บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การศึกษา การแยกเชื้อสาเหตุโรค และทดสอบความสามารถของเชื้อสาเหตุโรครากและโคนเน่า โรคเหี่ยวเหลือง และโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ

จากการเก็บตัวอย่างต้นมะเขือเทศที่การแสดงอาการของโรคจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่โครงการขยายผลโครงการหลวงสบโขง ตำบลสบโขง อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ ทำการศึกษาลักษณะอาการของโรคทางดินของมะเขือเทศ พบว่าพืชมักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคพืชในช่วงระยะต้นโตตั้งแต่เริ่มออกดอกจนถึงระยะเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยเฉพาะในระดับต้นกล้า ต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคทางดิน จะพบว่าบริเวณโคนต้น จะมีลักษณะเป็นรอยช้ำสีน้ำตาลโดยรอบโคนต้น ใบและยอดเหี่ยวเฉา รากเน่า โคนเน่า บริเวณโคนต้นบริเวณระดับดินอาจพบเส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุมอยู่ (ภาพ 5)

ภาพ 5 ลักษณะอาการโรคทางดินของมะเขือเทศที่ปลูกในสภาพแปลงเกษตรกร

ก. ต้นมะเขือเทศแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น และล้มพับตาย

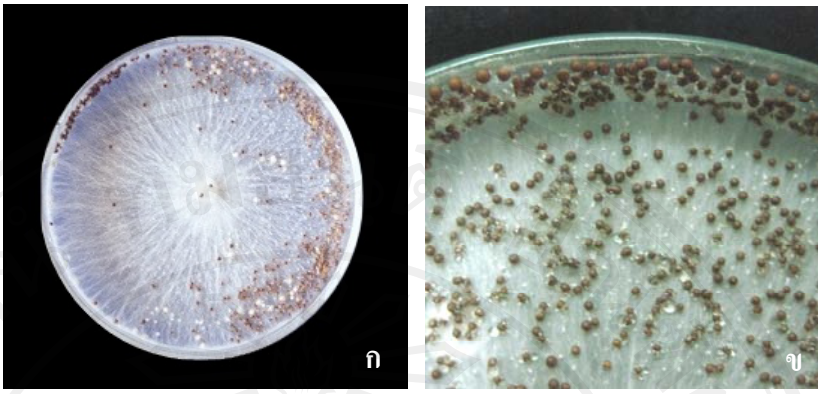
ข. บริเวณโคนต้นระดับดินมีเส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุมอยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรค และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโรคทางดินของมะเขือเทศ

จากการแยกเชื้อราสาเหตุของโรคโดยวิธี moist chamber และ tissue transplanting method พบเชื้อรา *S. rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า (Sclerotium root and stem rot or Southern root rot) ซึ่งเส้นใยของเชื้อรานี้มีสีขาว ฟูค่อนข้างหยาบ (ภาพ 6 ก) และพบเม็ด sclrotia คล้ายเมล็ดผักกาด สีน้ำตาลติดอยู่มองเห็นได้ชัดเจน ซึ่งเป็นเส้นใยของเชื้อราพัฒนาเป็นก้อนแข็งสีน้ำตาล บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ภาพ 6 ข) และพบเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt) เส้นใยสีขาว คล้ายสำลี ขอบโคโลนีสีชมพูบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ภาพ 7 ก) เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบโคนิเดียหลายเซลล์ สีใส ลักษณะเป็นรูปร่างโค้งคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว (ภาพ 7 ข) และการแยกเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Streak Plate พบเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียว โดยโคโลนีของเชื้อมีสีขาว มีเมือกรอบ ๆ โคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (ภาพ 8 ก) เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเป็นรูปร่างท่อน เซลล์หัวท้ายมน และลักษณะการติดสีแกรมติดสีแดง (ภาพ 8 ข) ซึ่งตรงกับรายงานของ Fouzia and Saleem (2005) ทำการแยกเชื้อรา *S. rolfsii* จากรากของต้นมะเขือเทศ และพิสูจน์ความเป็นโรค พบเชื้อ *S. rolfsii* ที่สามารถทำให้เกิดโรคได้ และยังทำให้ความงอก,ความสูง และน้ำหนักของต้นมะเขือเทศลดลง โดย Thiribhuvanamala *et. al.* (1999) ยังรายงานว่าเชื้อรา *S. rolfsii* นี้ทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศสามารถลดลงได้ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั้งหมด และ Jiskani *et. al.* (2007) ทดลองแยกเชื้อราสาเหตุโรคจากบริเวณรากของต้นมะเขือเทศ และพิสูจน์ความเป็นโรค พบเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ซึ่งพบว่าประสบปัญหาการเกิดโรคกับต้นมะเขือเทศมากที่สุดรองลงมาจากเชื้อรา *R. solani* และอโณทัย (2548) สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในประเทศไทยจากพืชอาศัย 17 ชนิด รวมต้นมะเขือเทศด้วย แยกเชื้อแบคทีเรียได้ 62 ตัวอย่าง และทำการพิสูจน์ความเป็นโรคบนต้นมะเขือเทศสีดาทิพย์ 3 พบว่าทุกสายพันธุ์ทำให้เกิดโรค และจัดจำแนกชนิดของเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์เป็นเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียว โดยมีโคโลนีสีขาว เยิ้ม มีเมือก รอบ ๆ โคโลนี

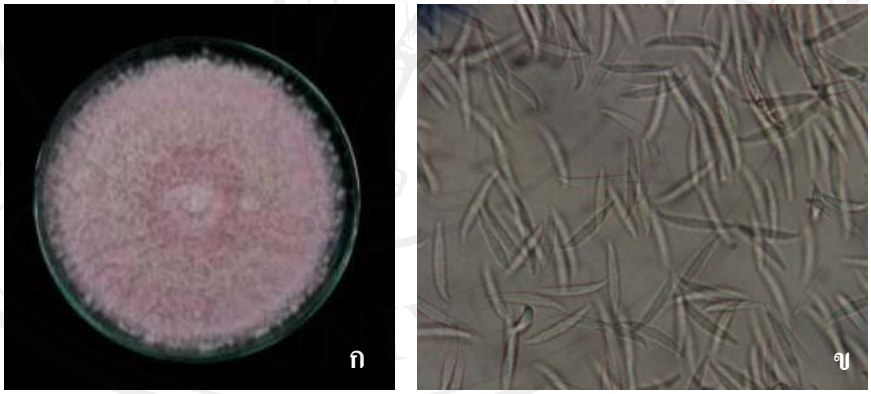
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 6 ลักษณะโคโลนี และโครงสร้างของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีลักษณะสีขาว ฟูค่อนข้างหยาบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 6 วัน

