Central Library
Prince of Songkla University

3. ผลการวิจัย (Results)

ฝ่ายหอสมุด
มุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

1. การคัดแยกเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ต่างๆ จากดิน

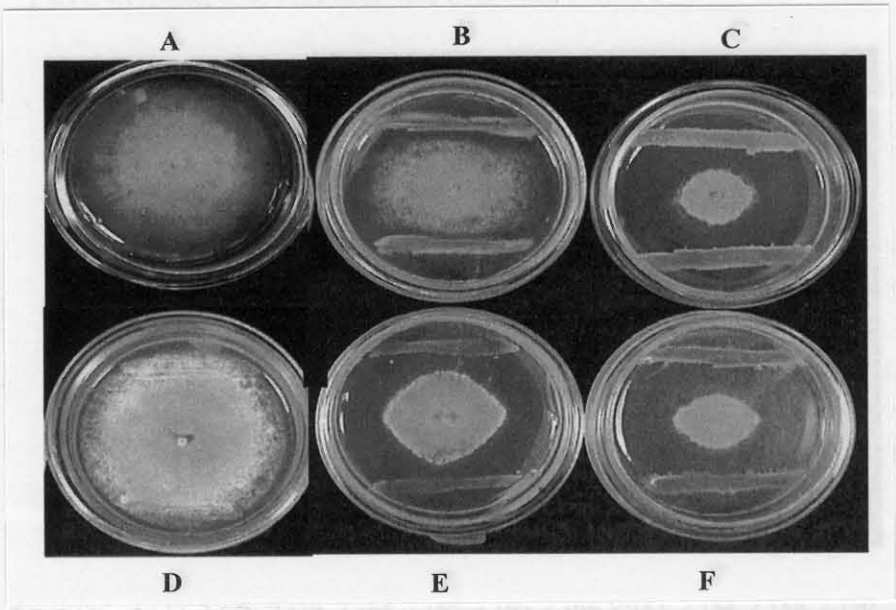
เมื่อนำตัวอย่างดิน (7 ชุด) จำนวน 1 กรัมมาละลายน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 99 มิลลิลิตรมาเจือจางในอ่างควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80 °ซ นาน 30 นาที *Bacillus* spp. สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนจึงลดจำนวนของเชื้ออื่นๆในดินลง เจือจางเป็นลำดับสิบเกลี่ยบนจานอาหาร nutrient agar (NA) สามารถแยก *Bacillus* spp. เป็นโคโลนีเดี่ยวได้ทั้งหมด 1,115 สายพันธุ์ มีลักษณะของโคโลนีหลายแบบ ได้แก่ โคโลนีขาว ครีม เหลือง ด้าน เงิ้ม ลักษณะขอบเรียบและไม่เรียบ จากนั้นเก็บโคโลนีที่แยกได้ไปเพาะแยกเชื้อด้วยการเกลี่ยให้เป็นโคโลนีเดี่ยว เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการย้อมแกรมติดสีน้ำเงิน และรูปท่อน ของ *Bacillus* spp. มีขนาดต่างๆกัน พบเอนโดร์สปอร์ตรงกลางเซลล์ทุกโคโลนี เก็บเพื่อทดสอบต่อไป

ชุดที่	**1**	**แยกได้ 204 โคโลนี**
	2	**แยกได้ 214 โคโลนี**
	4	**แยกได้ 104 โคโลนี**
	5	**แยกได้ 80 โคโลนี**
	6	**แยกได้ 308 โคโลนี**
	7	**แยกได้ 205 โคโลนี**
รวม		**1,115 โคโลนี**

2. ปฏิกิริยาปฏิปักษ์ของ *Bacillus* spp. ต่อเชื้อรา *P. digitatum* บนจานอาหาร

เมื่อนำเชื้อรา *P. digitatum* ที่เพาะบนจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 24°ซ จนได้รัศมีของโคโลนีประมาณ 0.7-0.8 เซนติเมตร เขี่ยเชื้อแบคทีเรียขีดลงบนจานอาหารโดยห่างจากโคโลนีของเชื้อรา บ่ม 3 วัน พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ทดสอบมีอิทธิพลต่อการเจริญของโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเดียวกันแตกต่างกัน (รูปที่ 4) ศักยภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* โดย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างดินแตกต่างกันดังตารางที่ 3 โดยจัดระดับการยับยั้งแบ่งตามเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่คิดจากสูตรของ Gamliel และคณะ (1989) แบ่งออกเป็น 5 ระดับ คือ ที่ช่วงเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 0-20, 21-40, 41-60, 61-80 และ 81-100 จัดเป็นระดับ 0, 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ มีลักษณะการยับยั้งระหว่างโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราได้หลายรูปแบบ เช่น บริเวณยับยั้ง (inhibiton zone) เกิดขึ้นระหว่างโคโลนีที่เชื้อราสัมผัสกับแบคทีเรีย หรือเชื้อราเจริญชนแนวแบคทีเรียแต่ไม่สามารถเจริญข้ามแนวแบคทีเรียได้ มีลักษณะที่แตกต่างจากจานควบคุมที่มีเฉพาะโคโลนีของเชื้อรา (รูปที่ 4A) หรือบริเวณที่เชื้อราไม่สัมผัสกับแบคทีเรีย ในรูปที่ 4B, 4C, 4E และ 4F แสดงการควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ดีระดับ (3-4) สังเกตได้ว่ามีพื้นที่ว่างระหว่างโคโลนีของเชื้อทั้งสองชัดเจนโดยที่เชื้อราเจริญได้เพียงเล็กน้อย แต่แบคทีเรียปฏิปักษ์มีฤทธิ์ยับยั้งการขยายออกของเส้นใยเชื้อราเท่านั้นไม่ส่งผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา เนื่องจากเชื้อราบนจานอาหารดังกล่าวสามารถสร้างสปอร์ในวันที่ 3 ได้พร้อมกับเชื้อราในจานควบคุม โดยที่โคโลนีของเชื้อราไม่แผ่ขยาย

ดังในจานควบคุม แบคทีเรีย (รูปที่ 4D) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เลย และในตารางที่ 4 สรุปศักยภาพของจำนวน สายพันธุ์ *Bacillus* spp. กลุ่มที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราตามระดับการยับยั้งดีที่สุดระดับ (4) จำนวน 24 สายพันธุ์ ที่ระดับการยับยั้ง 3 จำนวน 56 สายพันธุ์ ซึ่งนับว่าการคัดแยกสายพันธุ์ *Bacillus* spp. เพื่อใช้ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. digitatum* ครั้งนี้ได้ผลดี (ตารางที่5) คือมีสายพันธุ์ *Bacillus* spp. ที่ทำการทดสอบทั้งหมดให้การยับยั้งสูงจำนวนหนึ่งที่นำไปคัดแยกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดสำหรับการทดสอบต่อไป



รูปที่ 4 ปฏิกิริยาระหว่างเชื้อรา *P. digitatum* กับแบคทีเรีย *Bacillus* spp. บนอาหาร PDA: (A) ลักษณะของโคโลนีเชื้อราในชุดควบคุม (control), (B-F) กับแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบ

ตารางที่ 3 ระดับการยับยั้งของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต่อการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* บนจานอาหาร PDA

ระดับการยับยั้ง	เชื้อแบคทีเรีย
+4	1.8,1.20, 1.50, 1.61 3.69, 3.79 4.19, 4.33, 4.34, 4.35, 4.49, 4.51, 4.63, 4.100 5.11, 5.30, 5.35, 5.41 6.198, 6.199, 6.282 7.121, 7.155, 7.202
+3	1.2, 1.5, 1.9, 1.22, 1.35, 1.51, 1.62, 1.66, 1.93, 1.165, 1.166 2.9, 2.22, 2.168, 2.182 **3.53***, 3.81, **3.95***, **3.96***, 3.142, 3.126 4.7, 4.20, 4.24 5.25, 5.63, 5.65

	6.22, 6.24, 6.46, 6.47, 6.75, 6.135, 6.137, 6.139, 6.294 7.3, 7.7, 7.19, 7.23, 7.94, 7.117, 7.122, 7.135, 7.138, 7.139, 7.142, 7.143, 7.144, 7.146, 7.147, 7.149, 7.153, 7.162, 7.176, 7.178
+2	1.1, 1.10, 1.30, 1.33, 1.34, 1.40, 1.41, 1.42, 1.46, 1.53, 1.55, 1.60, 1.65, 1.68, 1.70, 1.73, 1.74, 1.76, 1.79, 1.84, 1.95, 1.129, 1.142 ,1.155 ,1.211, 1.213, 1.215 2.3, 2.13, 2.71, 2.97, 2.101, 2.126, 2.185 4.11, 4.17, 4.26, 4.53, 4.55, 4.56, 4.59, 4.62, 4.72 , 4.77, 4.92 5.15, 5.26, 5.45, 5.61, 5.68, 5.70, 5.72 6.15, 6.17, 6.20, 6.25, 6.27, 6.28, 6.32, 6.34, 6.35, 6.40, 6.41, 6.57 , 6.109, 6.118, 6.143, 6.159, 6.168, 6.169, 6.176, 6.225, 6.226, 6.228, 6.229, 6.239, 6.242, 6.244, 6.248, 6.250, 6.251, 6.259, 6.264, 6.265, 6.272, 6.279, 6.283, 6.284, 6.286, 6.289, 6.290 7.1, 7.2, 7.4, 7.5, 7.10, 7.11, 7.13, 7.14, 7.15, 7.17, 7.18, 7.24, 7.25, 7.26, 7.33, 7.34, 7.39, 7.46, 7.49, 7.56, 7.61, 7.66, 7.73, 7.75, 7.112, 7.113, 7.116, 7.126, 7.130, 7.131, 7.132, 7.134, 7.145, 7.151, 7.160, 7.163, 7.169, 7.185, 7.197
+1	1.6, 1.7, 1.12 , 1.14 , 1.15, 1.17, 118, 1.21, 1.23, 1.24, 1.28, 1.31, 1.32, 1.37, 1.38, 1.45, 1.47, 1.48, 1.52, 1.56, 1.57, 1.59, 1.63, 1.64 , 1.86, 1.141, 1.152, 1.186, 1.187, 1.188, 1.206, 1.209, 1.212, 1.216, 1.214 2.12 , 2.14, 2.18, 2.24, 2.25, 2.27, 2.29, 2.30, 2.40, 2.48, 2.49 2.65, 2.69 , 2.84, 2.118, 2.119, 2.121, 2.125, 2.132, 2.135, 2.139, 2.164, 2.165, 2.166, 2.169, 2.183, 2.184, 2.188, 2.190 4.1, 4.5, 4.6, 4.14, 4.37, 4.41, 4.60, 4.61, 4.66, 4.68, 4.69, 4.70, 4.71, 4.73, 4.76, 4.86, 4.87, 4.89, 4.90, 4.91, 4.94, 4.97, 4.99, 4.101 , 4.102, 4.103, 4.104 5.16, 5.17, 5.18, 5.20 , 5.21, 5.26, 5.28 , 5.31 , 5.29, 5.37, 5.38 , 5.48, 5.48, 5.50, 5.51, 5.54, 5.66, 5.73, 5.80 6.1, 6.6, 6.8, 6.9, 6.14 , 6.16 , 6.18, 6.21, 6.23 , 6.29, 6.31, 6.33, 6.36, 6.37, 6.38, 6.39, 6.42 , 6.43, 6.50, 6.51, 6.52, 6.55, 6.56, 6.64, 6.66, 6.70 , 6.81, 6.87, 6.88, 6.89, 6.115, 6.120 , 6.131, 6.134, 6.140, 6.148, 6.149, 6.152 , 6.153, 6.157, 6.160, 6.162, 6.163, 6.164, 6.166, 6.167, 6.170, 6.171, 6.174, 6.178 , 6.182, 6.183, 6.184, 6.189, 6.190, 6.192, 6.193, 6.19, 6.196, 6.201, 6.203, 6.204 , 6.205, 6.206, 6.208, 6.211, 6.212, 6.213, 6.214, 6.215, 6.216, 6.217, 6.218, 6.219, 6.220, 6.221, 6.222, 6.223, 6.224, 6.230, 6.232, 6.233, 6.234, 6.235, 6.236, 6.237 , 6.238, 6.240, 6.241, 6.243, 6.245, 6.247, 6.252, 6.253, 6.254, 6.255, 6.256, 6.257 , 6.261, 6.262, 6.268, 6.269, 6.271, 6.272, 6.275, 6.276, 6.277, 6.280, 6.281, 6.291 , 6.295, 6.296, 6.297, 6.300, 6.303, 6.304, 6.305 7.6, 7.8, 7.9, 7.12, 7.16, 7.20, 7.21, 7.22, 7.35, 7.36, 7.37, 7.38, 7.40, 7.42, 7.50, 7.51, 7.53, 7.54, 7.55, 7.57, 7.59, 7.62, 7.63, 7.64, 7.65, 7.67, 7.68, 7.69, 7.71, 7.74 , 7.77, 7.78, 7.80, 7.81, 7.82, 7.83, 7.84, 7.85, 7.90, 7.91, 7.93, 7.97, 7.9, 7.99, 7.100 , 7.101, 7.102, 7.104, 7.108, 7.110, 7.111, 7.124, 7.127, 7.128, 7.129, 7.133, 7.136, 7.137, 7.140, 7.141, 7.150, 7.154, 7.157, 7.158, 7.161, 7.164, 7.168, 7.172, 7.173, 7.181 , 7.182, 7.183, 7.184, 7.187, 7.188, 7.190, 7.191, 7.193, 7.194, 7.195, 7.198, 7.203, 7.204, 7.205

