณเชื้อลดลงประมาณ 1 log cycle โดยเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 มีปริมาณลดลงจาก 3.38×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร เหลือ 5.90×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 มีปริมาณลดลงจาก 8.30×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เหลือ 1.80×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 การทนแสงแดดของสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS 89-24 (A) และ *Bacillus* sp. LN 007 (B)

บทที่ 4

สรุป

1. เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Mckeen จะมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงในระยะที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว (log phase) คือ 6-12 ชั่วโมง และฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะ (ในน้ำหมัก) ที่ผลิตได้โดยเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ จะมีอัตราการยับยั้งสูงสุดที่เวลา48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่การเจริญคงที่ (stationary phase)

2. อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาทีสามารถฆ่าเซลล์ (vegetative cell) ของเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้หมด และอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้หมด

3. พีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 7 คือพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการงอกของสปอร์และการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

4. ส่วนผสมในการเตรียมสูตรเชื้อที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23 น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มมีดังนี้

preservative คือ โปแตสเซียมซอร์เบท ร้อยละ 0.1

emulsifier คือ tween 80 ร้อยละ 0.1

binder คือ คาราจีแนน ร้อยละ 1.0

protectant คือ กลีเซอรอล ร้อยละ 0.3

5. สูตรผสมของสารเคมีที่จะนำผลิตสูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* ที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดข้าว และก่อให้เกิด phytotoxic ต่อต้นข้าวพันธุ์ กข 23 น้อยที่สุดประกอบด้วย โปแตสเซียมซอร์เบท ร้อยละ 0.1 tween 80 ร้อยละ 0.1 คาราจีแนน ร้อยละ 1.0 และกลีเซอรอล ร้อยละ 0.3

6. สูตรเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* ที่ผลิตได้ เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ปี ปริมาณเชื้อจะลดลง 5 log cycle และมีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต 10^7 CFU ต่อ

มิลลิลิตร และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร Mckeen สามารถเจริญและสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* ได้ดี

7. สูตรเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS 89-24 จะมีผลควบคุมการเกิดโรคใบไหม้และโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ดีกว่าสูตรเชื้อ *Bacillus* sp. LN 007 ส่วนสูตรเชื้อปฏิปักษ์ที่ควบคุมการเกิดโรคได้ดีที่สุดคือ สูตรเชื้อที่ประกอบไปด้วย โปแตสเซียมซอร์เบท ร้อยละ 0.1 tween 80 ร้อยละ 0.1 คาราจีแนน ร้อยละ 1.0 กลีเซอรอล ร้อยละ 0.3 และ *B. subtilis* NSRS 89-24

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2535. แมลงและสัตว์ศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจและการเกษตร. ไอเดียร์สแควร์. 400 หน้า.

เกษม สร้อยทอง. 2532. การใช้รา *Chaetomium cupreum* ในการใช้ควบคุมโรคไหม้ของข้าวโดยชีววิธี. ว.โรคพืช 9(1):28-33.

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. การตรวจสอบและวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดพันธุ์. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 194 หน้า.

จิรเดช แจ่มสว่าง, จินตนา ชะนะ, วรรณวิไล เกษนรา, เฉลิมลาภ ช่วยประสิทธิ์, สุพรรณี ชีววิริยะกุล, ธีรวุธ ตู้จินดา, ศรปราชญ์ ธไนศวรรยางกูล, วุฒิชัย ญารอรรถ และ กัทลี วัลย์ สุขช่วย . 2534. การควบคุมโรคต้นแห้งของข้าวบาเลย์ โดยวิธีคลุกเมล็ดมวลชีวภาพ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29 สาขาพืช ระหว่างวันที่ 4-7 กุมภาพันธ์ 2534 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 257-268.

จิราพร เพชรรัตน์. 2534. การควบคุมแมลงศัตรูพืชและวัชพืชโดยชีววิธี. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ช่อทิพย์ ถนอมถิ่น. 2538. การใช้แบคทีเรียแอนทาโกนิสต์เพื่อควบคุมเชื้อ *Erwinia* สาเหตุโรคเน่าเละในมันฝรั่ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณรงค์ สิงห์บุระอุดม, เพชรรัตน์ จันทรฑณ และ วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2538. ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของ culture filtrate ของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* cav. สาเหตุโรคใบไหม้ของข้าว. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย์) 29(1):16-27.