ข. ลักษณะเส้นใยพัฒนาเป็นก้อนแข็งสีน้ำตาล คล้ายเมล็ดผักกาด

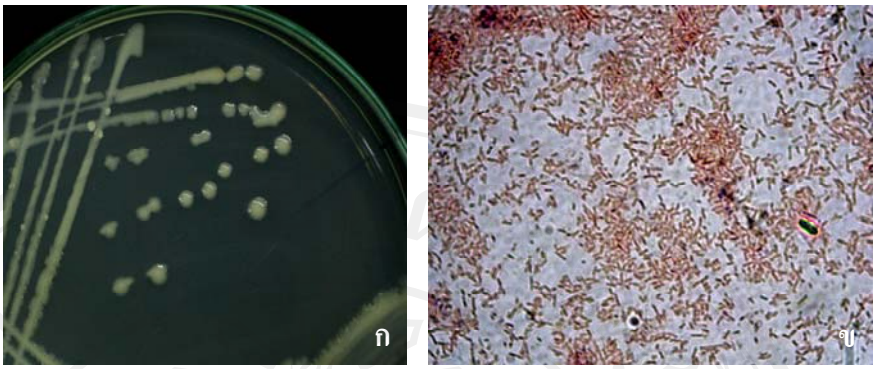


ภาพ 7 ลักษณะโคโลนี และโครงสร้างของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีลักษณะเส้นใยสีขาว คล้ายสำลี ขอบโคโลนีสีชมพู บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 12 วัน

ข. ลักษณะโคนิเดียหลายเซลล์ สีใส ลักษณะเป็นรูปร่างโค้งคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 8 ลักษณะโคโลนี และโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

ก. ลักษณะโคโลนีสีขาว มีเมือกรอบๆโคโลนี เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA อายุ 3 วัน

ข. ลักษณะเซลล์รูปร่างท่อน หัวท้ายมน และลักษณะการติดสีแกรมติดแดง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

4.1.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity test) ของเชื้อสาเหตุโรค

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *S. rolfsii* และ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ที่แยกได้จากมะเขือเทศ โดยการปลูกเชื้อด้วย mycelial disc ของเชื้อราที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่าง ปลูกเชื้อโดยการคลุกเมล็ดข้าวฟ่างลงบนบริเวณโคนต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 20 วัน พบว่าหลังจากการปลูกเชื้อ *S. rolfsii* 5 วัน ต้นมะเขือเทศเริ่มแสดงอาการเหี่ยว และพบการลุกลามเส้นใยของเชื้อที่บริเวณโคนต้นและลำต้น เมื่อเวลาผ่านไปหลังจากปลูกเชื้อ 10 วันส่วนของลำต้นมะเขือเทศได้ล้มพับลง และแสดงอาการของโรครุนแรงมากยิ่งขึ้นจนต้นมะเขือเทศตายในที่สุด (ภาพ 9 ข.) สำหรับเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* พบว่าหลังจากปลูกเชื้อได้ 28 วัน ต้นมะเขือเทศแสดงอาการเหี่ยวโดยเริ่มจากใบส่วนล่างเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเหี่ยวตายในที่สุด (ภาพ 10) สำหรับการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยนำ suspension ของเชื้อราดลงบริเวณโคนต้นกล้ามะเขือเทศบริเวณโคนต้น พบว่าหลังจากปลูกเชื้อได้ 18 วัน ต้นมะเขือเทศแสดงอาหารเหี่ยวทั้งต้น โดยใบยังเป็นสีเขียวอยู่ (ภาพ 11) และจากการตรวจชนิดของเชื้อโดยใช้ชุดตรวจสอบ Agristrip ของบริษัท BIOREBA, Switzerland พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* (ภาพ 12)

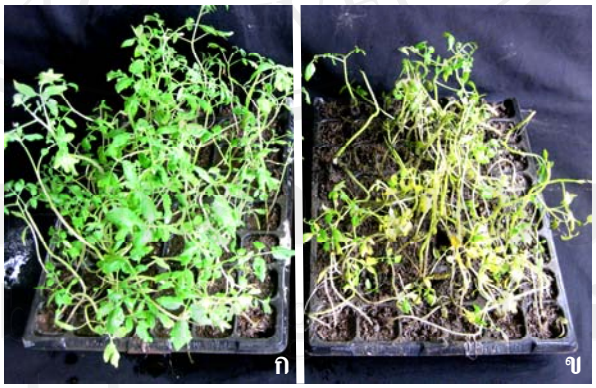
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 9 ลักษณะอาการต้นมะเขือเทศอายุ 40 วัน หลังการปลูกเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* นาน 10 วัน

ก. ต้นมะเขือเทศปกติในชุดควบคุม

ข. ต้นมะเขือเทศในชุดทดสอบ แสดงอาการใบเหี่ยว และล้มพับลง

ค. ลักษณะต้นมะเขือเทศมีเส้นใยเชื้อราเจริญปกคลุมต้นโดยรอบ และเม็ด sclrotia คล้ายเมล็ดผักกาด สีน้ำตาลบริเวณโคนต้นมะเขือเทศ

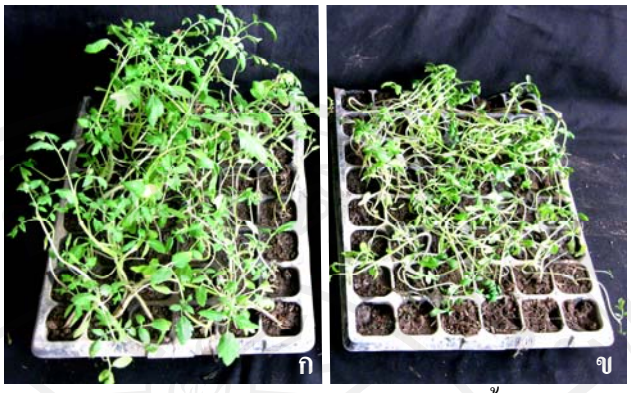


ภาพ 10 ลักษณะอาการต้นมะเขือเทศอายุ 54 วัน หลังการปลูกเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* นาน 28 วัน

ก. ต้นมะเขือเทศปกติในชุดควบคุม

ข. ต้นมะเขือเทศในชุดทดสอบ แสดงอาการใบเหี่ยวโดยใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 11 ลักษณะอาการต้นมะเขือเทศอายุ 54 วัน หลังการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* นาน 18 วัน

ก. ต้นมะเขือเทศปกติในชุดควบคุม

ข. ต้นมะเขือเทศในชุดทดสอบ แสดงอาการใบเหี่ยวโดยยังมีสีเขียว

ภาพ 12 ผลการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* โดยชุดตรวจสอบ Agristrip

ก. ชุดควบคุม ผลลบจะเกิดแถบสีแดงหนึ่งแถบ

ข. เชื้อแบคทีเรีย ผลบวกจะเกิดแถบสีแดงสองแถบ (ศรชี้)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ

4.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบรากพริกกะเหรี่ยงและมะเขือเทศ

การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินรอบรากพริกและมะเขือเทศจากพื้นที่บริเวณต่างๆ โดยวิธี soil dilution plate สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ทั้งหมดจำนวน 33 ไอโซเลท โดยแยกได้จากแปลงปลูกมะเขือเทศในพื้นที่ขยายผลโครงการหลวงสบโขง ตำบลสบโขง อำเภอ อมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ 12 ไอโซเลท คือ TKC1, TKC2, TKC3, TKC4, TKC5, TKC6, TKC7, TKC8, TKC9, TKC10, TKC11 และ TKC12 และจากตัวอย่างดินรอบรากพริกกะเหรี่ยงจากแปลงปลูกพริกกะเหรี่ยงในพื้นที่ขยายผลโครงการหลวงสบเมย อำเภอสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน 21 ไอโซเลท คือ CMM1, CMM2, CMM3, CMM4, CMM5, CMM6, CMM7, CMM8, CMM9, CMM10, CMM11, CMM12, CMM13, CMM14, CMM15, CMM16, CMM17, CMM18, CMM19, CMM20 และ CMM21 ดังตาราง 4