0	1.26, 1.58, 1.67, 1.81, 1.82, 1.83, 1.87, 1.90, 1.93, 1.96, 1.101, 1.109 , 1.111, 1.113, 1.127, 1.135, 1.136, 1.138, 1.143, 1.149, 1.154, 1.157, 1.158, 1.163 , 1.172, 1.175, 1.176, 1.178, 1.190, 1.193, 1.200, 1.211, 1.204, 1.207, 1.208 2.2, 2.4, 2.5, 2.6, 2.16, 2.19, 2.23, 2.26, 2.33, 2.34 , 2.36, 2.41, 2.44 , 2.52 , 2.53, 2.57, 2.61, 2.67, 2.73, 2.78, 2.81, 2.86, 2.92 ,2.96 2.100, 2.102, 2.103, 2.106, 2.111, 2.112, 2.124, 2.130, 2.141, 2.143, 2.146, 2.154 , 2.156, 2.157, 2.158, 2.163, 2.173, 2.176, 2.178, 2.179, 2.189 4.2, 4.3, 4.4, 4.8, 4.9, 4.10, 4.12 , 4.13, 4.15, 4.16, 4.18, 4.20, 4.31, 4.39, 4.44 , 4.52, 4.57, 4.64, 4.67, 4.74, 4.75, 4.78, 4.79, 4.80, 4.82, 4.83 , 4.85, 4.88, 4.96 5.12, 5.13, 5.20, 5.24, 5.53, 5.57, 5.60 6.4,6.5,6.10,6.11,6.12,6.13,6.58,6.59,6.60,6.61,6.67,6.68, 6.69,6.71,6.72 ,6.73,6.74,6.77,6.78,6.79,6.80,6.82,6.83,6.84 6.86,6.90 ,6.91,6.92 ,6.93 ,6.94 ,6.95,6.96,6.97,6.98,6.99,6.100, 6.101, 6.103, 6.104 , 6.105, 6.106 , 6.107, 6.108, 6.110, 6.111, 6.112, 6.113, 6.114, 6.116, 6.117, 6.119, 6.121, 6.122, 6.124, 6.125, 6.126, 6.127, 6.128, 6.129, 6.130, 6.132, 6.133, 6.136, 6.144, 6.145, 6.146, 6.147, 6.150, 6.151, 6.154, 6.155, 6.161, 6.173, 6.175, 6.177, 6.185, 6.186, 6.202, 6.209, 6.210, 6.227, 6.246, 6.260, 6.274 , 6.278, 6.292, 6.294, 6.299, 6.301, 6.302 7.41, 7.43, 7.45, 7.47, 7.48, 7.52 7.58, 7.70, 7.72, 7.76, 7.79, 7.86, 7.87, 7.88, 7.89, 7.92, 7.95, 7.96, 7.103, 7.105, 7.106, 7.107, 7.109, 7.114, 7.115, 7.125, 7.148, 7.152 7.156, 7.159, 7.165, 7.166, 7.167, 7.170, 7.171, 7.174, 7.175, 7.177, 7.179 7.180, 7.186, 7.189, 7.192, 7.196, 7.199, 7.200, 7.201

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการเกิด clear zone โดยแบ่งเป็นระดับขั้น

+4 ยับยั้งได้ดีมาก	clear zone กว้างมากแม้บ่มหลายวัน clear zone ก็ยังมีอยู่
+3 ยับยั้งได้ดี	clear zone กว้างแม้บ่มหลายวัน clear zone ก็ยังมีอยู่
+2 ยับยั้งได้	clear zone แคบแม้บ่มหลายวัน clear zone ก็ยังมีอยู่
+1 ยับยั้งได้	clear zone เห็นในวันแรกๆ แต่บ่มหลายวันเส้นใยก็คลุมข้ามหรือ ลอดผ่าน clear zone ได้หรือ เส้นใยประชิดแบคทีเรียแต่ไม่สามารถข้ามผ่านไปแม้บ่มหลายวัน
0	ไม่มีผลในการยับยั้ง

ตารางที่ 4 ปฏิกิริยาปฏิปักษ์ของ *Bacillus spp.* จากตัวอย่างดินต่อการเจริญของเส้นใยรา *P. digitatum*

ระดับการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง)	จำนวน *Bacillus* spp.	% ของ 785 โคโลนีที่ทำการทดสอบ
+4 (80-100%)	24	3.05
+3 (61-80%)	56	7.13
+2 (41-60%)	130	16.56
+1 (21-40%0	320	40.76
0 (0-20%)	253	32.23

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต่อการเจริญของรา *P. digitatum* บนจานอาหาร PDA

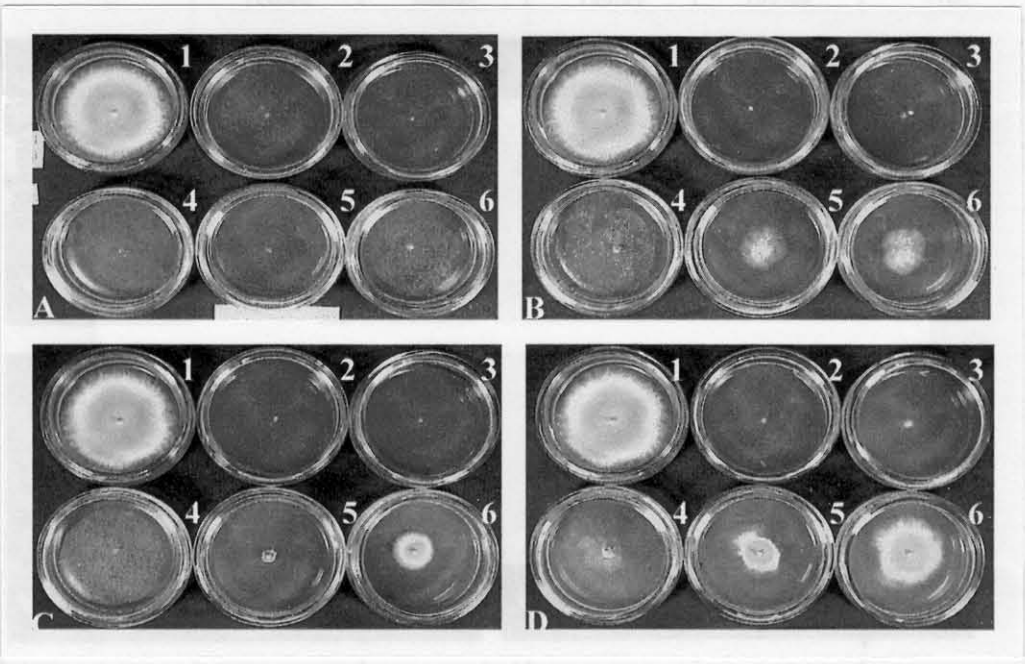
Bacillus spp. Strains	% inhibition (level)	*Bacillus* spp. Strains	% inhibition (level)	*Bacillus* spp. strains	% inhibition (level)
1.8	**91.97(4)**	**ABS-S11**	**89.55(4)**	7.3	71.39 (3)
1.50	**79.75(4)**	**ABS-S08a**	**81.22(4)**	7.7	67.27 (3)
1.61	**92.16(4)**	**ABS-S15**	**89.55(4)**	7.19	73.82 (3)
3.69	**89.76(4)**	**ABS-S12**	**82.64(4)**	7.23	68.85 (3)
3.79	**91.40(4)**	**ABS-S13**	**89.76(4)**	7.94	62.82 (3)
4.19	**91.59(4)**	**ABS-S16**	**89.11(4)**	7.117	65.73 (3)
4.33	**89.76(4)**	**ABS-S19**	**93.24(4)**	**7.121**	**82.48 (4)**
4.34	**91.00(4)**	**ABS-S01**	**90.00(4)**	7.122	69.62 (3)
4.35	**88.89(4)**	**ABS-S02**	**97.22(4)**	7.135	66.20 (3)
4.49	**88.89(4)**	**ABS-S03**	**94.71(4)**	7.138	66.20 (3)
4.51	**92.53(4)**	**ABS-S17**	**93.92(4)**	7.139	63.44 (3)
4.63	**90.60(4)**	**ABS-S04**	**91.78(4)**	7.142	70.01 (3)
4.100	**92.16(4)**	**ABS-S05**	**75.33(4)**	7.143	66.87 (3)
5.11	**91.64(4)**	**ABS-S06**	**93.07(4)**	7.144	68.53 (3)
5.30	**90.80(4)**	**ABS-S10**	**94.71(4)**	7.146	78.52 (3)
5.35	**93.24(4)**	**ABS-S09**	**88.21(4)**	7.147	79.54 (3)
5.41	**91.00(4)**	**ABS-S18**	**93.24(4)**	7.149	68.43 (3)
6.198	**91.20(4)**	**ABS-S07**	**79.45(4)**	7.153	74.77 (3)
6.199	**92.89(4)**	**ABS-S08b**	**94.56(4)**	**7.155**	**81.57 (4)**
6.282	**92.35(4)**	**ABS-S14**	**93.75(4)**	7.162	75.00 (3)
7.176	71.21 (3)	7.178	68.53 (3)	7.202	82.44 (4)

3. กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

3.1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB แบบขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วันมาเจือจางให้เป็นหลายความเข้มข้น นำมาผสมกับอาหาร PDA อัตราส่วน 1:1 จำนวน 3 ซ้ำ แล้วนึ่งใช้ความดันไอน้ำนาน 10 นาที ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

P. digitatum บนจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 24 °ซ เป็นเวลา 4 วัน พบว่าสามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพความเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ของ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ได้ชัดเจนยิ่งขึ้นดังรูปที่ 5 และตารางที่ 6 เมื่อเจือจางน้ำเลี้ยงเชื้อมากขึ้นตั้งแต่ 1:8 ถึง 1:32 โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 7.155 (รูปที่ 5A) และ 7.202 สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* ได้ดี คือเมื่อเจือจางจนมีระดับความเข้มข้นที่ 1:32 หรือ 3.12% (v/v) ยังคงยับยั้งได้สูงถึง 99.95% ขณะที่กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งได้สูงมี 33 สายพันธุ์



รูปที่ 5 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. อายุ 3 วันที่ผสมกับอาหาร PDA

(A-D) แบคทีเรียสายพันธุ์ 7.155, 7.122, 7.153 และ 7.142 ตามลำดับ, (1) = จานควบคุม, (2)-(6) = ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum*

Bacillus spp. strain	% inhibition of serial dilution culture filtrates of *Bacillus* spp.					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
ABS-S01	**91.11**	**95.31**	**100.00**	**100.00**	**ND**	**ND**
ABS-S02	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**ND**	**ND**
ABS-S03	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**ND**	**ND**
ABS-S04	100.00	100.00	100.00	73.31	ND	ND
ABS-S05	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**ND**	**ND**
ABS-S06	100.00	100.00	84.53	53.76	ND	ND
ABS-S07	99.19	85.05	74.67	67.51	ND	ND

ABS-S08	100.00	100.00	100.00	100.00	ND	ND
ABS-S09	86.80	65.19	51.00	48.16	ND	ND
ABS-S10	97.33	99.31	92.16	64.00	ND	ND
ABS-S11	100.00	100.00	100.00	100.00	98.13	96.13
ABS-S12	100.00	100.00	99.98	99.51	91.59	70.48
ABS-S13	100.00	100.00	100.00	100.00	ND	ND
ABS-S14	ND	100.00	100.00	100.00	100.00	98.72
ABS-S15	100.00	100.00	100.00	99.98	ND	ND
1.64	ND	100.00	100.00	100.00	99.98	99.00
1.35	ND	100.00	100.00	99.98	99.78	99.56
3.126	ND	100.00	100.00	100.00	100.00	99.89
4.24	ND	100.00	100.00	100.00	99.72	99.68
1.61	ND	100.00	99.13	95.16	83.46	77.60
3.79	ND	100.00	100.00	100.00	100.00	99.96
4.34	ND	100.00	100.00	100.00	99.75	99.07
4.51	ND	100.00	100.00	99.68	94.08	84.79
4.63	ND	100.00	100.00	100.00	99.96	98.79
4.100	ND	100.00	100.00	100.00	99.25	95.31
5.30	ND	99.68	97.85	94.71	67.13	51.00
5.35	ND	98.72	99.00	95.31	71.91	51.93
5.41	ND	100.00	100.00	100.00	99.36	99.95
6.198	ND	100.00	100.00	100.00	100.00	98.72
6.199	ND	100.00	100.00	100.00	97.44	24.89
6.282	ND	100.00	99.68	99.00	91.20	70.12
7.3	100.00	99.95	96.69	77.22	43.75	ND
7.7	97.86	91.43	49.97	35.22	18.56	ND
7.19	99.75	99.00	98.44	81.94	31.94	ND
7.23	91.65	71.56	52.54	36.00	22.90	ND
7.94	58.22	42.83	18.56	18.56	9.52	ND
7.117	97.86	80.73	56.63	35.22	22.90	ND

7.121	100.00	100.00	100.00	100.00	94.02	ND
7.122	100.00	99.95	98.77	84.00	84.00	ND
7.135	71.56	46.22	28.69	20.99	22.90	ND
7.138	49.97	22.90	14.10	4.820	4.82	ND
7.139	56.63	31.23	4.82	4.82	4.82	ND
7.142	100.00	99.80	80.25	71.56	46.22	ND
7.143	99.46	96.19	76.20	49.97	9.52	ND
7.144	99.80	98.77	82.17	71.56	42.91	ND
7.146	100.00	100.00	100.00	100.00	90.32	ND
7.147	100.00	100.00	100.00	99.95	90.32	ND
7.149	94.02	78.22	61.28	39.51	22.90	ND
7.153	100.00	100.00	100.00	98.22	85.73	ND
7.155	100.00	100.00	100.00	100.00	99.95	ND
7.162	100.00	100.00	100.00	99.80	92.89	ND
7.176	100.00	100.00	100.00	98.22	84.00	ND
7.178	99.95	99.00	97.75	87.75	51.00	ND
7.202	100.00	100.00	100.00	100.00	99.95	ND

3.2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* โดยสารระเหยผลิตจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งในระดับ 3 และ 4 ได้จากตารางที่ 5 แล้วทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ และเกลี่ยบนอาหาร PDA เพาะเลี้ยง 0-1 วันนำเฉพาะด้านก้นจานมาประกบกับจานอาหาร PDA ที่เพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. digitatum* มาก่อน 1-2 วันโดยวางจานอาหารที่มีเชื้อราให้อยู่ด้านบนพันปิดขอบจานเลี้ยงเชื้อทั้งสองด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (sealed-plate method) นำไปบ่มและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราเมื่อเชื้อราเจริญเกือบเต็มจานอาหารในวันที่ 4 (ตารางที่ 7) พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีเมื่อแบคทีเรียอายุ 1 วัน เชื้อรา อายุ 1 วัน (ตารางที่ 8) *Bacillus* spp. หลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* ในระดับ 2 ได้สูงสุดที่ระดับ 3 มีเพียง 4 สายพันธุ์ การสังเกตลักษณะของเชื้อราพบว่าสารระเหยที่แบคทีเรียผลิตนั้นมีผลยับยั้งระดับการสร้างสปอร์ของเชื้อราอีกด้วยดังรูปที่ 6 และเมื่อเจาะขอบเส้นใยเชื้อรามาเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA ใหม่พบว่าเชื้อรา *P. digitatum* มีการเจริญตามปกติแสดงว่าสารระเหยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพียงชั่วคราวเท่านั้น

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารระเหยจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต่อเชื้อรา *P. digitatum* บนจานอาหาร PDA ประกบกันที่อายุต่างกัน