ธวัชชัย สิชฌวัฒน์. 2541. อนาคตสารเคมีเกษตรในประเทศไทย. *ใน* รายงานการประชุมวิชาการ อารักขาพืชแห่งชาติ. ว. เคหการเกษตร. 22 (1) : 31-32.

นพดล พีรเสถียร. 2535 ข้าวไทยกลับสู่ยุคทองอีกครั้ง. ว.ผู้ส่งออก 5(115):47-53.

นลินี จาริกภากร. 2532. โรคและสาเหตุของโรคข้าวที่สำคัญในภาคใต้. เอกสารประกอบการบรรยายโครงการพัฒนาและฟื้นฟูพื้นที่ภาคใต้ที่ประสบอุทกภัย ปี 2532 และโครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีเพื่อการเกษตรภาคใต้ ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง อำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง. 12 หน้า.

นลินี จาริกภากร. 2533. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. เอกสารประกอบการบรรยายวิชาการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี โครงการจัดตั้งภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 34 หน้า.

นลินี จาริกภากร, พาณี หนูนิ่ม, บุญมี วารินสอาด และ มนูญ เอนกชัย. 2535. การควบคุมโรคข้าวโดยวิธีคลุกเมล็ดด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* . ว.วิชาการเกษตร 10:85-89.

นลินี จาริกภากร, พาณี หนูนิ่ม, บุญมี วารินสอาด, พิรุณ จันทนกุล และ มนูญ เอนกชัย. 2535. การป้องกันกำจัดโรคข้าวโดยเชื้อบัคเตรี *Bacillus subtilis*. ว.วิจัยข้าว 1:42-53.

นลินี จาริกภากร, พาณี หนูนิ่ม, โสพนา วรฉัตรวิทยา, อุทิศ ดวงสุวรรณ และ มนูญ เอนกชัย. 2537. การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคข้าวในสภาพไร่โดยเชื้อบัคเตรี *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และ NSRS 89-26. ว.วิชาการเกษตร 12(2):111-116.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2538. การควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ : ทางเลือกใหม่ของเกษตรกร. ว.เรื่องน่ารู้สำหรับประชาชน 21:226-236.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2539. งานวิจัยด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพในปัจจุบัน. ว.แก่นเกษตร 24(2):53-62.

บัญญัติ สุขศรีงาม 2534. สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์. ใน จุลชีววิทยาทั่วไป. ภาควิชาจุลชีววิทยา หน้า 173-183. ชลบุรี : คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา.

บุญชัย แซ่ด่าน. 2535. อิทธิพลของปุ๋ยไนโตรเจนและระยะการปักดำต่อผลผลิตข้าว (*Oryza sativa*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บุญส่ง แสงอ่อน. 2533. จุลชีววิทยา. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยนเรศวร. 251 หน้า.

ปริญญา จันทร์ศรี, นิพนธ์ ทวีชัย, วิชัย โฆสิตรัตน และ วิวัฒน์ แดงสุภา. 2533. การควบคุมโรคเน่าเละของมันฝรั่งโดยชีววิธี. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 28 สาขาพืช 29-31 มกราคม 2533 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 467-476.

ประพาส วีระแพทย์. 2531. ความรู้เรื่องข้าว. สาขาคัดพันธุ์ต้านทานศัตรูข้าว กองการข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ 108 หน้า.

เปรมปรีย์ ณ.สงขลา. 2537. การใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช, ว. เคหการเกษตร. 18 (12) : 175-183.

มณจันทร์ เมฆธน. 2536. ศักยภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* AP-01 ในการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุของโรคพืช. ว.วิทยาศาสตร์ ม.ก. 11(1):9-20.

มณจันทร์ เมฆธน และ ชัยวัฒน์ กระตุกฤกษ์. 2537. การป้องกันโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนโดยชีววิธีด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* AP-01. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32 สาขาพืช 3-5 กุมภาพันธ์ 2537 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 200-208.

มานะ กาญจนมณีเสถียร, R. E. Gaunt, นลินี จาริกภากร, วสันต์ เพชรรัตน์ และ นิพนธ์ ทวีชัย. 2536. ปฏิกริยาระหว่างเชื้อแอนทาโกนิสต์และเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31 สาขาพืช 3-6 กุมภาพันธ์ 2536 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 611-612.