ตาราง 4 ชนิดของพืชและสถานที่เก็บตัวอย่างจำนวนของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดินบริเวณรากของมะเขือเทศและพริกกะเหรี่ยง

พืชปลูก	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ (ไอโซเลท)
มะเขือเทศ	แปลงปลูกในพื้นที่ขยายผลโครงการหลวงสบโขง อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่	12
พริกกะเหรี่ยง	แปลงปลูกบริเวณเชิงเขา อำเภอสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน	6
	แปลงปลูกในพื้นที่ขยายผลโครงการหลวงสบเมย อำเภอสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน	15

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคโดยการเลี้ยงร่วมกับเชื้อสาเหตุโรค

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินรอบรากพริกและมะเขือเทศ จำนวน 33 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* และ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* โดยวิธี Dual Culture และเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี Disc Diffusion พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 22 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ โดยไอโซเลท CMM11 และ CMM7 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งที่ดีที่สุด คือ 28.00 และ 25.60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 5, ภาพ 13 และภาคผนวก จ ตาราง 1) ส่วนเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 15 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ โดยไอโซเลท TKC1, TKC2 และCMM5 โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งคือ 38.00, 36.40 และ 36.40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 5, ภาพ 14 และภาคผนวก จ ตาราง 2) และพบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพียงไอโซเลทเดียว คือ TKC1 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ดีที่สุด (ภาพ 15, ตาราง 6 และภาคผนวก จ ตาราง 3) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคต่างกัน สอดคล้องกับรายงานของ Baker and Cook (1974) ที่ว่าในธรรมชาติจะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืช โดยจะมีกลไกการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรค คือ การแข่งขัน การสร้างสารปฏิชีวนะ การเป็นปรสิต และการชักนำให้เกิดความต้านทาน โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในแต่ละกลไกที่แตกต่างกัน ทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคย่อมแตกต่างกันด้วย โดยบางชนิดสามารถควบคุมและยับยั้งเชื้อสาเหตุได้มากกว่า 1 ชนิด แต่เชื้อบางชนิดมีความจำเพาะเจาะจงต่อการยับยั้งเชื้อเป้าหมาย ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่เชื้อปฏิปักษ์เหล่านั้นปลดปล่อยออกมา (วิลาวรรณ์และคณะ, 2549)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่าง ๆในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* และ*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ[1] (%)	
	S. rolfsii	*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*
TKC1	15.60 jk[2]	38.00 a
TKC2	0.00 l	36.40 ab
TKC3	19.20 fghi	35.20 bc
TKC4	17.20 ijk	35.20 bc
TKC5	16.80 ijk	0.00 h
TKC6	18.00 hij	32.80 de
TKC7	20.00 efgh	34.80 bc
TKC8	21.20 cdefg	0.00 h
TKC9	0.00 l	0.00 h
TKC10	22.00 cde	34.00 cd
TKC11	21.60 cdef	0.00 h
TKC12	14.80 k	0.00 h
CMM1	21.20 cdefg	29.60 g
CMM2	23.60 bc	30.40 fg
CMM3	22.40 cde	31.60 ef
CMM4	18.80 ghi	36.00 b
CMM5	23.20 bcd	36.40 ab
CMM6	0.00 l	0.00 h
CMM7	25.60 ab	0.00 h
CMM8	22.80 cd	35.20 bc
CMM9	0.00 l	0.00 h
CMM10	0.00 l	0.00 h
CMM11	28.00 a	30.80 fg

(ต่อ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 (ต่อ)ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่าง ๆในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* และ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

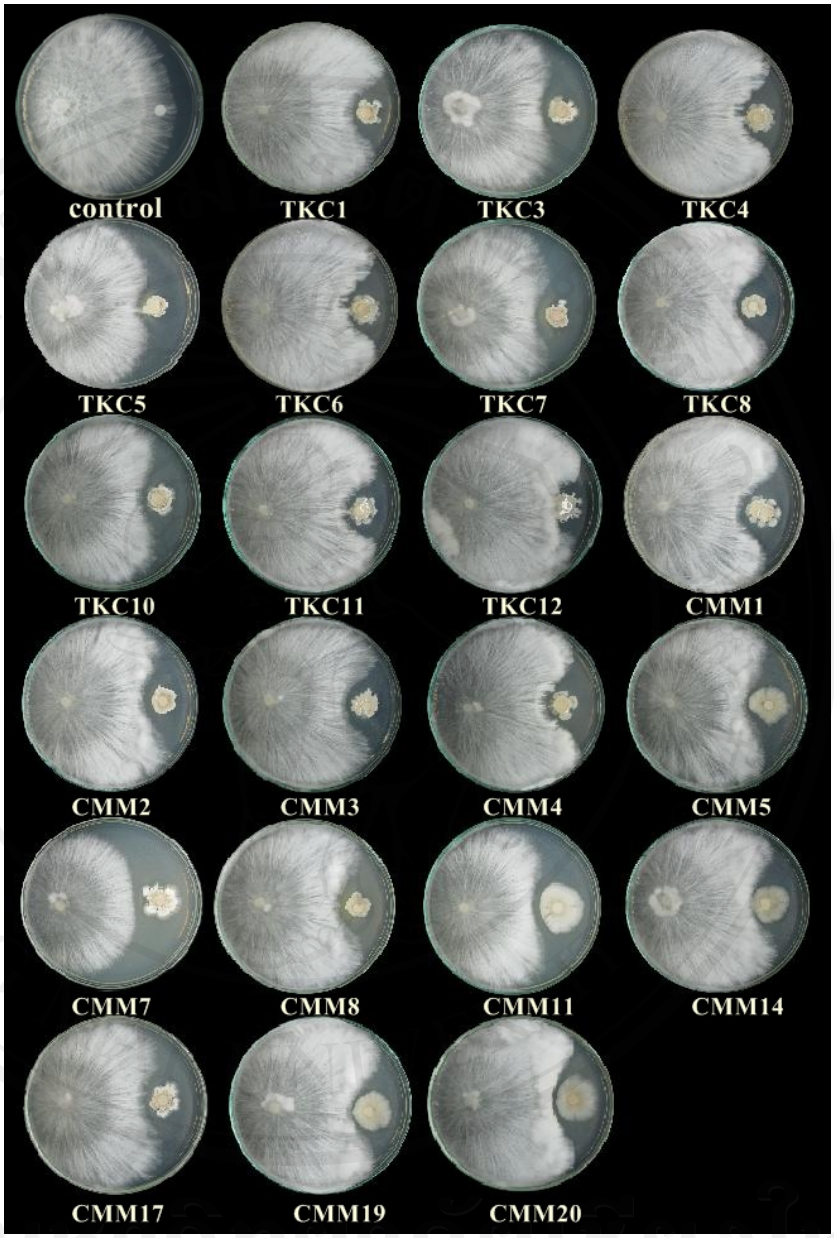
ไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ[1] (%)	
	S. rolfsii	*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*
CMM12	0.00 l[2]	0.00 h
CMM13	0.00 l	0.00 h
CMM14	20.80 defg	0.00 h
CMM15	0.00 l	0.00 h
CMM16	0.00 l	0.00 h
CMM17	22.00 cde	0.00 h
CMM18	0.00 l	0.00 h
CMM19	22.40 cde	0.00 h
CMM20	20.80 defg	35.20 bcd
CMM21	0.00 l	0.00 h
ชุดควบคุม(น้ำกลั่น)	0.00 l	0.00 h
LSD ($P = 0.01$)	2.27	1.79
CV (%)	14.30	9.88