	% ยับยั้ง	ระดับยับยั้ง
แบคทีเรียอายุ 0 วัน เชื้อรา อายุ 1 วัน	4.61	1
แบคทีเรียอายุ 0 วัน เชื้อรา อายุ 2 วัน	2.65	1
แบคทีเรียอายุ 1 วัน เชื้อรา อายุ 1 วัน	92.00	4
แบคทีเรียอายุ 1 วัน เชื้อรา อายุ 2 วัน	18.10	1

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารระเหยจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต่อการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* บนจานอาหาร PDA ประกบกัน

Bacillus spp. Strains	% inhibition (level)	*Bacillus* spp. strains	% inhibition (level)	*Bacillus* spp. strains	% inhibition (level)
3.69	5.91(0)	7.7	32.48 (1)	7.143	53.46 (2)
4.34	5.26(0)	7.19	52.93 (2)	7.144	56.58 (2)
4.35	0.00(0)	7.23	28.60 (1)	**7.146**	**66.65 (3)**
4.49	44.25(2)	7.94	23.95 (1)	**7.147**	**63.91 (3)**
4.51	74.67(3)	7.117	52.93 (2)	7.149	39.31 (1)
4.63	1.99(0)	7.121	32.29 (1)	7.153	28.60 (1)
4.100	21.38(1)	**7.122**	**76.15 (3)**	7.155	51.33 (2)
5.30	30.00(1)	7.131	21.22 (1)	7.162	53.46 (2)
5.41	14.13(0)	7.135	45.37 (2)	7.176	55.56 (2)
6.198	28.32(1)	7.138	33.12 (1)	7.178	40.51 (2)
6.199	47.20 (2)	7.139	20.53 (1)	7.202	42.82 (2)
7.3	45.19 (2)	7.142	19.84 (0)		

หมายเหตุ การจัดระดับการยับยั้งตามเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (0-20), (21-40), (41-60), (61-80) และ (81-100) = 0, 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

4. สารปฏิชีวนะจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus spp.*

4.1 การเตรียมสารปฏิชีวนะแบบสกัดหยาบ

คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp 20 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* ได้ดีมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาปั่นแยกเซลล์ออก นำส่วนใสที่ได้มาสกัดสารปฏิชีวนะตามวิธีการของ McKeen และคณะ(1986)

ทำให้แห้งพบว่าสารปฏิชีวนะมีน้ำหนักดังตารางที่ 9 มีลักษณะแห้งหนืด สีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลแดง จากนั้นละลายด้วยเอทธานอล 80% ได้สารสกัดหยาบ เก็บไว้ที่ 4° ซ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งจากตารางที่ 9 แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถผลิตสารสกัดหยาบได้ในช่วง 150-1,302 มิลลิกรัม.

ตารางที่ 9 ปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB 1 ลิตร

Bacillus spp. strain	crude extracts (mg)
1.35	534.9
3.126	357.3
4.34	1,229.9
3.79	1,302.3
5.41	725.3
7.155	197.8
7.202	209
7.121	142.9
7.162	321
7.146	167.8
7.147	168.5
7.153	259.2
7.176	363.2
7.122	150.6

4.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. digitatum* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50})

หาค่า EC_{50} จากการผสมสารปฏิชีวนะที่สกัดทำได้โดยเจือจางอย่างมีลำดับ 6 ค่า กับอาหาร PDA ทดสอบการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *P. digitatum* บนสไลด์หลุมที่มีสารสกัดหยาบผสมกับ PDA ที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างละ 8 ซ้ำ นาน 48 ชั่วโมงแล้ววัดความกว้างของโคโลนีราด้วยกล้องสเตอริโอซูม หาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น 1000-15.63 µg/ml ด้วยวิธีการคำนวณจากสูตรของ Gamliel และคณะ (1989) โดยมีโคโลนีราที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นชุดควบคุม (ตารางที่ 10) และคำนวณค่า EC_{50} โดยสมการเส้นตรงที่ได้มีค่า R^2 มากกว่า 0.80 จึงเชื่อถือได้ดังตารางที่ 11 แบคทีเรีย *Bacillus* spp. 7 สายพันธุ์มีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 77-172 µg/ml สายพันธุ์ 7.155 มีค่า EC_{50} ต่ำที่สุด คือ 77 µg/ml รองลงมาคือสายพันธุ์ 7.202 มีค่า EC_{50} ที่ 116 µg/ml

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดหยาบจาก *Bacillus* spp ต่อการเจริญเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum*

Concentration (µg/ml) / *Bacillus* spp. strain	% inhibition of *P. digitatum* growth						
	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63
1.35	97.80	77.01	54.65	41.48	18.17	2.61	ND
3.126	100	86.99	74.65	52.43	38.48	20.68	ND
3.79	89.27	69.84	48.05	30.67	20.23	12.28	ND
4.34	68.10	52.11	35.77	19.98	9.83	2.46	ND
5.41	72.37	63.43	49.88	36.36	7.95	2.13	ND
7.155	100.00	96.97	92.27	88.55	48.98	30.02	20.65
7.202	100.00	97.27	86.06	62.50	42.35	19.45	ND
7.121	100.00	98.19	86.29	58.42	32.05	10.37	ND
7.162	97.30	92.08	79.67	52.43	31.80	11.23	ND
7.146	96.39	88.75	67.82	42.98	20.30	9.65	ND
7.1.47	93.93	88.29	65.45	39.84	12.23	7.76	ND
7.153	94.62	81.40	57.58	32.55	12.16	2.53	ND
7.176	95.30	82.08	63.95	36.41	15.55	3.31	ND
7.122	96.52	83.46	62.60	35.78	15.26	1.75	ND
1.35	97.80	77.01	54.65	41.48	18.17	2.61	ND
3.126	100	86.99	74.65	52.43	38.48	20.68	ND
3.79	89.27	69.84	48.05	30.67	20.23	12.28	ND
4.34	68.10	52.11	35.77	19.98	9.83	2.46	ND
5.41	72.37	63.43	49.88	36.36	7.95	2.13	ND
ABS-S03	100	93.06	66.06	42.24	28.88	10.67	ND
ABS-S04	60.08	50.99	41.85	23.83	16.20	10.65	ND
ABS-S05	69.50	52.67	45.16	33.66	29.91	17.89	ND
ABS-S07	88.17	76.02	60.97	46.83	36.07	24.70	ND
ABS-S08	76.71	52.08	43.89	35.73	27.14	20.95	ND
ABS-S10	55.46	46.52	36.07	21.58	17.89	15.81	ND

ABS-S12	83.01	54.8	44.31	34.7	17.5	13.85	ND
ABS-S14	95.48	86.3	70.56	57.81	36.0	15.53	ND

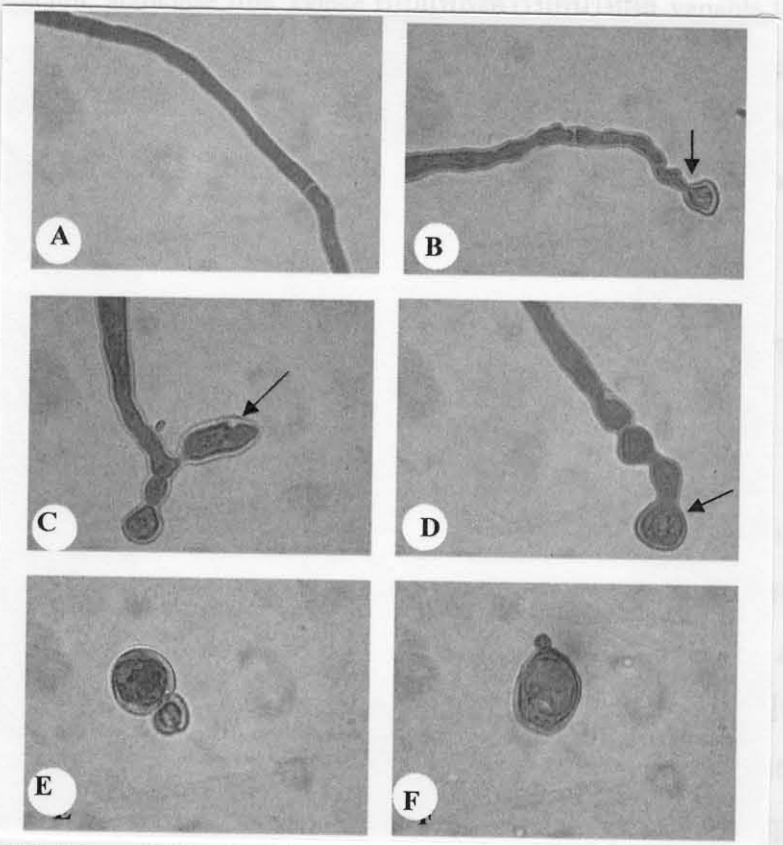
ND= not determined

ตารางที่ 11 EC_{50} ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacilus* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใย รา *P. digitatum*

***Bacillus* spp. Strains**	**EC_{50} (µg/ml)**	**Regression equation**	**R^2**
1.35	344	y =882.8x + 19.653	0.84
3.126	**157**	y =1295.4x +2 9.547	0.85
3.79	392	y =771.14x + 19.752	0.91
4.34	615	y =647.98x + 10.113	0.89
5.41	320	y =378.88x + 37.753	0.86
7.121	**153**	y = 0.1722x + 23.708	0.81
7.122	255	y = 0.1675x + 7.3210	0.91
7.146	219	y = 0.1638x + 14.156	0.91
7.147	236	y = 0.1728x + 9.2255	0.91
7.153	274	y = 0.1646x + 5.3489	0.93
7.155	**77**	y = 0.3107x + 25.994	0.81
7.162	**172**	y = 0.1588x + 22.670	0.83
7.176	254	y = 0.1628x + 8.7244	0.89
7.202	**116**	y = 0.1488x + 32.705	0.80
ABS-S03	**130**	y=1440.7x + 29.993	0.97
ABS-S04	657	y =488.42x + 17.907	0.82
ABS-S05	510	y =467.63x + 26.121	0.90
ABS-S07	236	y =598.47x + 35.823	0.84
ABS-S08	465	y =529.48 x + 25.377	0.96
ABS-S10	755	y =416.45x + 18.557	0.88
ABS-S12	457	y =668.41x + 19.429	0.93
ABS-S14	**169**	y =1319.9x + 27.662	0.81

4.3 ลักษณะรูปร่างของสปอร์และเส้นใยรา และค่า EC_{50} ของสารสกัดหยาบต่อการงอกของสปอร์รา *P. digitatum*

ค่า EC_{50} ของ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 7.155 ต่อการงอกของสปอร์ที่ความเข้มข้น $5_{x}10^{5}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารสกัดหยาบเดียวกัน แต่ผสมกับ 1.5% water agar แทนอาหาร PDA เพื่อลดปัจจัยที่เร่งการเจริญของสปอร์ บ่มที่ 24 °ซ นาน 18 ชั่วโมง แล้วนับการงอกและวัดความยาวของ germ tube ของสปอร์รา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ หาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับหลุมควบคุม และคำนวณค่า EC_{50} โดยที่ชุดควบคุมพบว่าสปอร์มีเปอร์เซ็นต์การงอกมากกว่าหรือเท่ากับ 80% เพื่อให้การทดสอบมีความแม่นยำและเชื่อถือได้ ได้ค่า EC_{50} = 82 µg/ml โดยมีสมการการถดถอย (y = 0.2885x+26.313) มีค่า R^2 = 0.7988 สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 500 µg/ml สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อตรวจดูลักษณะสปอร์ที่อยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างๆกันพบว่า ที่ความเข้มข้น 15.62-62.5 µg/ml สปอร์มีผนังเซลล์บวม โดยเฉพาะบริเวณปลาย germ tube (ดังลูกศรในรูปที่ 6B-6C) ที่ความเข้มข้น125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร germ tube สามารถงอกยาวได้ แต่พบการโป่งพองและคอดเข้า และเมื่อดูลักษณะของสปอร์รูป 6E และ 6F มีความเข้มข้น 250 และ 500 µg/ml ตามลำดับ สปอร์มีลักษณะบวมใหญ่ มีการงอกน้อยมาก ในชุดควบคุม germ tube มีความยาว 0.96±0.15 มิลลิเมตร (รูปที่ 6A) ขณะที่ชุดทดสอบที่ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ 62.5 µg/ml พบว่า germ tube มีความยาว 0.12±0.03 มิลลิเมตร (รูปที่ 6C) ซึ่งมีความแตกต่างถึง 10 เท่า



รูปที่ 6 การงอกของสปอร์เชื้อรา *P. digitatum* ในภาวะปกติและในสารสกัดหยาบจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ 7.155 เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศนแบบเลนส์ประกอบกำลังขยาย 400 เท่า

: A = สายใยราปกติอายุ 18 ชั่วโมง, B-F = เส้นใยราที่งอกบน 1.5 % water agar ที่ผสมสารสกัดหยาบความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500 (µg/ml) ตามลำดับ

5 การจำแนกสปีชีส์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ด้วยวิธีจุลชีววิทยาและชีวเคมี

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ ABS-S03, ABS-S07, ABS-S14, 7.3, 7.19, 7.121, 7.122, 7.142, 7.144, 7.146, 7.147, 7.153, 7.155, 7.162, 7.176, 7.178 และ 7.202 เมื่อนำมาจำแนกสปีชีย์ของ *Bacillus* โดยการศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยา (Gram staining, Capsule staining ด้วยสีนิโกซิน และการเจริญในอาหารที่มี 7.5% NaCl) และทางชีวเคมี (Motility test, Oxidation–Fermentation (OF) glucose test, Gelatin liquefaction test, Simmons' Citrate test, Voges-Proskauer test (VP test), Urease test, Indole test, Starch hydrolysis test และ การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น glucose, mannitol, arabinose และ xylose ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้ผลดังตารางที่ 12 คือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งดีเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Endospore Froming Gram-Positive Rods โดยจัดจำแนกสปีชีย์ใช้วิธีตาม Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 (Krieg and Holt, 1984) แบคทีเรียปฏิปักษ์ ABS-S03, ABS-S07, ABS-S14, 7.19, 7.121, 7.162, 7.153, 7.155, 7.176 และ 7.178 สามารถบ่งชนิดได้ว่าเป็น *B. subtilis* เนื่องจากผลของ Gram-stain, Gelatin liquefaction test, Simmons' Citrate test, VP test, Urease test และ Starch hydrolysis test เป็นบวก นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ 7.3, 7.142, 7.144 และ 7.202 สามารถบ่งชนิดได้ว่าเป็น *B. megaterium* เนื่องจากผลการทดสอบ VP ให้ผลลบ การใช้ Urea และการใช้น้ำตาล mannitol, arabinose และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนให้ผล variable แบคทีเรียปฏิปักษ์ 7.122 และ 7.147 สามารถบ่งชนิดได้ว่าเป็น *B. pumilus* เนื่องจากผล Urease test และ Starch hydrolysis test ให้ผลลบ และ แบคทีเรียปฏิปักษ์ 7.146 สามารถบ่งชนิดได้ว่าเป็น *B. anthracis* เนื่องจากผลการทดสอบผลการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ให้ผลเป็นลบ ซึ่งต่างจาก *B. subtilis* และ *Bacillus* ตัวอื่นๆที่สามารถเคลื่อนที่ได้