มาลิน จุลศิริ. 2532. ยาต้านจุลชีพ. ความรู้พื้นฐานและประยุกต์ การใช้นอกวงการแพทย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ. 246 หน้า.

ลือชัย อารยะสังสฤษฏ์ และ สุภาพร จันทร์บัวทอง. 2538. ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปัจจัยสภาพแวดล้อม และเชื้อโรคใบไหม้ (*Pyricularia oryzae*) ใน ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 4(1):59-70.

วิทยา มีวุฒิสม. 2537. การวิจัยและพัฒนาการใช้ yeast และ lactic acid bacteria ในอาหารสัตว์. 108 หน้า.

วาสนา มู่สา. 2542. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดย *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมคิด ดิสถาพร. 2536. โรคไหม้คอรวงข้าวระบาดที่ภาคเหนือ. กสิกร 66(2):165-167.

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์. 2532. จุลชีววิทยาปฏิบัติ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 347 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2540. ข้อมูลการปลูกข้าวจำแนกตามพันธุ์ที่ปลูก ปีเพาะปลูก 2539/40. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร กรุงเทพฯ. 218 หน้า.

อัจฉรา วิรัตน์พงษ์. 2541. ภาวะเศรษฐกิจการเกษตร(ข้าว). ว. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร. 44(504)18-20.

อุรัจฉทา กสิกรรมไพบูลย์, วิชัย โฆษิตรัตน, นิพนธ์ ทวีชัย และ ลอลิดา เมฆสองสี. 2535. ผลของแบคทีเรียแอนทาโกนิสต์ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 30 สาขาพืช 29 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2535 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 321-328.

Adams, P.B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 28:59-72.

Andrews, J.H., Berbee, F.M. and Nordheim, E.V. 1983. Microbial antagonism to the imperfect stage of the apple scap pathogen *Venturia inequalis*. Phytopathology 73:228-234.

Arwiyonto, T., Sakata, K., Goto, M. Tsuyumu, S., and Takikawa, Y. 1994. Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum.* The American Phytopathological Society 60:288-294.

Baker, K.F. and Cook, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. St. Paul: The American Phytopathological Society, St. Paul MN. 443 p.

Baker, C.J., Stravely, J.R. and Mock, N. 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field condition. Plant Dis. 69(9):770-772.

Baker, C.J., Stravely, J.R., Thomas, C.A.,Sasser, M. and MacFall, J.S. 1983. Inhibitory effects of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on the development of rust pustules on bean leaves. Phytopathology 73:148-152.

Benyagoub, M. and Jabaji-Hare, S.H. 1992. Parasitism of hyphae and sclerotia of *Rhizoctonia solani* by *Stachybotrys elegans*. Phytopathology 82:1119.

Brana, A.F., Wolfe, S. and Demain, A.L. 1985. Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. Can. J. Microbiol. 31 : 736-743.

Broadbent, C., Baker, K.F. and Waterworth, Y. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. Aust. J. Soil. Sci. 24:925-944.

Buchanan, R.E. and Gibbons N.E. 1974. Bergey's manual of determinative Bacteriology 2th ed. The Wafverly press, Inc New York. 531-533.

Buyer, J.S., Lorenzo, V. and Neilands, J.B. 1991. Production of the siderophore aerobactin by halophilic pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol. 57:2246-2250.

C.A.B. International Mycological Institute. 1985. Rice Disease. Cambrisn News, UK. 380 p.

Charigkapakorn, N., Noonim, P., Aneckchai, M. and Warin Sahd, B. 1991. Biological control of bacterial leaf blight and some fungal pathogens of rice in Thailand by *Bacillus subtilis* . Thailand J. Agric. Sci. 24:283-299.

Cladon, N., Allan, M., Hanson, J.R. and Avent, A.G. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 88:505-513.

Cook, R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms of biological control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 31:53-80.

Cook, R.J., and Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society St. Paul, MN. 539 p.

Cook, R.J., Thomasshow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G. and Kim, D.S. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. Proc. Natl. Acad. Sci. 99:4197-4201.

Corke, A.T.K. and Rishbeth, J. 1981. Use of microorganisms to control plant diseases. P. 717-736 in : H.D. Burger, ed. Microbial Control Pests and Plant Diseases, 1970-1980. Academic Press, London.