[1] ค่าเฉลี่ย 5 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least Significant Difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

(ภาคผนวก ตาราง 1 และ 2)

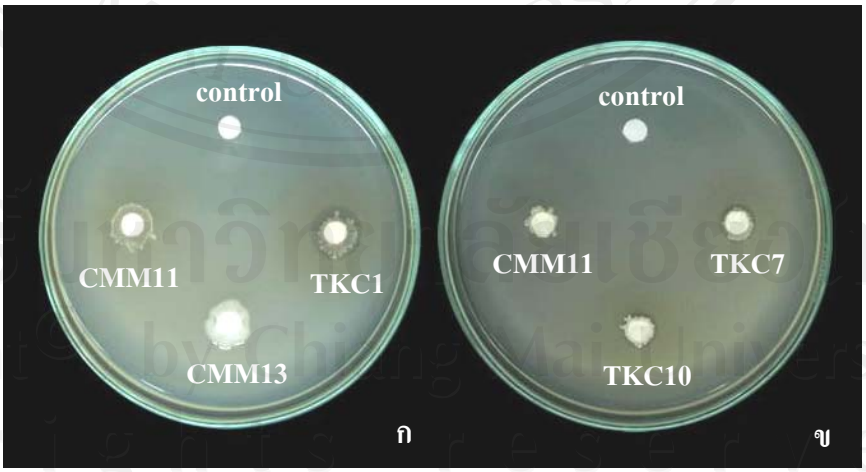
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 13 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 22 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* โดยวิธี Dual Culture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 14 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 15 ไอโซเลทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* โดยวิธี Dual Culture



ภาพ 15 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท ในการเกิด clear zone ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* บนอาหาร NA โดยวิธี Disc Diffusion

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่างๆในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ความกว้างของบริเวณใส[1] (mm)
TKC1	2.7 a[2]
TKC7	1.0 b
TKC10	0.9 b
CMM11	0.00 c
CMM13	0.00 c
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	0.00 c
LSD ($P = 0.01$)	0.20
CV (%)	88.30

[1] ค่าเฉลี่ย 5 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least Significant Difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก จ ตาราง 3)

4.3 การศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

4.3.1 การศึกษาคุณสมบัติทางด้านชีวเคมี

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่างๆ มาทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ในการผลิตเอนไซม์ 6 ชนิด คือ เซลลูเลส ฟอสฟาเตส ไคติเนส อะไมเลส ยูรีเอส และแคตาเลส พบว่าจากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ 9 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตได้ คือ TKC1, TKC2, TKC3, TKC4, TKC10, TKC11, CMM7, CMM13 และ CMM14 โดยปรากฏการเกิดวงใสรอบ ๆโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ตาราง 7 และภาพ 16ก.) กล่าวคือ แบคทีเรียปฏิปักษ์มีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค คือ อาจเกิดการย่อยเซลลูเลส ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังสามารถนำไปใช้เป็นส่วนช่วยในการย่อยเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้อีกด้วย (Gong *et al*., 1999) ส่วนการผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเตสมีเพียงแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทเดียวที่สามารถผลิตได้ คือ CMM13 โดยปรากฏการเกิดวงใสรอบๆโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ตาราง 7 และภาพ 16ข.) แสดงว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMM13 มีความสามารถในการช่วยย่อยสลายหินฟอสเฟตในดิน เป็นการเพิ่มศักยภาพในการดูดซึมธาตุฟอสฟอรัส

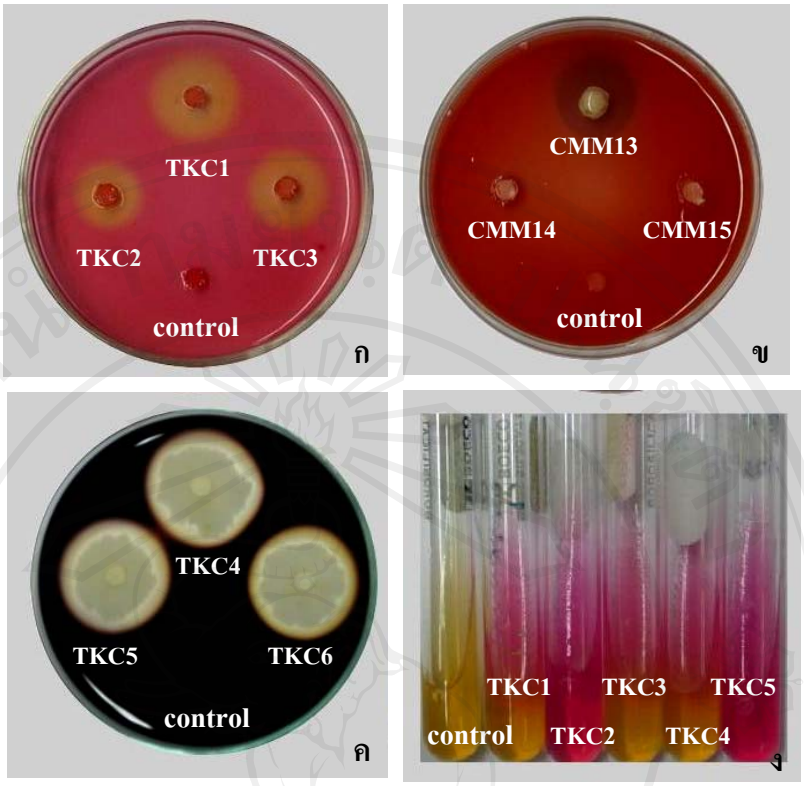
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 7 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 33 ไอโซเลทในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ไอโซเลท	การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี					
	เซลลูเลส	ฟอสฟาเตส	ไคติเนส	อะไมเลส	ยูรีเอส	แคตาเลส
TKC1	+	-	-	+	+	+
TKC2	+	-	-	-	+	+
TKC3	+	-	-	+	+	+
TKC4	+	-	-	+	+	+
TKC5	-	-	-	+	+	+
TKC6	-	-	-	+	+	+
TKC7	-	-	-	+	+	+
TKC8	-	-	-	+	+	+
TKC9	-	-	-	+	+	+
TKC10	+	-	-	+	+	+
TKC11	+	-	-	+	+	+
TKC12	-	-	-	+	+	+
CMM1	-	-	-	+	+	+
CMM2	-	-	-	+	+	+
CMM3	-	-	-	+	+	+
CMM4	-	-	-	+	+	+
CMM5	-	-	-	+	+	+
CMM6	-	-	-	-	+	+
CMM7	+	-	-	+	+	+
CMM8	-	-	-	+	+	+
CMM9	-	-	-	-	+	+
CMM10	-	-	-	-	+	+
CMM11	-	-	-	+	+	+
CMM12	-	-	-	-	+	+
CMM13	+	+	-	+	+	+
CMM14	+	-	-	-	+	+
CMM15	-	-	-	+	+	+
CMM16	-	-	-	+	+	+
CMM17	-	-	-	+	+	+
CMM18	-	-	-	-	+	+
CMM19	-	-	-	+	+	+
CMM20	-	-	-	+	+	+
CMM21	-	-	-	-	+	+