6. สารปฏิชีวนะในสารสกัดหยาบของ *B. subtilis* แยกด้วย TLC และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum*

6.1. การแยกสารปฏิชีวนะจากสารสกัดหยาบโดยวิธี Thin Layer Chromatography

การแยกสารปฏิชีวนะจากสารสกัดหยาบโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) สารปฏิชีวนะที่แยกจากแผ่น Preparative TLC (PTLC) ขนาด 20×20 เซนติเมตร โดยใช้สารละลายเคลื่อนที่ $CHCl_3$:MeOH:H_2O (65:25:4, v/v) เมื่อทดสอบประเภทของสารที่แยกด้วยด้วยการพ่นน้ำ *B. subtilis* ABS-S14, *B. subtilis* 7.155 พบแถบสาร 7 และ 4 แถบตามลำดับและเมื่อนำไปส่องด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เห็นแถบสาร 3-4 แถบ ดังรูปที่ 7 แบ่งซิลิกาเจลจาก PTLC ตั้งแต่จุดที่หยดสารจนถึงจุดที่ตัวสารละลายเคลื่อนที่ไปเป็นแถบๆละ 1 เซนติเมตรได้ 17-18 แถบ ชะสารออกจากซิลิกาเจลด้วยเอธานอล 80% ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *P. digitatum* บนจานอาหาร PDA ดังรูปที่ 8 ทั้ง *B. subtilis* ABS-S14 และ *B. subtilis* 7.155พบว่าแถบที่ 3, 4, 5 มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราได้ดีสูงสุด(ระดับ +3) ใกล้เคียงกันรองลงมา คือ แถบที่ 11 (R_f = 0.58) ยับยั้งได้

ในระดับ (+2) ขณะที่แถบที่ 9 (R_f = 0.48) ของ *B. subtilis* 7.155 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เพียงเล็กน้อยในระดับ (+1) เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของแถบที่มีฤทธิ์ยับยั้งกับวงที่มองเห็นได้ด้วยการพ่นน้ำ และส่องด้วยแสง UV พบว่าตำแหน่งของแถบที่ 3, 4, และ 5 พบเป็นกลุ่มสารที่สามารถละลายน้ำและไวต่อแสง UV เช่นเดียวกับแถบที่ 9 แต่แถบที่ 11 ของ *B. subtilis* 7.155 ซึ่งมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ปานกลางไม่ตรงกับวงใดของสารที่ตรวจพบด้วยสมบัติการละลายน้ำ และการดูดกลืนแสง UV ดังรูปที่ 7 และ 8

6.2 EC_{50} ของสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* สายพันธุ์ 7.155 ที่แยกจาก PTLC ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum*

เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยสารปฏิชีวนะที่แยกได้จาก PTLC แถบต่างๆ แสดงในตารางที่ 13 สารจากแถบ 3, 9 และ 11 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลงเมื่อเจือจางมากขึ้นถึง 31.25 µg/ml (16.04 - 20.05 %) แต่สารในแถบที่ 4 และ 5 ยังคงแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูง คือ 78.34 และ 79.94% ตามลำดับ และเมื่อเจือจางต่อไปที่ความเข้มข้น 3.90 µg/ml ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ 13.52 และ 25.93% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจากค่า EC_{50} จากตารางที่ 14 พบว่าสารในแถบที่ 3, 9 และ 11 มีค่าเป็น 95.73, 108.59 และ 100.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนสารในแถบที่ 4 และ 5 สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าแถบอื่นๆ โดยมีค่า EC_{50}ใกล้เคียงกัน คือ 14.07 และ 15.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนอกจากนี้ปริมาณสารสกัดหยาบ (% yield) จาก PTLC ทั้งห้าแถบนี้อยู่ในช่วง 3.6-6.1%

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

No.	Gram stain	Capsule	Motile	OF-G	Indole	Gelatin	Citrate	VP	Urea	Glucose	Arabinose	Manitol	Xylose	NaCl A.	Starch A.
B. subtilis	+	-	+	-/+(O)	-	+	+	+	+	A	A	A	A	+	+
ABS-S03	+	-	+	+/+F/O	-	+	+	+	+	A	A	A	AG	+	+
ABS-S07	+	-	+	+/+F/O	-	+	+	+	+	A	A	A	AG	+	+
ABS-S14	+	-	+	+/+F/O	-	+	+	+	+	A	A	A	AG	+	+
7.19	+	-	+	+/+F/O	-	+	+	+	+	A	A	A	AG	+	+
7.121	+	-	+	-/+(O)	-	+	+	+	+	A	A	A	AG	+	+
7.153	+	-	+	-/+(O)	-	+	+	+	+	AG	A	A	AG	+	+
7.155	+	-	+	-/+(O)	-	+	+	+	+	AG	A-	A-	A	+	+
7.162	+	-	+	-/+(O)	-	+	+	+	+	A	A	A	A	+	+
7.176	+	-	+	-/+(O)	-	+	+	+	+	A	A	AG	AG	+	+
7.178	+	-	+	b/+(O)	-	+	+	+	+	AG	A	A	AG	+	+
B. megaterium	+	NR	+[3,4]	O	-	+[5]	+	-	V	A	V[6]	V[6]	V[6]	+	+
7.3	+	-	+	+/+F/O	-	+	+	-	+	A	-	A-	A	+	+
7.142	+	-	+	+/+F/O	-	+	+	-	-	AG	A	A	A-	+	+
7.144	+	-	+	+/+F/O	-	+	+	-	-	A	A-	A	A-	+	+
B. pumilus	+	-	+	O	-	+	+	+	-	A	A	A	A	+	-
7.147	+	-	+	b/+(O)	-	+	+	+	-	A	A-	A	A-	+	-
7.122	+	-	+	b/+(O)	-	+	+	+	+	A	A	A	A	+	-
B. sonbrucki	+	+	-	F	-	+[4]	V	+	-	A	-	-	-	+	+[7]
7.146	+	-	-	b/+(O)	-	+	+	+	+	A	A-	A	A-	+	+

B. subtilis ABS-S14

PTLC (A)

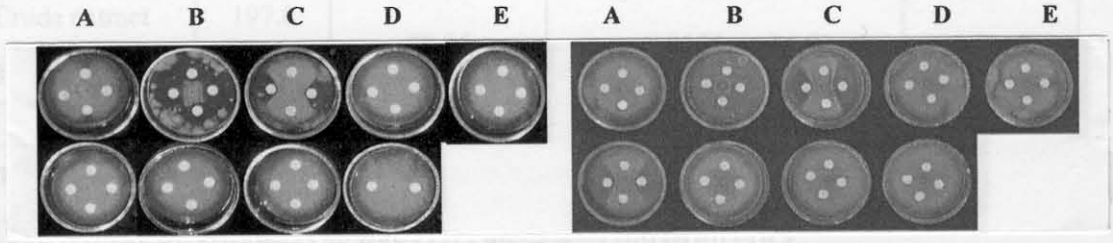
Band No.	Relative mobility (R_f)	Inhibition of *P. digitatum*
17	0.97	
16	0.91	
15	0.85	
14	0.79	
13	0.74	
12	0.68	
11	0.62	
10	0.56	
9	0.50	
8	0.44	
7	0.38	
6	0.32	
5	**0.26**	+++
4	**0.20**	+++
3	**0.15**	+++
2	**0.09**	+
1	0.03	

B. subtilis 7.155

PTLC (B)

Band No.	Relatative mobility (R_f)	Inhibition of *P. digitatum*
18	0.97	-
17	0.92	-
16	0.86	-
15	0.81	-
14	0.75	-
13	0.69	-
12	0.64	-
11	**0.58**	++
10	0.53	-
9	**0.49**	+
8	0.42	-
7	0.36	-
6	0.31	-
5	**0.28**	+++
4	**0.19**	+++
3	**0.14**	+++
2	0.08	-
1	0.03	-

รูปที่7 การแยกของสารสกัดหยาบของ บนแผ่น PTLC ($CHCl_3$:MeOH:H_2O = 65:25:4) วงทึบ พ่นด้วยน้ำกลั่น, วงประ ส่องด้วยแสง UV (A= *B. subtilis* ABS-S14, B=*B. subtilis* 7.155)



***B. subtilis* ABS-S14** ***B. subtilis* 7.155 (B)**

รูปที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราของ *P. digitatum* โดยสารสกัดของ *B. subtilis* สายพันธุ์ ABS-S14 (A) และ 7.155 (B) ที่แยกโดย TLC บนจานอาหาร PDA

แถบ (A=1, 2) (B=3, 4) (C-5, 6) (D=7, 8) (E=9, 10) (F=11, 12) (G=13, 14) (H=15, 16) (I=17 *B. subtilis* ABS-S14), (I=17, 18 *B. subtilis* 7.155)

ตารางที่ 13 ฤทธิ์ยับยั้งของสารปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ 7.155 แยกด้วย PTLC ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* บนจานอาหาร PDA

Crude extract (µg/ml) / PTLC Band No.	% growth inhibition of *P. digitatum*								
	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.90	1.95
3	86.19	76.02	59.07	44.74	20.05	11.38	-	-	-
4	100	100	100	92.40	78.34	61.18	30.57	13.52	-
5	**100**	**100**	**100**	**92.69**	**79.94**	**58.09**	**36.04**	**25.93**	**17.85**
9	81.57	67.17	54.89	34.81	19.33	7.44	-	-	-
11	90.91	76.59	61.12	34.30	16.04	0.96	-	-	-

ตารางที่ 14 EC_{50} ของสารปฏิชีวนะจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ 7.155 แยกด้วย PTLC ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum*

Band No.(R_f)	% yield	EC_{50} (µg/ml)	Regression equation	R^2
3 (0.14)	3.6	95.73	y = 0.436x + 8.2636	0.9201
4 (0.19)	**5.6**	**14.07**	**y = 0.998x + 35.955**	**0.8149**
5 (0.28)	**4.29**	**15.19**	**y = 2.0885x + 18.281**	**0.966**
9 (0.49)	6.12	108.59	y = 0.4178x + 4636	0.9707
11 (0.58)	5.3	100.00	y = 0.529x - 2.8898	0.9768
Crude extract *B. subtilis* 155	197.8 mg	77.26	y = 0.3107x + 25.994	0.8065

7. ความรุนแรงของเชื้อรา (*P. digitatum*) โรคผลเน่าบนผลส้ม

7.1 วิธีการทดสอบความรุนแรงของเชื้อรา (*P. digitatum*) เบื้องต้นครั้งที่ 1

ชุดทดสอบที่ 1: ปลูกเชื้อด้วยเส้นใยรา

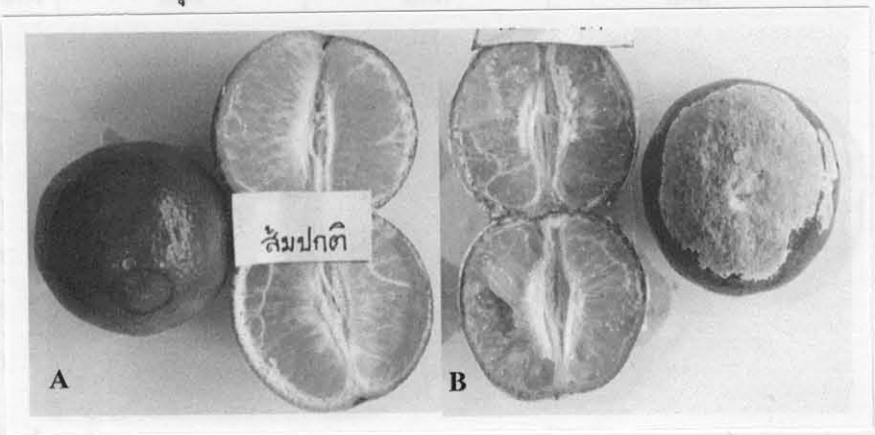
วันที่ 5 อ่านผล ปรากฏว่าส้มผลที่หยดน้ำลงไป (ชุดควบคุม) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะใดๆ ส่วนส้มที่หยดเชื้อลงไปปรากฏว่ามีเชื้อราสีเขียวขอบขาวๆขึ้นบนเปลือกผลส้มโดยรอบบริเวณที่เจาะ ซึ่งกินพื้นที่กว้างไปเกือบครึ่งผลส้มเกิดการเน่าอย่างชัดเจน เก็บเชื้อราบนเปลือกส้มมาเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA และบันทึกภาพผลการทดลองในชุดที่ 1 เก็บไว้

ชุดทดสอบที่ 2: ปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีดสารแขวนลอยสปอร์รา

อ่านผลในวันที่ 4 ปรากฏว่าผลส้มชุดควบคุมซึ่งฉีดน้ำกลั่นเข้าไปมีลักษณะปกติ ส่วนผลส้มที่ฉีดสารแขวนลอยสปอร์ราเข้าไปนั้นส้มทั้งชุดพบว่าเน่าทั้งผล และมีลักษณะของสายราขึ้นโดยรอบทั้งหมด ส้มแสดงอาการเน่าอย่างรุนแรง เมื่อแกะผลส้มเพื่อดูภายใน ปรากฏว่าเนื้อส้มเน่าทั้งหมด มีอาการเปื่อยยุ่ย และมีสายราขึ้นเต็มทั้งผล เก็บเชื้อราจากส้มลงเลี้ยงบนจานอาหาร PDA และบันทึกภาพไว้ (รูปที่ 9)

ชุดทดสอบที่ 3: ปลูกเชื้อด้วยวิธีการพ่นสารแขวนลอยสปอร์รา

อ่านผลในวันที่ 4 ปรากฏว่าผลส้มชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำยังคงปกติ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนชุดทดสอบที่ได้รับการฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยสปอร์ราปรากฏว่าผลส้มมีการเน่าและมีเส้นใยของเชื้อรา *P. digitatum* ขึ้นอยู่รอบผล มีการสร้างสปอร์ราสีเขียว เป็นจุด ๆ บนเปลือกส้ม ชุดส้มที่ได้รับการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ราเน่าทุกผล