Cowan, S.T., Holt, J.G., Liston, J., Murray, R.G.E., Niven, C.F., Ravin, A.W. and Stanier, R.Y. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1268 p.

Dickinson, C.M. and Preece,T.F. 1976. Microbiology of Aerial Plant Surfaces. Academic Press, London.

Di Pietro, A., Gut-Rella, M., Pachlatko, J.P. and Schwinn, F.J. 1992. Role of antibiotic produce by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. Phytopathology 82:131-135.

Dobois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.

Elcin, Y.M. 1995. *Bacillus sphaericus* 2362-calcium alginate microcapsules for mosquito control. Enzyme Microb. Technol. 17:587-591.

Ferreira, J.H.S. Matthee, F.N. and Thomas, A.C. 1991. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis.* Phytopathology 81 : 283-287.

Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 26:75-91.

Gamliel, A., Kantan, J. and Cohon,E. 1989. Toxicity of choronnitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as related to their structure. Phytoparasitica 17:101-106.

Gilbert, G.S., Handelsman, J. and Parke, J.L. 1990. Bacterial communities in soil and on soy bean roots, and the effects of a biological control agent. Phytopathology 80:995.

Haavik, H.I. and Thomassen, S. 1973. A bacitracin- negative mutant of *Bacillus licheniformis* which is able to sporulate. J. Gen. Microbiol. 76 : 451-454.

Hall, T.J., Schreiber, L.R. and Leben, C. 1986. Effects of xylem-colonizing *Bacillus* spp. on Verticillium wilt in maples. Plant Dis. 70:521-524.

Heye, C.C. and Andrew, J.H. 1983. Antagonism of *Athelia bombacina* and *Chaetomium globosum* to the apple scab pathogen, *Venturia inequalis* . Phytopathology 73:650-654.

Howell, C.R., Beier, R.C. and Stipanovic, R.D. 1988. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in biological control of *Pythium preemergence* damping-off by the bacterium. Phytopathology 78:1075-1078.

Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyroluteorin. Phytopathology 70:712-715.

Huang, T.C. and Chang, M.C. 1975. Studies on Xanthobacidin, a new antibiotic from *Bacillus subtilis* active against *Xanthomonas*. Bot. Boll. Acad. Sinica 16:137-148.

IRTP. 1980. Standard Evaluation System for Rice. 2nd edition. IRRI, Los Banos, Philippines. 44 p.

Islam, K.Z., and Nandi, B. 1985. Control of brown spot of rice by *Bacillus megaterium*. Z. Pelanzenkr. Pflanzenschutz. 92(3):241-246.

Jacobs, M.J., Bugbee, W.M. and Gabrielson, D.A. 1985. Enumeration location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet beta-vulgaris roots. Can. J. Bot. 63(7): 1262-1265.

Jacobsen, B.J. and Backman, A. 1993. Biological and cultural plant disease controls : Alternative and supplements to chemical in IMP systems. Plant Dis. 77:311-315.

Jansen, E.F. and Hirshmann, D.J. 1944. Production of subtilin. Arch. Biochem. 4:297-309.

Kanjanamaneesathion, M., Srichana, T. and Rhodesujit, A. 1995. Pellets of *Trichoderma harzianum*. Songklanakarin J. Sci. Technol. 17(3):317-326.

Katz, E. and Demain, A.C. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus* : chemistry, biogenesis, and possible functions. Biol. Rev. 41:449-474.

Kempf, H.J., Bauer,P.H. and Sdhroth, M.N. 1993. Herbicolin A associated with crown and roots of wheat after seed treatment with *Erwinia herbicola* B247. Phytopathology 83:213-216.

Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature 286:885-886.

Krezel, Z. and Leszezyaska, D. 1978. Antibiotic activity of *Bacillus subtilis* 93 to some phytopathogenic microorganisms. Med. Fac. Landbouwet. Rijksuniv. Gent. 43:859-865.

Lemanceau, P., Bakker, P.A., Kogel, W.J., Alabouvette, C. and Schippers, B. 1993. Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and Pseudobactin 358 pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Appl. Environ. Microbiol. 59:74-82.