หมายเหตุ : - = negative, + = positive

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 16 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหารทดสอบ
ก. การทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC
ข. การทดสอบการผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเตสบนอาหาร Czapek's medium
ค. การทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหาร starch agar
ง. การทดสอบการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสบนอาหาร urea agar

ในดินเพื่อให้พืชนำไปใช้ได้ง่ายขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้พืชเจริญเติบโต และมีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากธาตุฟอสฟอรัสได้มากที่สุดอีกด้วย (กฤตย์, 2549) นอกจากนี้เอนไซม์ฟอสฟาเตส ยังสามารถใช้ในการเตรียมปุ๋ยชีวภาพได้ (สุฐิตา และทวีรัตน์, 2552) และไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทใด ๆที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสในการทดลองครั้งนี้ (ตาราง 7) สำหรับในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์ 25 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตได้ คือ TKC1, TKC3, TKC4, TKC5, TKC6, TKC7, TKC8, TKC9, TKC10, TKC11, TKC12, CMM1, CMM2, CMM3, CMM4, CMM5, CMM7, CMM8, CMM11, CMM13, CMM15, CMM16, CMM17, CMM19 และCMM20 โดยปรากฏการเกิดวงใสรอบ ๆโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ตาราง 7

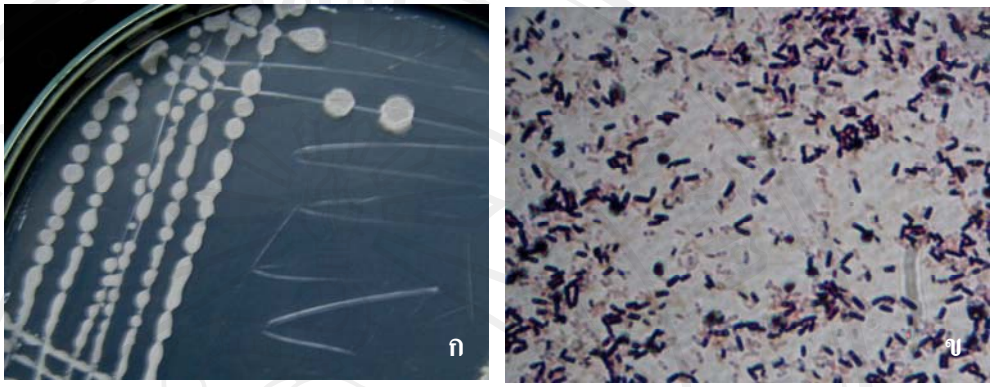
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และภาพ 16ค.) ซึ่งการที่แบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ แสดงถึงความสามารถในการใช้แป้งได้ และแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส และ แคตาเลสได้ โดยให้ผลบวกในการทดสอบการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส คือ ทำให้สีอาหาร urea agar เปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีบานเย็น (ตาราง 7 และภาพ 16ง.) และการผลิตเอนไซม์แคตาเลส คือ เกิดฟองก๊าซขึ้น เมื่อทดสอบกับ H_2O_2 บนสไลด์ (ตาราง 7) โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสได้ กล่าวคือ มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช โดยเอนไซม์ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการใช้ธาตุไนโตรเจนของพืช ซึ่งไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชมาก โดยรากพืชสามารถดูดไปใช้ในรูปไนเตรทและแอมโมเนียมไอออน สารประกอบไนโตรเจนที่พบในเนื้อเยื่อพืช มีทั้งที่เพิ่งดูดเข้าไป และยังไม่เปลี่ยนแปลง และอินทรีย์สารซึ่งมีการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่จากไนเตรท แอมโมเนีย และยูเรียที่พืชดูดได้ อินทรีย์สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญและมีการศึกษาแพร่หลาย คือ ฮอร์โมนพืช โดยฮอร์โมนพืชที่มีไนเตรทเป็นองค์ประกอบ คือ ออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinins) ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยออกซินกระตุ้นการแบ่งเซลล์ เร่งการขยายขนาดของเซลล์ ควบคุมการแตกแขนงของราก ส่วนไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนของพืชที่ช่วยส่งเสริมการแบ่งเซลล์ การขยายขนาด ช่วยในการงอกของเมล็ด ส่งเสริมการสร้างโปรตีน และช่วยในการเคลื่อนย้ายธาตุอาหาร (ยงยุทธ, 2543)

4.3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีสำหรับการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค และคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ดี จำนวน 5 ไอโซเลท คือ TKC1, TKC7, TKC10, CMM11 และ CMM13 มาศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร NA และการติดสีแบบแกรม พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKC1, TKC10, CMM11 และ CMM13 ติดสีแกรมเป็นสีม่วง แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยไอโซเลท TKC1 โคโลนีสีครีม ผิวหน้าขรุขระ และขอบหยัก (ภาพ 17) ไอโซเลท TKC10 โคโลนีสีครีม ผิวหน้าขรุขระ และขอบหยัก (ภาพ 18) ไอโซเลท CMM11 โคโลนีสีครีม ผิวหน้าขรุขระ และขอบเรียบ (ภาพ 19) และ CMM13 โคโลนีสีครีม ผิวหน้าขรุขระ และขอบเรียบ (ภาพ 20) และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKC7 ติดสีแกรมเป็นสีแดง แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีโคโลนีสีครีม ผิวหน้านูน และขอบเรียบ (ภาพ 21)

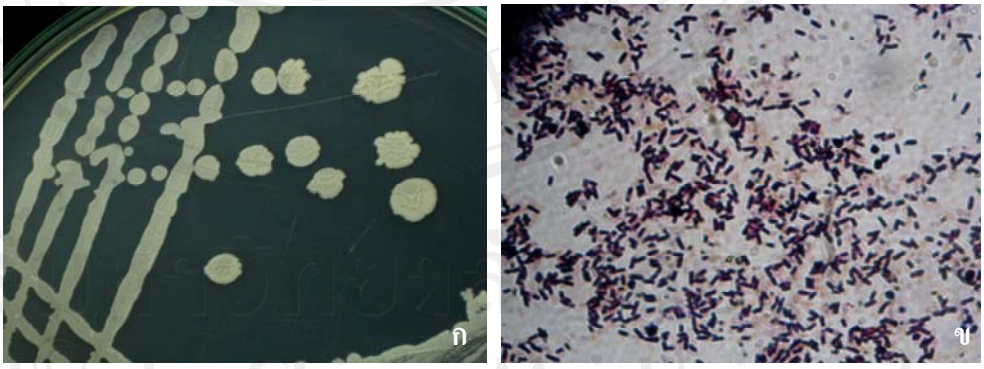
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 17 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKC1