รูปที่ 9 ผลส้มชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำ (A) และผลส้มที่ปลูกเชื้อรา (*P. digitatum*) (B)

7.2. วิธีการทดสอบความรุนแรงของเชื้อรา (*P. digitatum*) เบื้องต้นครั้งที่ 2

จากการทดลองดังกล่าวทุกรูปแบบของการทดลองทำให้ส้มเกิดอาการติดเชื้อได้ทุกรูปแบบแต่ความรุนแรงของแต่ละวิธีแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน (ตารางที่ 15) ยกเว้นวิธีการกลั้วสปอร์บนผิวส้มที่ไม่พบอาการติดเชื้อ แต่ผิวส้มที่มีบาดแผลหรือเป็นรอยอาจทำให้ส้มติดเชื้อได้ง่ายขึ้น วิธีการยัดเส้นใยราและการฉีดสารแขวนลอยสปอร์ราที่ความเข้มข้นเหมาะสมจะทำให้ผิวส้มเกิดอาการเน่าอย่างรุนแรงได้มากกว่าการเจาะและหยดสปอร์ภายนอกผล (รูปที่ 10) โดยเฉพาะในส้มโชกุน สังเกตความแตกต่างของอาการติดเชื้อในส้มเขียวหวานอาการเน่าจะไม่รุนแรงเหมือนกับส้มโชกุนเพราะผิวของส้มเขียวหวานไม่เกิดอาการนิ่มเหมือนกับส้มโชกุนแต่จะแห้งและเป็นรอยไหม้สีน้ำตาลแผ่วงกว้างออกไปเรื่อยๆ ผิวของส้มโชกุนง่ายต่อการถูกทำลายมากกว่าผิวส้มเขียวหวาน (ตารางที่ 16) อาจจะเพราะว่ามีความหนาของผิวที่หนากว่าและมีความชื้นมากกว่าจึงทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีกว่า

โดยสรุป เชื้อ *P. digitatum* สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบมีความรุนแรงสูง

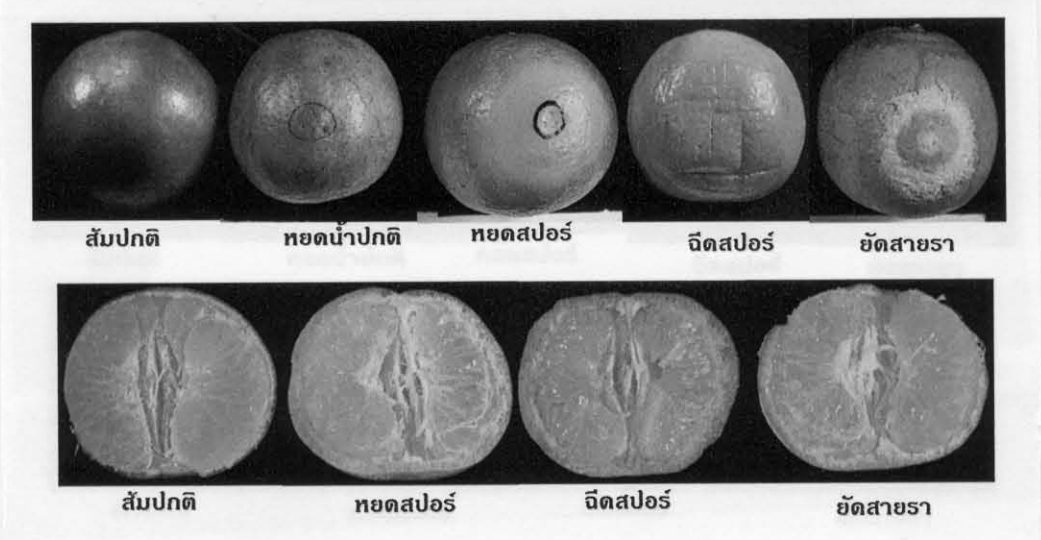
ตารางที่ 15 ความแตกต่างระหว่างการติดเชื้อ *P. digitatum* ของผลส้มโชกุนและส้มเขียวหวาน

จำนวนวันทดสอบ	รูปแบบการทดลอง	ส้มโชกุน		ส้มเขียวหวาน	
		ผลที่1	ผลที่2	ผลที่1	ผลที่2
วันที่ 1	แบบที่1	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ปกติ
	แบบที่2	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ปกติ
	แบบที่3	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ปกติ
	แบบที่4	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ปกติ
	แบบที่5	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ปกติ
วันที่ 2	แบบที่1	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ปกติ
	แบบที่2	ปกติ	ปกติ	ช้ำรอบแผล	ช้ำรอบแผล
	แบบที่3	ช้ำรอบแผล	ช้ำรอบแผล	ช้ำรอบแผล	ช้ำรอบแผล
	แบบที่4	ช้ำรอบแผล	ช้ำรอบแผล	ช้ำรอบแผล	ช้ำรอบแผล
	แบบที่5	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ปกติ
	แบบที่3	ช้ำรอบแผลขยายวงกว้างมากขึ้น	ช้ำรอบแผลมากกว่าแบบที่1 เริ่มเน่ามีรา	ช้ำรอบแผล	ช้ำรอบแผล
	แบบที่4	ช้ำรอบแผลขยายวงกว้างมากขึ้น	ช้ำรอบแผลมากกว่าเริ่มเน่ามีรา	ช้ำรอบแผล	ช้ำรอบแผล
	แบบที่5	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ปกติ
วันที่ 3	แบบที่1	รอยช้ำของการเน่าวงกว้าง 1 ซม.	รอยช้ำของการเน่ามีสายราเล็กน้อย.	รอยช้ำของการเน่าวงกว้างประมาณ 1 ซม.	รอยช้ำของการเน่าเห็นชัดเจนวงกว้าง 1 ซม.
	แบบที่2	รอยเน่าสีน้ำตาลไหม้รอบบาดแผล	รอยเน่าสีน้ำตาลไหม้รอบบาดแผล	รอยเน่าสีน้ำตาลไหม้รอบบาดแผล	รอยเน่าสีน้ำตาลไหม้รอบบาดแผล
	แบบที่3	เส้นใยราขึ้นเกือบครึ่งผลส้มเน่ารุนแรง	เส้นใยราขึ้นเกือบครึ่งผลส้มเน่ารุนแรง	เส้นใยราขึ้นเกือบครึ่งผลส้มเน่าอย่างรุนแรง	เส้นใยราขึ้นเห็นชัดเจนมากส้มมีอาการเน่า
	แบบที่4	ส้มเน่านิ่มทั้งผล	ส้ส้มเน่านิ่มทั้งผล	ส้มเน่าเป็นรอยไหม้สีน้ำตาลแต่ไม่นิ่มเหมือนโชกุน	ส้มเน่าเป็นรอยไหม้สีน้ำตาลแต่ไม่นิ่มเหมือนโชกุน
	แบบที่5	ปกติ	ปกติ	ปกติ	ปกติ

ชุดควบคุม ส้มโชกุน ส้มเขียวหวาน ปกติ

ตารางที่ 16 สรุปความแตกต่างของการติดเชื้อ *P. digitatum* ของผลส้มโชกุนและส้มเขียวหวาน

แบบที่	ส้มโชกุน	ส้มเขียวหวาน
1	เป็นแผลช้ำเกิดอาการเน่ารอบๆ บาดแผลเห็นชัดเจนเป็นวงกว้างประมาณ 1 ซม. ลักษณะชุ่มน้ำ	เป็นแผลแห้งๆ ไม่ชุ่มน้ำเหมือนโชกุนผิวแห้งติดผลส้มเป็นสีน้ำตาลไหม้ขนาดเล็กกว่า 1 ซม. บริเวณรอบบาดแผล
2	เป็นแผลช้ำชัดเจนกว่าแบบที่ 1 มีอาการเน่าของผิวส้มชัดเจนมีน้ำไหลเยิ้มออกมาจากแผลและเริ่มมีเส้นใยรางอกออกมา	เป็นรอยแผลไหม้สีน้ำตาลแห้งๆ ผิวส้มแห้งติดผลไม่แสดงอาการเน่าหรือมีน้ำไหลออกมาแต่พบบาดแผลแห้งๆ ขยายวงกว้าง 1 ซม.
3	เกิดเชื้อราและสปอร์ราปกคลุมผิวส้มประมาณ 1/2ผล และส้มมีอาการเน่าอย่างรุนแรงเนื้อในถูกทำลายมีน้ำไหลเยิ้มออกมาจากบาดแผล	เป็นรอยแผลแห้งๆ สีน้ำตาลไหม้แผ่บริเวณกว้างประมาณ 2 ซม. ไม่พบเส้นใยราไม่มีอาการเน่าอย่างรุนแรงเหมือนส้มโชกุน
4	เน่าอย่างรุนแรงทั้งผล ส้มนิ่มและน้ำไหลออกมาจากผลส้มจำนวนมาก	ผิวส้มเน่าเฉพาะบริเวณที่ฉีดแต่ไม่เน่ารุนแรงหมดทั้งผลเหมือนส้มโชกุน
5	ปกติ	ปกติ

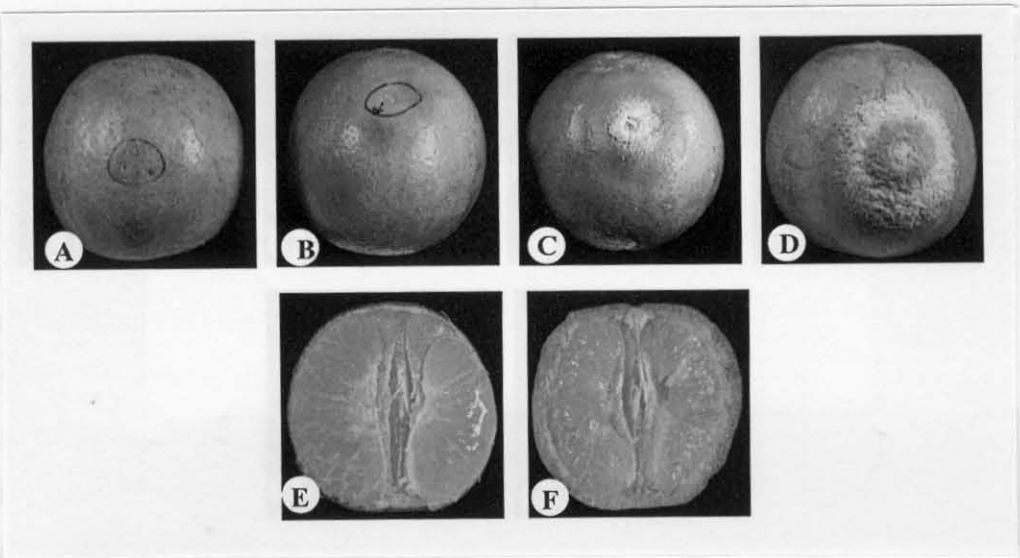


รูปที่ 10 อาการติดเชื้อของผลส้มที่เกิดขึ้นในทุกรูปแบบของการทดลองและผลส้มชุดควบคุม

7.3 ความรุนแรงของปริมาณเชื้อ *P. digitatum* ในการเกิดโรคเน่าบนผลส้มเขียวหวาน

เนื่องจากเชื้อรา *P. digitatum* สามารถก่อให้โรคเน่าบนผลส้มได้โดยผ่านทางบาดแผลจึงใช้เข็มปลอดเชื้อเจาะผลส้มเพื่อเชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ และนำผลส้มมาทดสอบเพื่อหาความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อราบนผลส้ม โดยใช้สปอร์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นในช่วง 10^2-10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนแผลที่เจาะบริเวณผิวส้มจำนวน 10 ผล แล้วบ่มในภาชนะที่มีความชื้นสูง ที่ความ

เข้มข้น 10^2-10^3 สปอร์ต่อมิลลิลิตรมีปริมาณสปอร์ 2-20 สปอร์ต่อแผล อาการของโรคบนผลส้มเกิดขึ้นน้อย ไม่สม่ำเสมอโดยเริ่มเกิดโรคไม่พร้อมกัน และผลส้มมีขนาดแผลที่แตกต่างกันมาก เมื่อใช้สารแขวนลอยสปอร์ที่ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร 20 ไมโครลิตร (200 สปอร์ต่อแผล) โรคเกิดบนผลส้มทุกผลอย่างสม่ำเสมอทั้งหมด (รูปที่ 11) โดยผลส้มเริ่มเกิดอาการช้ำ สีน้ำตาลภายในวันที่ 3-4 จากนั้นแผลช้ำขยายวงกว้างเพิ่มขึ้น ในวันที่ 4-5 สังเกตเห็นใยราขาวจากบริเวณที่ช้ำ และหลังจากนั้นมีสปอร์สีเขียวและเส้นใยราปกคลุมทั้งผล (ดังรูปที่ 11B-D) เมื่อแกะผลส้มของชุดควบคุมมีลักษณะภายในเป็นถุงน้ำแต่งตึง มีสภาพสดอยู่ได้นานถึง 5 วัน ในผลส้มที่ปลูกเชื้อนาน 5 วัน พบว่าถุงน้ำถูกทำลาย เปื่อยยุ่ยมีอาการเน่า (ดังรูปที่ 11F) และที่ความเข้มข้นสปอร์ 10^5-10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร 20 ไมโครลิตร (2×10^3-2×10^4สปอร์ต่อแผล) พบอาการแสดงของโรคเกิดขึ้นอย่างรุนแรงและเน่าอย่างรวดเร็วภายในระยะเพียง 3-4 วัน



รูปที่ 11 อาการโรคผลเน่าเชื้อราบนผลส้มที่หยดด้วยสปอร์ *P. digitatum*
(A): ชุดควบคุมซึ่งหยอดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ, (B-D): ผลส้มที่หยดสปอร์บนแผลนาน 3-5 วันตามลำดับ (E) และ (F): ผลส้มที่แกะออกจากชุดควบคุมและจากส้มติดเชื้อนาน 3 วันตามลำดับ

8. ประสิทธิภาพของเซลล์ *B. subtilis* และสารสกัดหยาบต่อการควบคุมอาการแสดงออกของโรคผลเน่าราสีเขียว

8.1. การทดสอบเบื้องต้นประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *P. digitatum* ของ *B. subtilis* ABS-S14บนผลส้มเขียวหวาน