Loeffler, W., Tschen, J. S. M., Vanittanakom, N., Kugler, M., Knorp, E., Hsieh, T.F. and Wu, T.G. 1986. Antifungal effect of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3 a comparision with activities of other *Bacillus* antibiotic. Phytopathology 115:204-213.

Matsuura, K. 1986. Scanning electron microscopy of the infection process of *Rhizoctonia solani* in leaf sheaths of rice plants. Phytopathology 76:811-814.

McCormack, P.J., Wildman, H.G. and Jeffries, P. 1994. Production of antibacterial compounds by phylloplane inhibiting yeasts and yeastlike fungi. Appl. Environ. Microbiol. 60:927-931.

Mckeen, C.D., Reilly, C.C. and Pusey, P.L. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. Phytopathology 76:136-139.

Nandi, P. and Sen, G.P. 1953. An antifungal substance from a strain of *Bacillus subtilis*. Nature 192:871-872.

Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M. 1992. Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. Biotechnol. Lett. 14 : 817-822.

Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M. 1995a. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. Biotechnol. Bioeng. 47 : 209-214.

Ou, S.H. 1973. A hand book of rice disease in the tropics. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.

Phae, C,G., Shoda, M., Kita, N.,Nakano, M. and Ushiyama, K. 1992. Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. Annual of the Phytopathological Society 58:329-339.

Parthasarathy, M. and Ou, S.H. 1965. Opening Address : International approach to the problem of blast. P 1-5. In The Rice Blast Disease. Proceedings of Symposium at The International Rice Research Institute. July, 1963. The Johns Hopkins Press, Maryland.

Pusey, P.L., Hotchkiss, M.W., Dulmage, H.T., Baumgardner, R.A., Zehr, E.I., Reilly, C.C. and Wilson C.L. 1988. Pilot tests for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for postharvest control of peach brown rot. Plant Dis. 72:622-626.

Pusey, P.L. and Wilson, C.L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant Dis. 68:753-756.

Pusey, P.L. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. J. Pest. Sci. 27:133-140.

Reddy, M.S. and Rahe, J.E. 1989. *Bacillus subtilis* and selected onion rhizobacteria in onion seedling rhizospheres: Effect on seedling growth an indigenous rhizosphere microflora. Soil Biol. Biochem. 21:379-383.

Ridout, C.J., Lumsden, R.D. and Hruschka, W.R. 1992. Identification of mycelial polypeptides associated with gliotoxin-producing strains of the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. Phytopathology 82:479-484.

Ryter, J.L., Lukezic, F.L., Craig, R. and Moorman, G.W. 1989. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. Phytopathology 79:367-370.

Schippers, B., Bakker, A.W., Bakker, P.A.H.M. and Peer, R.V. 1990. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. Plant and soil 129:75-83.

Sinclair, J.B., Agnihotri, P.V. Singh, N. and Dwivedi, T.S. 1989. *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent for plant disease. Perpectives in Phytopathology 367-374.

Takesako, K., Ikai, K., Haruna, F., Endo, M., Shimanaka, K., Sona, K.,Nakamura, T. and Kato, A. 1991. Aureobacidins, new antifungal antibiotics. Texonomy, fermentation, isolation and properties. J. Antibiotics 44:919-924.

Trevors, J. T., Van Elsas, J. D., Lee, H. and Wolters, A. C. 1993. Survival of alginate-encapsulated *Psuedomonas fluorescens* cells in soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:637-643.

Tschen, J.S.M. 1987. Control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. Trans. Br. Mycol. Soc. 28:483-493.

Tveit, M. and Moore, M.B. 1954. Isolates of *Chaetomium* that protect oats from *Helminthosporium victoriae*. Phytopathology 44:686-689.

Tweddell, R.J., Jabaji-Hare, S.H. and Charest, P.M. 1992. Production of chitinases and β-1,3-glucanase by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. Appl. Environ. Microbiol. 60:489-495.

Utkhede, R.S. and Rahe, J.E. 1983. Interactions of antagonist and pathogen in biological control of onion white rot. Phytopathology 73:890-893.

Vicedo, B., Penalver, R., Asins, M.J. and Lopez, M.M. 1992. Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and pHgk 84 transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the Tra-mutant strain 026. Appl. Environ. Microbiol. 59:309-315.

Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 26:379-407.

William, C.F. and Dennis, C.W. 1988. Food microbiology. Wisconsin, Madison 539 p.