ก. ลักษณะการเจริญบนอาหาร NA ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ข. ลักษณะการติดสีแกรมบวกของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

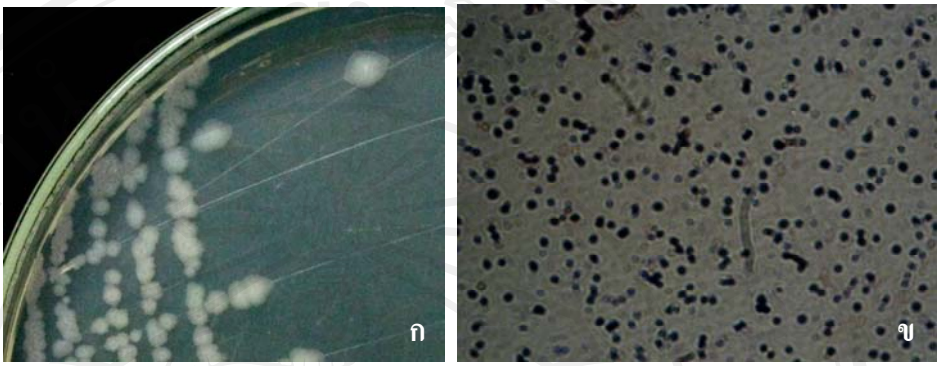


ภาพ 18 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKC10

ก. ลักษณะการเจริญบนอาหาร NA ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ข. ลักษณะการติดสีแกรมบวกของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

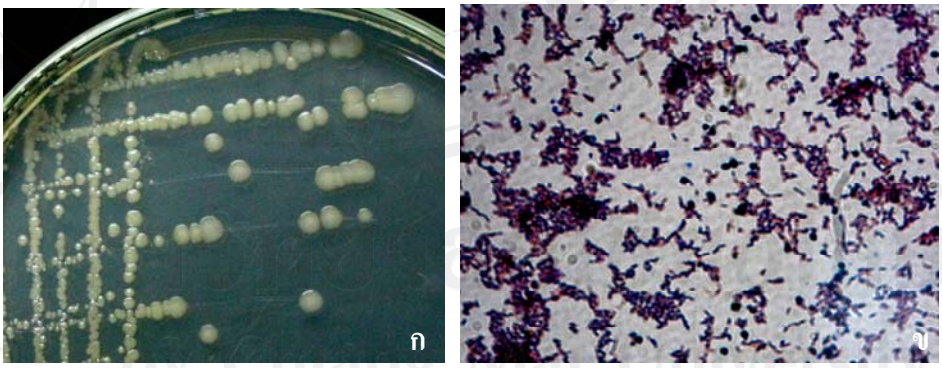
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 19 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMM11

ก. ลักษณะการเจริญบนอาหาร NA ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ข. ลักษณะการติดสีแกรมบวกของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

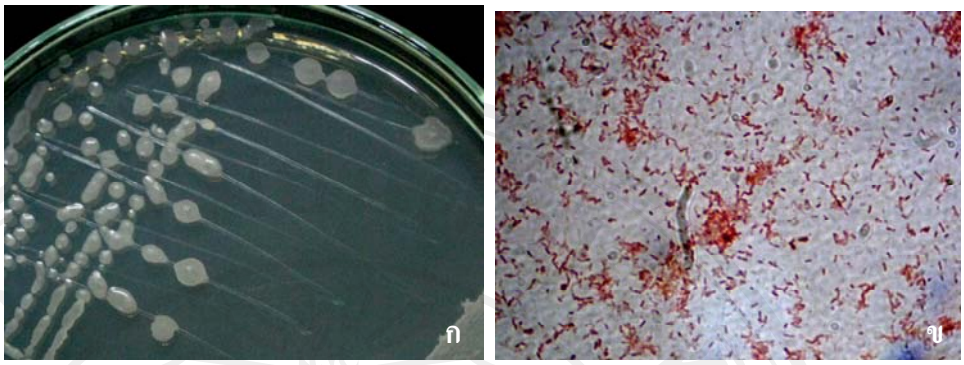


ภาพ 20 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMM13

ก. ลักษณะการเจริญบนอาหาร NA ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ข. ลักษณะการติดสีแกรมบวกของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 21 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKC7
ก. ลักษณะการเจริญบนอาหาร NA ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์
ข. ลักษณะการติดสีแกรมลบของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคและคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ดีจำนวน 5 ไอโซเลท คือ TKC1, TKC7, TKC10, CMM11 และ CMM13 มาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ลูกผสมทับทิมแดง ของบริษัท เพื่อนเกษตรกร จำกัด โดยนำเมล็ดมะเขือเทศที่ฆ่าเชื้อแล้ว แช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าเมล็ดมะเขือเทศเริ่มงอกหลังจากเพาะเมล็ดได้ 4 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกภายหลังจากการเพาะ 7 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเป็น 93.33-98.33 ซึ่งไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (น้ำกลั่น) และชุดควบคุม (น้ำกลั่น + อาหาร NA) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเป็น 95.00 (ตาราง 8, ภาพ 22)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

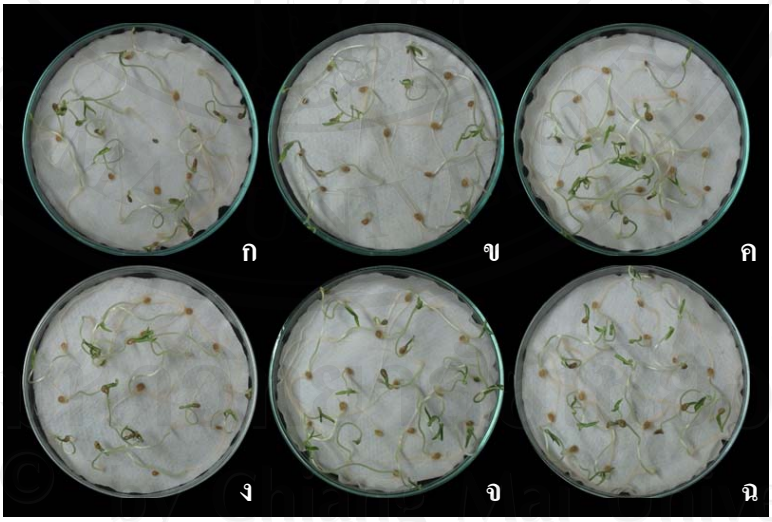
ตาราง 8 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดมะเขือเทศหลังการแช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้นเป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดมะเขือเทศหลังจากการเพาะบนกระดาษชื้น[1]
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	95.00 [NS]
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น + อาหาร NA)	95.00
TKC1	93.33
TKC7	93.33
TKC10	93.33
CMM11	98.33
CMM13	96.67
LSD (P=0.05)	7.15

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

[NS] = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (non-significance)

(ภาคผนวก จ ตาราง 4)