ใช้สารสกัดหยาบของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ABS-S14 (1 และ 10 mg/ml) สารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรีย (10^8 CFU/ml) และ imazalil (100 ppm) เพื่อควบคุมการเกิดโรคเน่าราสีเขียวของผลส้มในกรรมวิธีต่างๆ ดังตารางที่ 17 ซึ่งแบ่งเป็น 3 ชุดการทดสอบ (1) ใส่เชื้อราให้เจริญก่อน 24 ชั่วโมง แล้วตามด้วยสารและตัวเซลล์แบคทีเรีย (2) ใส่สารและตัวเซลล์พร้อมกับเชื้อรา (3) ใส่สารและตัวเซลล์ 24 ชั่วโมง ก่อนปลูกเชื้อรา พบว่าผลส้มเริ่มเกิดแผลในวันที่ 3 และเน่าภายในวันที่ 5 เมื่อใส่สปอร์เชื้อรา *P. digitatum* (ตารางที่ 18) ที่ความเข้มข้น 10^4 spore/ml บนผลส้ม 24 ชั่วโมงก่อนใส่สารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรีย, สารสกัดหยาบ (1และ 10 mg/ml) และ imazalil (100 ppm) โรคเกิดสูงสุด ยกเว้นเมื่อใช้สารสกัดหยาบ 10 mg/ml สำหรับ

สารสกัดหยาบ 1 mg/ml ควบคุมโรคบนผลส้มได้ต่ำสุด ขณะที่สารสกัดหยาบ 10 mg/ml เมื่อใส่ผสมพร้อมกับสปอร์ราและสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียก่อนหยดสปอร์รา 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพควบคุมการเกิดโรคได้สูงสุด ขนาดแผลที่พบในวันที่ 8 เป็น 0 และ 0.48 cm. โดยพบว่าการเน่าสอดคล้องกับการเกิดแผล ส่วน imazalil (100 ppm) ใส่พร้อมกับเชื้อราควบคุมการเกิดโรคได้ดีกว่าการใส่ imazalil ก่อนและหลังใส่เชื้อรา (รูปที่ 16)

ตารางที่ 17 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแผลบนผลส้มและเปอร์เซ็นต์อาการแสดงของเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้มในวันที่ 8

Treatment	% Diseases incidence	Average Diameter of wound[#] (cm)
T_1: สารสกัดหยาบ (1 mg/ml) ก่อน 24 ชั่วโมง	65	3.75[e]
T_2: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) ก่อน 24 ชั่วโมง	40	2.07[cd]
T_3: เซลล์ *B. subtilis* ก่อน 24 ชั่วโมง	10	0.48[a]
T_4: imazalil (100 ppm) ก่อน 24 ชั่วโมง	35	1.98[c]
T_5: สารสกัดหยาบ (1 mg/ml) พร้อมเชื้อรา	75	4.12[ef]
T_6: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) พร้อมเชื้อรา	0	0.00[a]
T_7:เซลล์ *B. subtilis* พร้อมเชื้อรา	25	1.30[b]
T8: imazalil (100 ppm) พร้อมเชื้อรา	5	0.30[a]
T9: สารสกัดหยาบ (1 mg/ml) หลัง 24 ชั่วโมง	75	4.43[f]
T10: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) หลัง 24 ชั่วโมง	45	2.53[d]
T11: เซลล์ *B. subtilis* หลัง 24 ชั่วโมง	65	3.73[e]
T12: imazalil (100 ppm) หลัง 24 ชั่วโมง	65	2.25[cd]
T13: ชุดควบคุม (ราอย่างเดียว)	95	6.55[g]

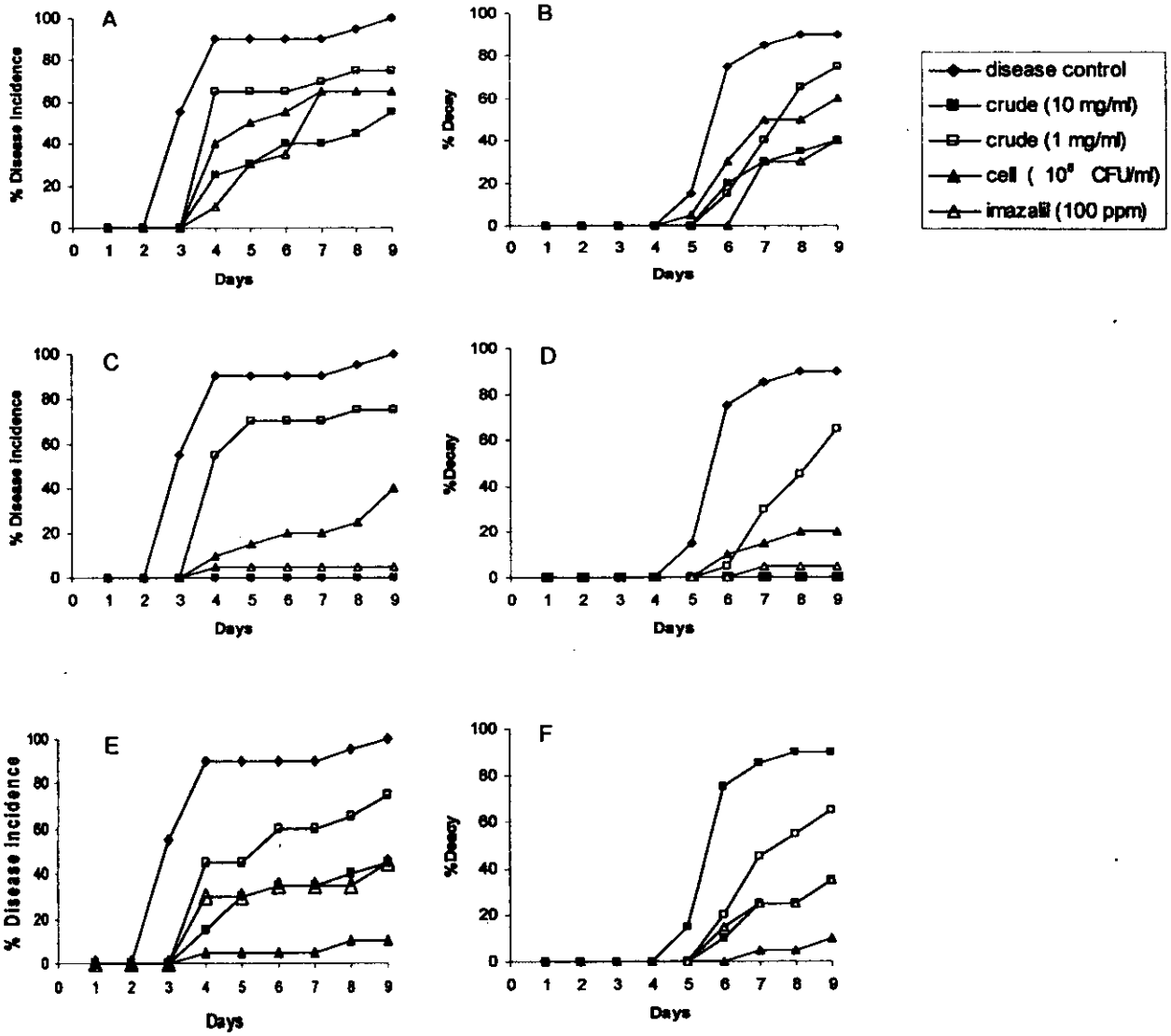
ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรร่วมกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ($P = 0.05$, C.V. = 13.38%) *B. subtilis* ABS-S14

8.2 ประสิทธิภาพของสารแขวนลอยเอนโดสปอร์ *B. subtilis* ABS-S14 และสารสกัดหยาบต่อการควบคุมอาการแสดงออกของโรคผลเน่าราสีเขียว

8.2.1 ประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้มเขียวหวาน

ทดสอบเพื่อยืนยันผลการทดลอง โดยออกแบบชุดการทดสอบแบ่งเป็น 2 ชุด (1) ใส่สารและตัวเซลล์ *B. subtilis* ABS-S14 พร้อมกับเชื้อรา (2) ใส่สารและตัวเซลล์ *B. subtilis* ABS-S14 24 ชั่วโมง ก่อนปลูกเชื้อราเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ DMRT เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลที่เกิดบนผลส้มในวันที่ 8 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 18) พบว่ากรรมวิธีที่ใส่เอนโดสปอร์แบคทีเรียก่อนเชื้อรา 24 ชั่วโมง ควบคุมการเกิดโรคได้ดีที่สุด ซึ่งผลส้มไม่เกิดแผล สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) ใส่พร้อมกับเชื้อราควบคุมโรคได้ดี (รูปที่ 12) โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์อาการแสดงของโรค และเปอร์เซ็นต์การ

เน่า ส่วนกรรมวิธีที่ใส่ imazalil (100 ppm) ควบคุมอาการแสดงของโรคได้ต่ำ อาจเนื่องมาจาก imazalil ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้เตรียมไว้นานแล้วทำให้สารมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราได้น้อยลง



รูปที่ 12 ประสิทธิภาพการควบคุมอาการแสดงของโรคเน่าเชื้อรา *P. digitatum* ในกรรมวิธีต่างๆ

A, D: ใส่เชื้อราก่อนเซลล์ *B. subtilis* หรือสารนาน 24 ชั่วโมง

B, E: ใส่เซลล์ *B. subtilis* หรือสารและเชื้อราพร้อมกัน

C, F: ใส่เชื้อราหลังเซลล์ *B. subtilis* หรือสาร 24 ชั่วโมง

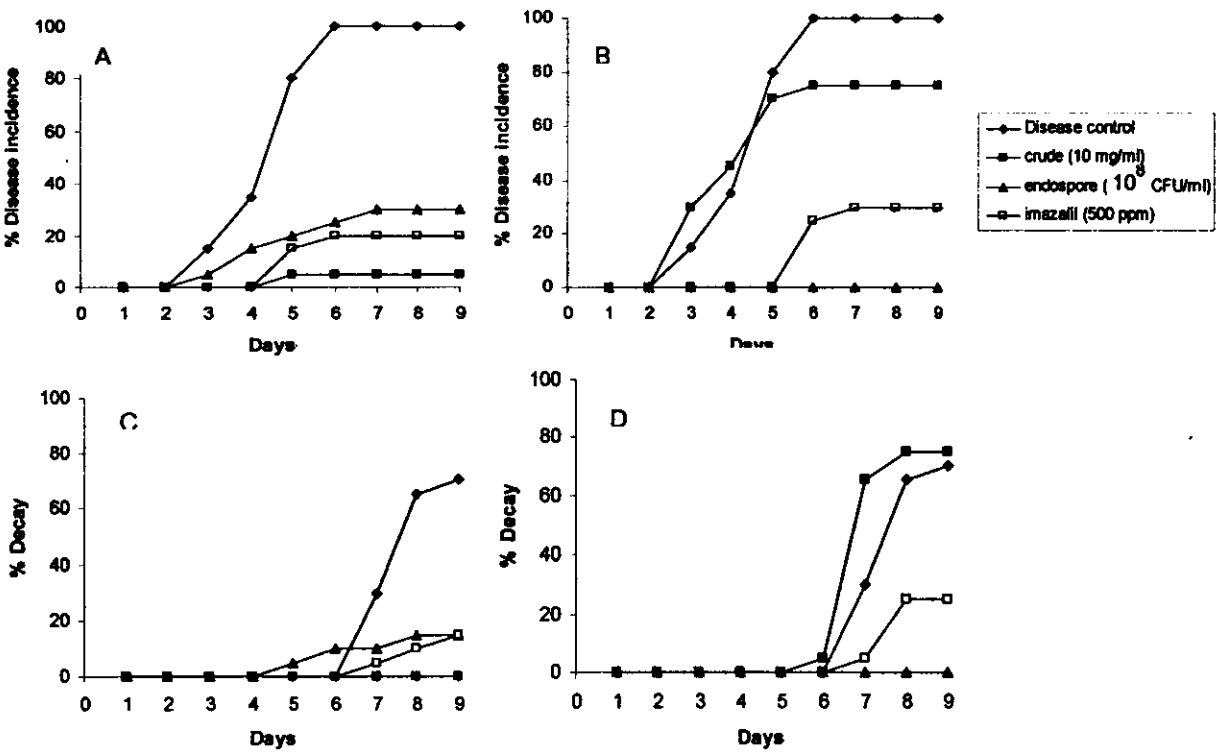
B. subtilis ABS-S14

ตารางที่ 18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแผลบนผลส้มและเปอร์เซ็นต์อาการแสดงโรคเน่าเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้มในวันที่ 8

Treatment	% Diseases incidence	Average Diameter of wound# (cm)
T_1: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) ก่อน 24 ชั่วโมง	75	3.86^{d}
T_2: เอนโดสปอร์ *B. subtilis* (10^8CFU/ml) ก่อน 24 ชั่วโมง	0	0.00^{a}
T_3: imazalil (500 ppm) ก่อน 24 ชั่วโมง	30	1.37^{c}
T_4: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) พร้อมเชื้อรา	5	0.24^{ab}
T_5: เอนโดสปอร์ *B. subtilis* (10^8CFU/ml) พร้อมเชื้อรา	30	1.24^{c}
T_6: imazalil (500 ppm) พร้อมเชื้อรา	20	0.81^{bc}
T_7: ชุดควบคุม (ราอย่างเดียว)	100	4.69^{e}

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรร่วมกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ($P = 0.05$ C.V. = 22.09%)

B. subtilis ABS-S14



รูปที่ 13 กราฟแสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *P. digitatum* บนผลส้มโดยกรรมวิธีต่างๆ

A, C: ใส่เซลล์หรือสารและเชื้อราพร้อมกัน B, D: ใส่เอนโดสปอร์ *B. subtilis* ABS-S14 หรือสารก่อนเชื้อรานาน 24 ชั่วโมง