Wilson, C.L. and Wisniewski, M.E. 1989. Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables : an emerging technology. Ann. Rev. Phytopathol. 27:425-441.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การย้อมสปอร์

สารเคมี

1. มาลาไคลท์กรีนร้อยละ 5 (malachite green)
2. สารละลายซาฟรานีน (safranin)
3. เอทธานอลร้อยละ 95

วิธีการ

1. เกลี่ยเชื้อบนสไลด์โดยไม่ต้องยึดด้วยความร้อน
2. หยดสารละลายมาลาไครท์กรีนร้อยละ 5 ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ
3. นำสไลด์วางเหนือน้ำเดือด 10 นาที คอยเติมสารละลายมาลาไครท์กรีน ร้อยละ 5 เพื่อไม่ให้สารละลายบนสไลด์แห้ง
4. ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด แล้วล้างด้วยเอทธานอลร้อยละ 95 เป็นเวลา 15 วินาที
5. ล้างออกด้วยน้ำสะอาด หยดสารละลายซาฟรานีน 30 วินาที
6. ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด ทำให้สไลด์แห้งนำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศ์ ตัวเซลล์จะติดสีแดงของซัลฟรานีน ส่วนสปอร์จะติดสีเขียวของมาลาไครท์กรีน

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (Dobois *et al.*, 1956)

สารเคมี

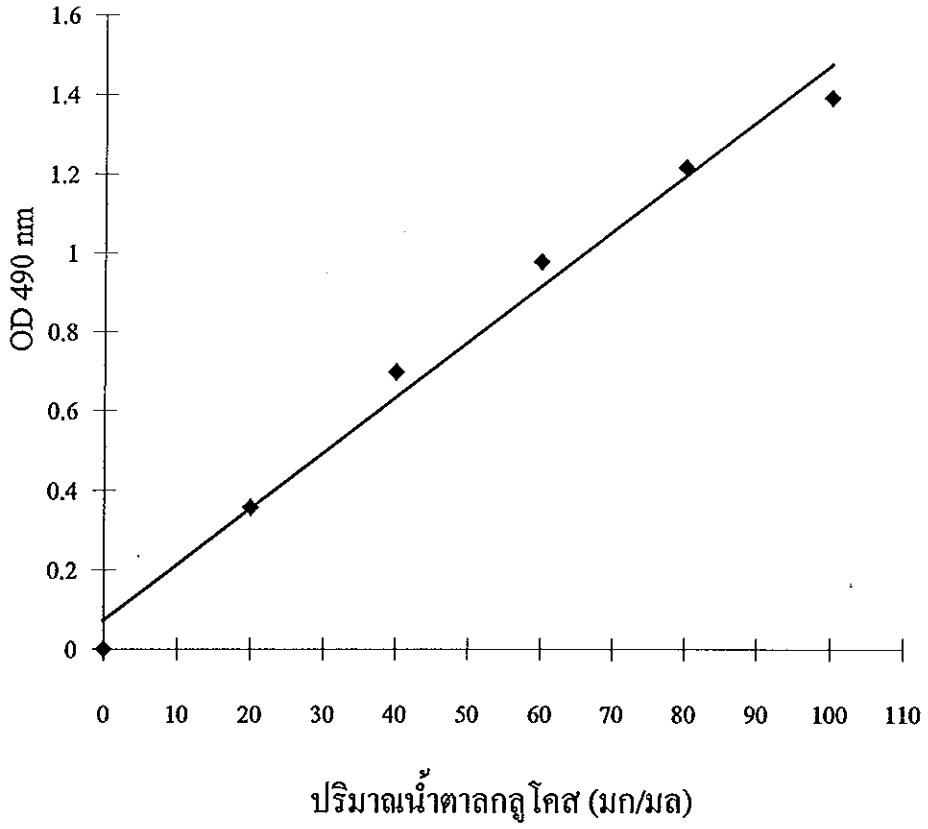
1. ฟีนอล ร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2. กรดกำมะถันเข้มข้น (ความถ่วงจำเพาะ 1.08)

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 20 40 60 80 และ100 ไมโครกรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่นโดยบรรจุสารละลายมาตรฐานในหลอดทดสอบ หลอดละ 1 มิลลิลิตร เติมฟีนอล ร้อยละ 5 ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดกำมะถันเข้มข้น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสง

2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางจนมีความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลที่เหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 5 ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร สำหรับหลอดควบคุมให้ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

3. คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายกลูโคสมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเจริญของเซลล์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

เชื้อ	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช					
		OD 660 nm					
		4	5	6	7	8	9
B. subtilis NSRS 89-24	0	0.118	0.115	0.133	0.129	0.124	0.122
	6	0.191	0.869	0.917	0.976	0.903	0.760
	12	0.193	2.559	2.391	2.505	2.538	2.262
	24	1.234	3.680	4.120	4.410	4.300	4.125
	36	2.021	3.910	5.490	5.680	5.590	5.000
	48	3.215	4.010	4.260	4.650	4.690	3.916
	60	3.326	3.590	4.030	4.465	4.432	3.816
	72	3.046	3.174	3.816	4.218	4.281	3.517
Bacillus sp. LN 007	0	0.121	0.120	0.124	0.122	0.132	0.123
	6	0.129	1.079	1.473	1.550	1.511	0.830
	132	0.130	2.457	2.655	2.661	2.546	1.138
	24	1.130	2.655	3.975	4.035	4.530	3.855
	36	2.236	5.610	6.074	6.161	6.013	5.458
	48	3.714	4.680	4.846	4.892	4.032	3.950
	60	3.781	4.032	4.248	4.298	4.046	3.875
	72	3.542	3.816	4.032	4.041	3.616	3.541

ตารางภาคผนวกที่ 2 การเจริญของสปอร์เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 และ *Bacillus* sp. LN 007

เชื้อ	เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช					
		OD 660 nm					
		4	5	6	7	8	9
B. subtilis NSRS 89-24	0	0.234	0.209	0.210	0.209	0.205	0.199
	6	0.234	0.597	0.632	0.748	0.375	0.208
	12	0.234	1.621	2.142	2.217	1.818	1.488
	24	1.402	2.785	3.655	3.755	2.840	2.825
	36	1.641	3.420	4.620	4.662	2.950	2.245
	48	2.310	4.600	4.640	4.960	3.330	3.050
	60	2.461	4.350	4.560	4.585	3.380	2.980
	72	2.382	4.187	4.216	4.326	3.042	2.761
Bacillus sp. LN 007	0	0.213	0.222	0.208	0.219	0.206	0.213
	6	0.261	0.703	0.774	0.757	0.596	0.490
	132	0.233	1.572	1.956	1.889	1.765	1.494
	24	1.066	2.550	3.070	2.985	2.750	3.255
	36	1.432	3.410	4.710	3.590	3.030	3.730
	48	2.610	3.874	5.680	5.880	5.100	3.964
	60	2.876	3.870	5.556	5.768	4.780	3.680
	72	2.715	3.751	5.324	5.612	4.361	3.418

ตารางภาคผนวกที่ 3 ราคาสารเคมีต่อสูตรเชื้อ 1000 มิลลิลิตร

สูตรที่ 1

สารเคมี	ร้อยละ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ราคา (บาท)
Potassium sorbate	0.1	1.0	1.71
Tween 80	0.1	1.0	1.40
Carrageenan	1.0	10.0	175.00
Glycerol	0.3	3.0	3.18
รวม			181.29

สูตรที่ 5

สารเคมี	ร้อยละ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ราคา (บาท)
Lactic acid	0.1	1.0	0.91
Tween 80	0.1	1.0	1.40
Carrageenan	1.0	10.0	175.00
Glycerol	0.3	3.0	3.18
รวม			180.49

สูตรที่ 7

สารเคมี	ร้อยละ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ราคา (บาท)
Potassium sorbate	0.1	1.0	1.71
Tween 80	0.1	1.0	1.40
Carboxymethyl cellulose	1.0	10.0	19.23
Glycerol	0.3	3.0	3.18
รวม			25.52

สูตรที่ 9

สารเคมี	ร้อยละ	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ราคา (บาท)
Lactic acid	0.1	1.0	0.91
Tween 80	0.1	1.0	1.40
Carboxymethyl cellulose	1.0	10.0	19.23
Glycerol	0.3	3.0	3.18
รวม			24.72

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายประเสริฐ จริยะเลอพงษ์

วัน เดือน ปี เกิด 5 กันยายน 2515

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชศาสตร์)	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล	2537