ภาพ 22 ผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 5 ไอโซเลทต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ ภายหลังจากการเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้นเป็นเวลา 7 วัน

ก. ชุดควบคุม ข. แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKC1

ค. แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKC7 ง. แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKC10

จ. แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMM11 ฉ. แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMM13

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภายหลังจากการเพาะเมล็ดมะเขือเทศ 7 วันบนกระดาษชื้น ได้นำต้นกล้ามะเขือเทศมาชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 5 ไอโซเลท คือ TKC1, TKC7, TKC10, CMM11 และ CMM13 และน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้าไม่แตกต่างกัน โดยน้ำหนักสดชั่งได้เฉลี่ย 0.0243- 0.0273 กรัมต่อต้น ส่วนน้ำหนักแห้งชั่งได้เฉลี่ย 0.00187-0.00227 กรัมต่อต้น ซึ่งผลการทดลองแสดงในตาราง 9 แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไม่ส่งผลกระทบต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ

ตาราง 9 น้ำหนักสดและแห้งของต้นกล้ามะเขือเทศ อายุ 7 วันที่เพาะบนกระดาษชื้น หลังการแช่เมล็ดในสารแขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท

กรรมวิธี	น้ำหนักเฉลี่ยของต้นกล้ามะเขือเทศหลังจากการเพาะบนกระดาษชื้น 14 วัน (กรัม)[1]	
	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	0.0250 [NS]	0.00210 [NS]
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น+อาหาร NA)	0.0253	0.00227
TKC1	0.0243	0.00217
TKC7	0.0267	0.00213
TKC10	0.0257	0.00227
CMM11	0.0267	0.00187
CMM13	0.0273	0.00223
LSD (P=0.05)	0.0037	0.0051
CV (%)	8.27	9.80

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

[NS] = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (non-significance)

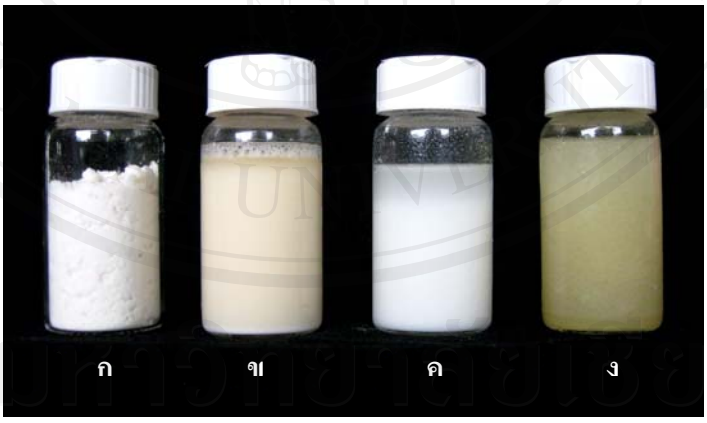
(ภาคผนวก จ ตาราง 5 และ6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5 การนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสารชีวภัณฑ์ ประเมินความสามารถของสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค และการทดสอบความมีชีวิตของสารชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้

4.5.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสารชีวภัณฑ์

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ดีจำนวน 5 ไอโซเลทที่คัดเลือก คือไอโซเลท TKC1, YKC7, TKC10, CMM11 และ CMM13 มาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์พัฒนาเป็นรูปแบบผง สารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมัน (ภาพ 23) โดยเริ่มแรกนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในแต่ละไอโซเลทที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB ไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ (O.D.) ให้ได้ 1.0 พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKC1 มีจำนวนแบคทีเรีย 7.67 x 10^8 cfu/ml, TKC7 มีจำนวนแบคทีเรีย 6.68 x 10^8 cfu/ml, TKC10 มีจำนวนแบคทีเรีย 7.34 x 10^8 cfu/ml, CMM11 มีจำนวนแบคทีเรีย 7.21 x 10^8 cfu/ml และ CMM13 มีจำนวนแบคทีเรีย 7.07 x 10^8 cfu/ml หลังจากนั้นนำมาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์โดยผสมส่วนประกอบตามสูตรแต่ละรูปแบบ โดยรูปแบบผงเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง และรูปแบบสารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมันเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องสาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน



ภาพ 23 สารชีวภัณฑ์ในรูปแบบผง สารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมัน

ก. สารชีวภัณฑ์รูปแบบผง

ข. สารชีวภัณฑ์รูปแบบสารละลายเข้มข้น ที่ใช้เฉพาะอาหารเหลว ไม่รวมตะกอนเซลล์ (supernatant) ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นส่วนประกอบ

ค. สารชีวภัณฑ์รูปแบบสารละลายเข้มข้น ที่ใช้ตะกอนเซลล์ (pellet) ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นส่วนประกอบ

ง. สารชีวภัณฑ์รูปแบบสารละลายน้ำมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5.2 การประเมินความสามารถของสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการนำสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบผง, สารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมัน ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 5 ไอโซเลท คือ TKC1, TKC7, TKC10, CMM11 และ CMM13 มาประเมินความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *S. rolfsii* และเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* โดยวิธี Dual Culture และเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี Disc Diffusion พบว่าสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบผงสูตร C11C และT01R มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งคือ 58.00 และ 56.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 10, ภาพ 24 และภาคผนวก จ ตาราง 7) และการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* พบว่าสารชีวภัณฑ์สูตร T10R และC10C มีประสิทธิภาพในการควบคุมได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งคือ 67.70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 10, ภาพ 24 และภาคผนวก จ ตาราง 8) และการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าสารชีวภัณฑ์สูตร T01R มีประสิทธิภาพในการควบคุมได้ดีที่สุด โดยมีความกว้างของบริเวณใส เท่ากับ 3.00 มิลลิเมตร (ตาราง 10, ภาคผนวก จ. ตาราง 9) ส่วนสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบสารละลายเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* ที่ดี คือสูตรชีวภัณฑ์ T07SC โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งคือ 58.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสูตรชีวภัณฑ์ T10SC โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งคือ 57.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 11, ภาพ 25 และภาคผนวก จ ตาราง 10) และสูตรชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ที่ดี คือสูตรชีวภัณฑ์ T10SC, T10PR, T10PM, C11SC และC11PC โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งคือ 53.30, 52.20, 52.20, 52.20 และ 51.10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 11, ภาพ 25 และภาคผนวก จ ตาราง 11) และสูตรชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่ดีที่สุด คือสูตรชีวภัณฑ์ T01SM โดยมีความกว้างของบริเวณใส คือ 4.00 มิลลิเมตร (ตาราง 11, ภาคผนวก จ ตาราง 12) สำหรับสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบสารละลายน้ำมันที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* ที่ดี คือสูตรชีวภัณฑ์ T01O, T07O, T10O และ C11O โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งคือ 60.00, 59.33, 59.00 และ58.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 12, ภาพ 26 และภาคผนวก จ ตาราง 13) และการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* พบว่าสูตรชีวภัณฑ์ T01O และ C11O มีประสิทธิภาพในการควบคุมที่ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งคือ 55.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 10 การทดสอบสูตรสารชีวภัณฑ์ใน*รูปแบบผง*ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทางดินของมะเขือเทศ