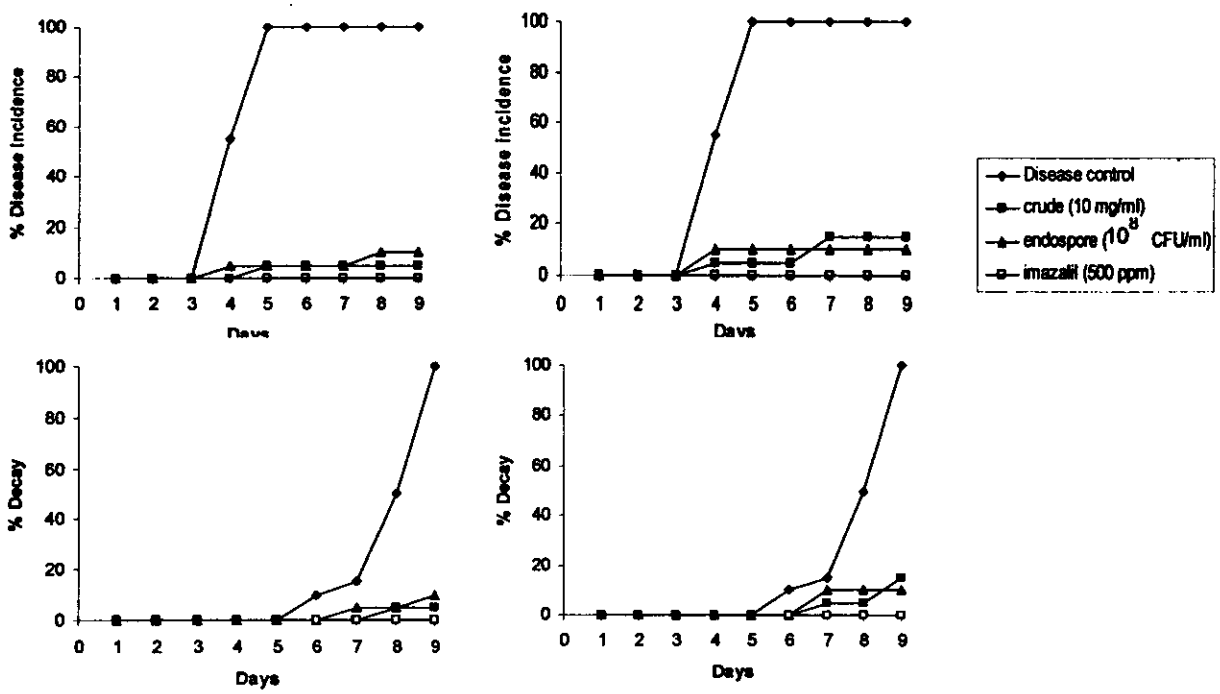
8.2.2. ประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้มโชกุน

กรรมวิธีที่ผสมเอนโดสปอร์ ABS-S14, สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) และ imazalil (500 ppm) กับสปอร์ราแล้วหยดลงบนบาดแผลผลส้ม พบว่าเอนโดสปอร์ ABS-S14, สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) และ imazalil (500 ppm) สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ดีที่สุดและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแผลกลุ่มเดียวกัน (ตารางที่19, รูปที่ 14)

ตารางที่ 19 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแผลบนผลส้มและเปอร์เซ็นต์อาการแสดงของเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้มในวันที่ 8

Treatment	% Diseases incidence	Average Diameter of wound[#] (cm)
T_1: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) ก่อน 24 ชั่วโมง	15	0.92[c]
T_2: เอนโดสปอร์ *B. subtilis* (10^8CFU/ml) ก่อน 24 ชั่วโมง	10	0.50[b]
T_3: imazalil (500 ppm) ก่อน 24 ชั่วโมง	0	0.00[a]
T_4: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) พร้อมเชื้อรา	5	0.00[a]
T_5: เอนโดสปอร์ *B. subtilis* (10^8CFU/ml) พร้อมเชื้อรา	10	0.39[ab]
T_6: imazalil (500 ppm) พร้อมเชื้อรา	0	0.00[a]
T_7: ชุดควบคุม (ราอย่างเดียว)	100	4.66[d]

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรร่วมกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ($P = 0.05$ C.V. = 29.71%) *B. subtilis* ABS-S14



รูปที่ 14 กราฟแสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *P. digitatum* บนผลส้มโดยกรรมวิธีต่าง

A, C: ใส่เซลล์ *B. subtilis* ABS-S14 หรือสารและเชื้อราพร้อมกัน

B, D: ใส่เอนโดสปอร์ *B. subtilis* ABS-S14 หรือสารก่อนเชื้อรานาน 24 ชั่วโมง

8.2.3 ประสิทธิภาพของปริมาณสารแขวนลอยเอนโดสปอร์ *B. subtilis* และ imazalil ต่อการควบคุมอาการแสดงของโรคบนผลส้ม

ทดสอบการเกิดโรคบนผลส้มโดยใช้เอนโดสปอร์ *B. subtilis* ABS-S14 (10^6 , 10^7 และ 10^8CFU/ml) และ imazalil (100, 250 และ 500 ppm) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมโรคที่ปลูกเชื้อราอย่างเดียว พบว่าเมื่อหยอดสารแขวนลอยสปอร์ราลงบนบาดแผลที่เจาะผลส้ม อาการเริ่มแรกของโรคเกิดขึ้นภายใน 3 วัน หลังปลูกเชื้อ โดยบริเวณบาดแผลเกิดรอยช้ำสีน้ำตาลและนิ่ม ต่อมาจะขยายรอยช้ำใหญ่ขึ้นในวันที่ 5 จะเห็นเส้นใยราสีขาว และพบสปอร์สีเขียว เกิดการเน่าทั้งผล ในการทดสอบจะวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบาดแผลเพื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ จากการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 20) พบว่าเมื่อใส่เอนโดสปอร์ *B. subtilis* ABS-S14 ความเข้มข้น $1x10^7$ และ $1x10^8$ CFU/ml ก่อนเชื้อรา 24 ชั่วโมง สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ดีพอกับ imazalil (250 และ 500 ppm) โดยมีเปอร์เซ็นต์อาการแสดงของโรค 10, 5, 7.5 และ 2.5 ตามลำดับ (รูปที่ 15)

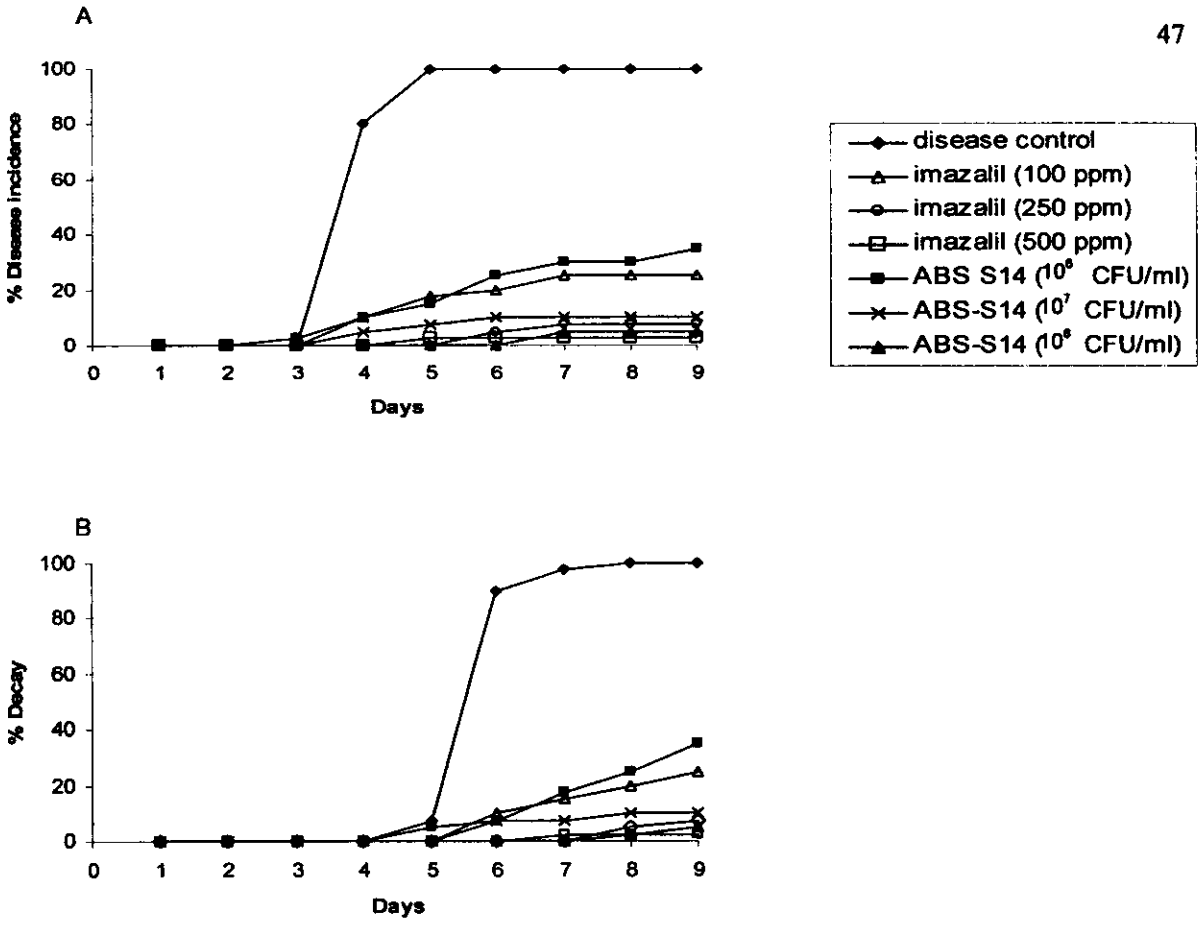
ตารางที่ 20 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแผลบนผลส้มและเปอร์เซ็นต์อาการแสดงของเชื้อรา *P. digitatum* บนผลส้มในวันที่ 8

Treatment	% Diseases incidence	Average Diameter of wound# (cm)
T_1: Imazalil (100 ppm)	25	1.32[b]
T_2: Imazalil (250 ppm)	7.5	0.37[a]
T_3: Imazalil (500 ppm)	2.5	0.14[a]
T_4: เอนโดสปอร์ *B. subtilis* ($1x10^6$ CFU/ml)	30	1.57[b]
T_5:เอนโดสปอร์ *B. subtilis* ($1x10^7$ CFU/ml)	10	0.54[a]
T_6: เอนโดสปอร์ *B. subtilis* ($1x10^8$CFU/ml)	5	0.22[a]
T_7: ชุดควบคุม (เชื้อราอย่างเดียว)	100	5.47[c]

หมายเหตุ : T_1- T_6 ลงสารก่อนเชื้อรา 24 ชั่วโมง

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรร่วมกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ($P = 0.05$ C.V. = 17.73%)

B. subtilis ABS-S14



รูปที่ 15 กราฟแสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *P. digitatum* บนผลส้มโดยกรรมวิธีต่างๆ

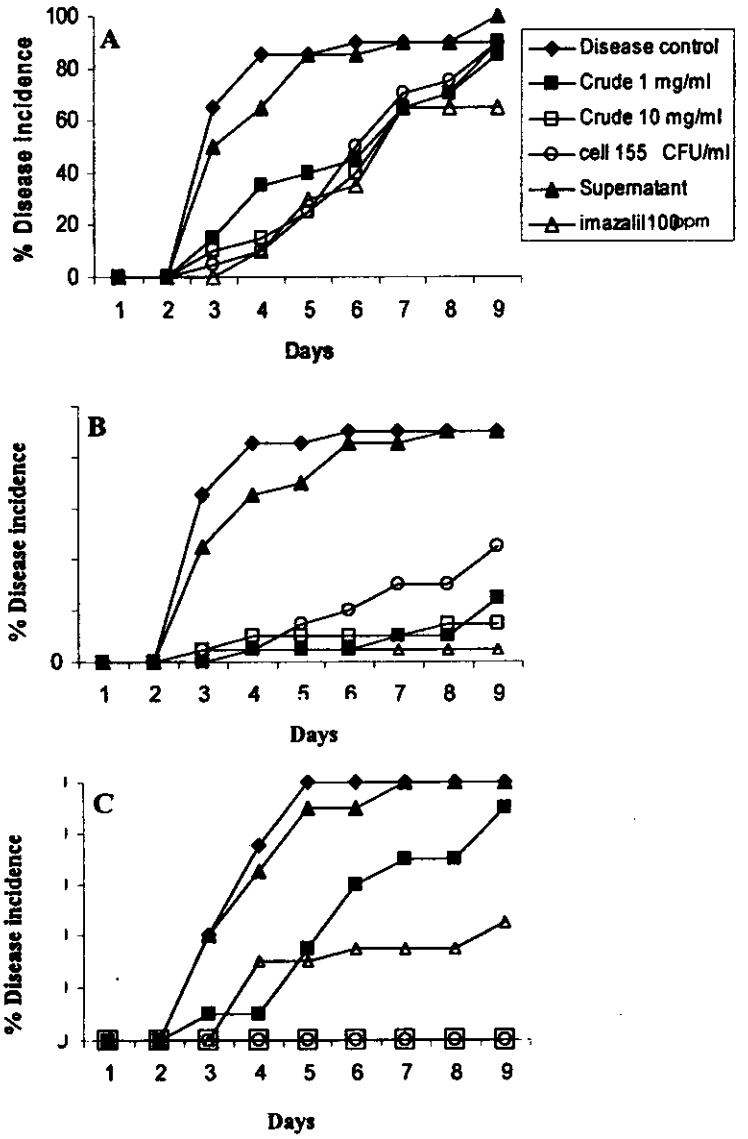
A: แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค, B: แสดงเปอร์เซ็นต์การเน่าจากเชื้อรา *P. digitatum* เมื่อใส่เอนโดสปอร์ (ABS-S14) และ imazalil ก่อน 24 ชม.

8.3. ประสิทธิภาพของเซลล์ *B. subtilis* 7.155 และสารสกัดหยาบต่อการควบคุมอาการแสดงออกของโรคผลเน่าราสีเขียว

8.3.1.การทดสอบเบื้องต้นประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *P. digitatum* ของ *B. subtilis* 7.155 บนผลส้มเขียวหวาน

พบว่าการใช้เซลล์แบคทีเรีย *B. subtilis* 7. 155 และสารสกัดหยาบ เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* เมื่อใส่สปอร์เชื้อรา *P. digitatum* ที่ความเข้มข้น 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตรบนผลส้มก่อน 24 ชั่วโมงนั้น แบคทีเรีย *B. subtilis* 7.155 น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดหยาบความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารเคมีกำจัดเชื้อราอิมาซาลิล 100 ppmไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ ทุกกรรมวิธีผลส้มเกิดโรคใกล้เคียงกับชุดควบคุม ในวันที่ 8 (65-90 %) การใช้น้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อควบคุมการเกิดโรคนั้น ทั้งในการใส่สปอร์เชื้อราพร้อมน้ำเลี้ยงเชื้อและใส่เชื้อราหลังน้ำเลี้ยงเชื้อไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคในวันที่ 8 ผลส้มเกิดโรคใกล้เคียงกับชุดควบคุม และการใช้สารสกัดหยาบความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามด้วยสปอร์เชื้อราภายหลัง 24 ชั่วโมง ในวันที่ 8 เกิดโรค 70% ส่วน *B. subtilis* 7.155 และ สารสกัดหยาบ

ความเข้มข้น 10 mg/ml เมื่อใส่เชื้อราพร้อมและใส่เชื้อราหลัง 24 ชั่วโมง สามารลดการเกิดโรคได้ดี คือ ในวันที่ 8 พบการเกิดโรค 0-25% (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 กราฟการยับยั้งการเจริญของ *P. digitatum* บนผลส้มเขียวหวานจำนวน 10 แผลโดยกรรมวิธีต่างๆ

A ใส่เชื้อราก่อนเซลล์หรือสารนาน 24 ชั่วโมง

B ใส่เซลล์หรือสารและเชื้อราพร้อมกัน

C ใส่เชื้อราหลังเซลล์หรือสาร 24 ชั่วโมง

8.3.2.ประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *P. digitatum* ของ *B. subtilis* 7.155 บนผลส้ม

ทดสอบการเกิดโรคบนผลส้มเป็นแบบบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCB) ทำแผลบนผลส้มโดยใช้เข็มเจาะลึกประมาณ 0.3 มิลลิเมตรเป็นวง 5 แผล ห่างกันแผลละ 2 มิลลิเมตร แต่ละกรรมวิธีใช้ผลส้ม 15 ผล จำนวน 4 ซ้ำวางบ่มไว้ในภาชนะที่มีฝาปิดและใส่ถ้วยพลาสติกบรรจุน้ำ 6 ถ้วยวางกระจายทั่วภาชนะ ให้ความชื้นเต็มที่ บ่มที่ 24 °ซ สังเกตและบันทึกการเกิดโรค และวัดขนาดแผล

ทุกวันนาน 9 วัน ในผลส้มเขียวหวาน และส้มโชกุน โดยในผลส้มโชกุนทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง พบว่าเมื่อหยอดเฉพาะสารแขวนลอยสปอร์ราลงบนแผลที่เจาะผลส้ม อาการเริ่มแรกของโรคเกิดขึ้นหลัง 2-3 วัน หลังจากปลูกเชื้อ บริเวณแผลเกิดการช้ำเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและนิ่ม วันที่ 3-4 ต่อมาบริเวณช้ำขยายใหญ่ขึ้น ในวันที่ 4-5 สังเกตเห็นใยราขาวในบริเวณที่ช้ำ และพบสปอร์สีเขียว เกิดการเน่าทั้งผล

8.3.2.1.ประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *P. digitatum* ของ *B. subtilis* 7.155 บนผลส้มเขียวหวาน

จากการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เพื่อเปรียบเทียบขนาดผลที่เกิดบนผลส้มเขียวหวานในวันที่ 8 (ตารางที่ 21) พบว่าเมื่อใส่ตัวเซลล์แบคทีเรียก่อนเชื้อรา 24 ชั่วโมง และใส่สารสกัดหยาบพร้อมเชื้อราสามารถควบคุมการเกิดโรคได้ดี คือ ไม่พบอาการแสดงของโรค ส่วนอาการแสดงของโรคในกรรมวิธีที่ใส่ อิมาซาลิล 500 ppm อาจเนื่องมาจาก อิมาซาลิล ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้เตรียมไว้นานแล้วทำให้สารมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราได้น้อยลง กรรมวิธีที่ใส่สารสกัดหยาบก่อนเชื้อรา 24 ชั่วโมง และใส่ตัวเซลล์พร้อมเชื้อราสามารถยับยั้งความรุนแรงของโรค โดยมีเปอร์เซ็นต์อาการแสดงของโรคถึง 22.5 และ 27.5 ตามลำดับ มีขนาดของแผลในชุดทดสอบเป็น 0.18 และ 0.75 เซนติเมตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 21 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแผลบนผลส้มเขียวหวานและเปอร์เซ็นต์อาการแสดงของโรคเน่ารา *P. digitatum* บนผลส้มในวันที่ 8

Treatment	Average Diameter of wound #(cm)	% disease Incidence
T_1: ชุดควบคุม (ราอย่างเดียว)	4.77[d]	100
T_2: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) ก่อน 24 ชั่วโมง	0.18a[b]	22.5
T_3: เซลล์ *B. subtilis* (10^8 CFU/ml) ก่อน 24 ชั่วโมง	0.00[a]	0
T_4: Imazalil (500 ppm) ก่อน 24 ชั่วโมง	0.29[b]	12.5
T_5: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) พร้อมเชื้อรา	0.00[a]	0
T_6: เซลล์ *B. subtilis* (10^8 CFU/ml) พร้อมเชื้อรา	0.75[c]	27.5
T_7: Imazalil (500 ppm) พร้อมเชื้อรา	0.22[b]	12.5

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรร่วมกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ระดับ ($P = 0.05$ C.V. = 15.56 %), *B. subtilis* 7.155

8.3.2.2. ประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *P. digitatum* ของ *B. subtilis* 155 บนผลส้มโชกุน

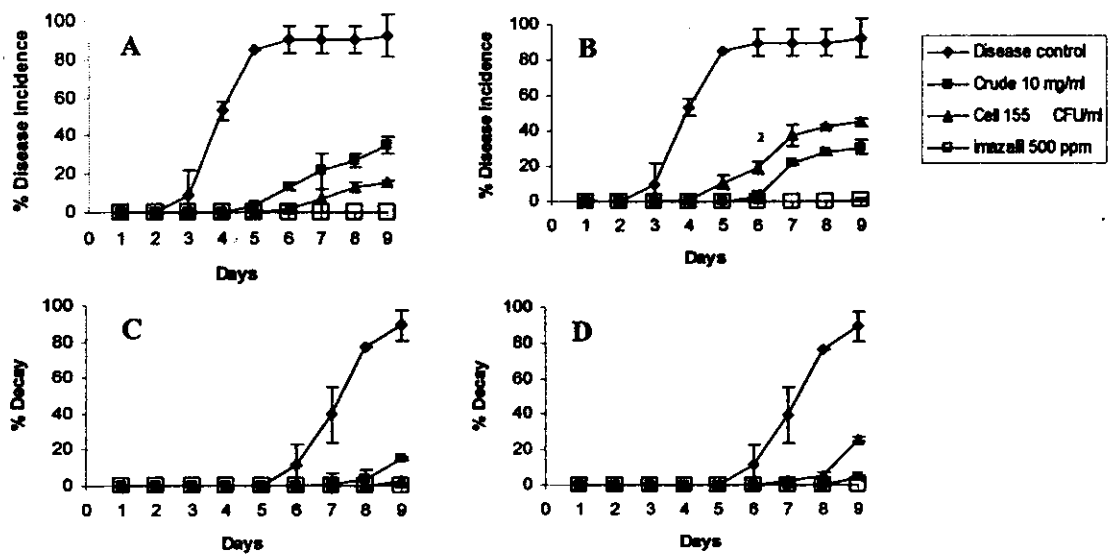
ใช้สารสกัดหยาบของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* 155 (10 มก./มล.) สารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรีย (10^8 CFU/มล.) และสารเคมีกำจัดเชื้อรา อิมาซาลิล (500 พีพีเอ็ม) ในกรรมวิธีต่างๆ (T_1-T_7) เมื่อใส่เซลล์แบคทีเรียและสารสกัดหยาบก่อน 24 ชั่วโมง ผลส้มเริ่มแสดงอาการเน่าในวันที่ 6 และ 5 ตามลำดับ และเน่าทั้งผลเมื่อวันที่ 9 และ 7 ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ใส่สารหรือเซลล์พร้อมเชื้อราก่อโรคพบว่า เมื่อใส่ตัวเซลล์แบคทีเรียและสารสกัดหยาบ อาการแสดงของโรคเริ่มเกิดขึ้นในวันที่ 4 และ 6 ตามลำดับ เน่าทั้งผลเกิดเมื่อวันที่ 7 และ 9 ตามลำดับ ดังรูปที่ 17

ผลส้มโชกุนมีขนาดแผลเริ่มต้น 0.3 เซนติเมตร อาการแสดงโรคของผลส้มนับตั้งแต่ผลส้มมีขนาดแผล 0.5 เซนติเมตรขึ้นไป และการเน่าทั้งผลเกิดเมื่อผลส้มมีขนาดแผล 5.0 เซนติเมตรหรือมากกว่าเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ DMRT เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลที่เกิดบนผลส้มโชกุนในวันที่ 8 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่ากรรมวิธีที่ใส่สารหรือเซลล์ก่อนเชื้อรา 24 ชั่วโมง ให้ผลดังนี้ คือ สารสกัดหยาบ เซลล์ *B. subtilis* 7.155 และ อิมาซาลิล (500 ppm) สามารถควบคุมเชื้อราได้ในช่วง 94-100% พบว่าแต่ละกรรมวิธีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 22) ในกลุ่มใส่สารหรือเซลล์พร้อมเชื้อรา พบว่าสารสกัดหยาบ เซลล์ *B. subtilis* 7.155 และ อิมาซาลิล (500 ppm) สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ในช่วง 91-100% เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างการใส่สารหรือเซลล์ก่อนรา 24 ชั่วโมง และทุกกรรมวิธีที่ใส่สารหรือเซลล์พร้อมเชื้อราพบว่ายับยั้งการเกิดโรคได้ดี โดยผลส้มมีขนาดแผลที่เกิดโรคในชุดทดสอบเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการใส่เชื้อรา *P. digitatum* เพียงอย่างเดียว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % คือ สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้มากกว่า 90% ประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคผลเน่า เมื่อใช้สารต่างๆพบว่าประสิทธิภาพสูงสุดคือใช้อิมาซาลิล (500 ppm) ทั้งก่อนและพร้อมเชื้อราก่อโรคสามารถควบคุมการเกิดโดยได้อย่างสมบูรณ์ประสิทธิภาพรองลงมาคือเมื่อใส่ตัวเซลล์แบคทีเรียก่อนใส่เชื้อรานาน 24 ชั่วโมง และใส่สารสกัดหยาบพร้อมรา ในกรรมวิธีที่ใส่สารสกัดหยาบก่อนรานาน 24 ชั่วโมง และเมื่อตัวเซลล์พร้อมรามีประสิทธิภาพต่ำสุด (รูปที่ 18)

ตารางที่ 22 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของแผล และเปอร์เซ็นต์อาการแสดงของโรคเน่าเชื้อราบนผลส้มโชกุนในวันที่ 8 หลังปลูกเชื้อรา *P. digitatum*

Treatment	Diameter of wound (cm.)			% disease
	Rep. 1	Rep. 2	Average ± SD#	Incidence
T_1: ชุดควบคุม (ราอย่างเดียว)	4.28^e	4.80^e	4.54 ± 0.32^e	90
T_2: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) ก่อน 24 ชม.	0.96^c	1.17^c	1.06 ± 0.14^c	27.5
T_3: เซลล์ *B. subtilis* (10^8 CFU/ml) ก่อน 24ชม.	0.26^b	0.25^b	0.25 ± 0.03^b	13.34
T_4: Imazalil (500 ppm) ก่อน 24 ชม.	0.00^a	0.00^a	0.00^a	0
T_5: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) พร้อมเชื้อรา	0.41^b	0.33^b	0.37 ± 0.06^b	27.5
T_6: เซลล์ *B. subtilis* (10^8 CFU/ml)พร้อมเชื้อรา	1.29^d	1.38^d	1.34 ± 0.15^d	42.5
T_7: Imazalil (500 ppm) พร้อมเชื้อรา	0.00^a	0.00^a	0.00^a	0

กรรมวิธีที่มีอักษรร่วมกัน จะมีค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกัน จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRTที่ระดับ P = 0.05 , C.V. = 11.80 %, Rep = การทดลองซ้ำที่, *B. subtilis* 7.155



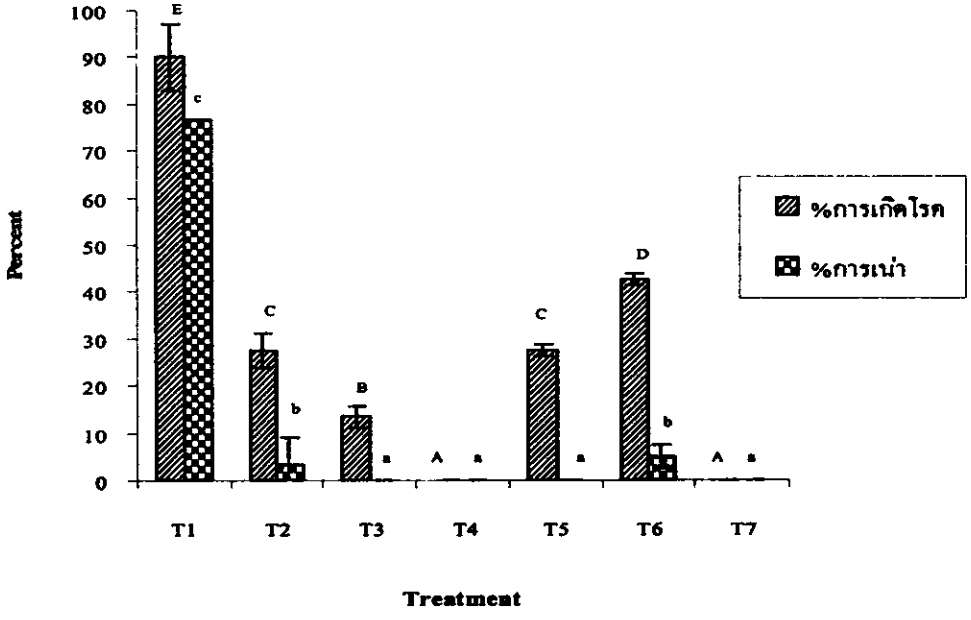
รูปที่ 17 กราฟแสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *P. digitatum* ของ *B. subtilis* 7.155 บนผลส้มโดยกรรมวิธีต่างๆ

A ใส่เชื้อราก่อนเซลล์หรือสารนาน 24 ชั่วโมง

B ใส่เซลล์หรือสารและเชื้อราพร้อมกัน

C ใส่เชื้อราก่อนเซลล์หรือสารนาน 24 ชั่วโมง

D ใส่เซลล์หรือสารและเชื้อราพร้อมกัน



รูปที่ 18 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและการเน่าของผลส้มในวันที่ 8

T1: ชุดควบคุม (ราอย่างเดียว), T2: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) ก่อน 24 ชั่วโมง, T3: เซลล์ *B. subtilis* 7.155 (10^8 CFU/ml) ก่อน 24 ชั่วโมง, T4: อิมาซาลิล (500 ppm) ก่อน 24 ชั่วโมง, T5: สารสกัดหยาบ (10 mg/ml) ผสมกับเชื้อรา, T6: เซลล์ *B. subtilis* (10^8 CFU/ml) ผสมกับเชื้อรา, T7: อิมาซาลิล (500 ppm) ผสมกับเชื้อรา