สูตรสารชีวภัณฑ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ[1] (%)		ความกว้างบริเวณใส[1] (มม.)
	S. rolfsii	*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*	*R. solanacearu*
TKC1+NB (T01)	56.00 abc[2]	63.40 c	1.63 c
T01C	54.67 abc	65.87 abc	2.67 b
T01R	56.00 abc	66.50 ab	3.00 a
T01M	54.67 abc	65.27 abc	2.50 b
TKC7+NB (T07)	56.67 abc	66.47 ab	1.00 c
T07C	56.67 abc	64.67 bc	0.00 d
T07R	57.33 ab	67.10 ab	0.00 d
T07M	56.00 abc	67.10 ab	0.00 d
TKC10+NB (T10)	58.00 a	65.87 abc	1.00 c
T10C	55.33 abc	67.67 a	0.00 d
T10R	54.00 bc	67.70 a	0.00 d
T10M	56.00 abc	64.63 bc	0.00 d
CMM11+NB (C11)	53.33 c	67.67 a	1.00 c
C11C	58.00 a	67.70 a	0.00 d
C11R	56.67 abc	64.63 bc	0.00 d
C11M	56.00 abc	65.23 abc	0.00 d
CMM13+NB (C13)	0.00 d	0.00 d	0.00 d
C13C	0.00 d	0.00 d	0.00 d
C13R	0.00 d	0.00 d	0.00 d
C13M	0.00 d	0.00 d	0.00 d
ชุดควบคุม(น้ำกลั่น)	0.00 d	0.00 d	0.00 d
LSD(*P*=0.01)	3.42	2.81	0.21
CV (%)	4.87	3.38	21.08

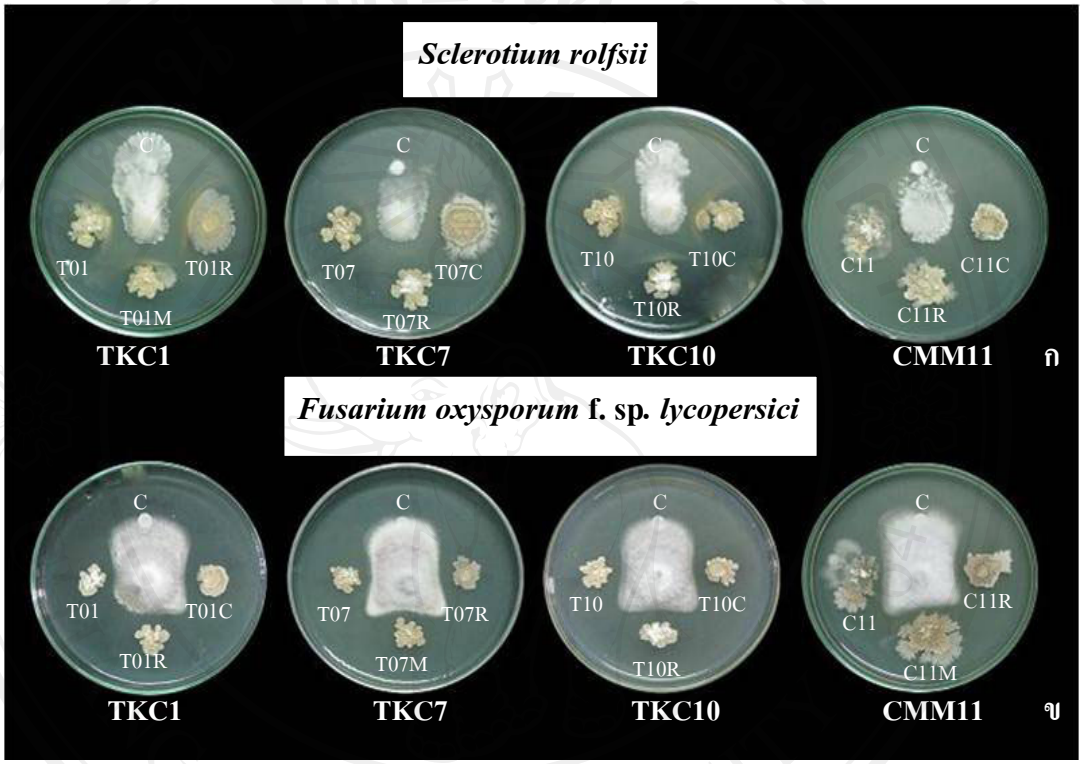
[1] ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least Significant Difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

(ภาคผนวก จ. ตาราง 7-9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 12, ภาพ 26 และภาคผนวก จ ตาราง 14) และพบว่าไม่มีสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบสารละลายน้ำมันสูตรใดๆที่สามารถควบคุมการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ (ตาราง 12, ภาคผนวก จ ตาราง 15)



ภาพ 24 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบผงที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท (TKC1, TKC7, TKC10 และ CMM11) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* และ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* โดยวิธี Dual Culture

ก.การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii*

ข.การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

หมายเหตุ T01 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TKC1 ในอาหาร NB
T07 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TKC7 ในอาหาร NB
T10 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TKC10 ในอาหาร NB
C11 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CMM11 ในอาหาร NB
C13 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CMM13 ในอาหาร NB
C = สารชีวภัณฑ์ที่มีแป้งข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ
R = สารชีวภัณฑ์ที่มีแป้งข้าวเจ้าเป็นส่วนประกอบ
M = สารชีวภัณฑ์ที่มี Microcrystalline cellulose (MCC) เป็นส่วนประกอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 11 การทดสอบสูตรสารชีวภัณฑ์ใน*รูปแบบสารละลายเข้มข้น*ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทางดินของมะเขือเทศ

สูตรสารชีวภัณฑ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ[1] (%)		ความกว้างบริเวณใส[1] (มม.)
	S. rolfsii	*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*	*R. solanacearum*
TKC1+NB (T01)	55.23 abc[2]	41.33 efg	2.40 d
T01SC	50.83 cde	40.00 efgh	3.00 c
T01SR	43.47 fghi	37.33 ghi	3.33 b
T01SM	39.17 ij	37.33 ghi	4.00 a
T01PC	23.33 k	46.67 cd	2.17 d
T01PR	52.87 abcd	38.67 fgh	3.00 c
T01PM	42.50 ghij	44.00 de	3.33 b
TKC7+NB (T07)	56.78 ab	46.67 cd	1.70 e
T07SC	57.50 a	41.33 efg	0.00 f
T07SR	47.67 defg	40.00 efgh	0.00 f
T07SM	51.37 bcd	44.00 de	0.00 f
T07PC	55.83 abc	44.00 de	0.00 f
T07PR	51.97 abcd	41.33 efg	0.00 f
T07PM	52.30 abcd	44.00 de	0.00 f
TKC10+NB (T10)	53.13 abcd	54.57 a	1.70 e
T10SC	57.00 ab	53.30 ab	0.00 f
T10SR	48.57 def	35.57 hi	0.00 f
T10SM	45.27 efgh	33.30 i	0.00 f
T10PC	38.20 ij	46.70 cd	0.00 f
T10PR	37.13 j	52.20 ab	0.00 f
T10PM	39.73 hij	52.20 ab	0.00 f
CMM11+NB (C11)	40.33 hij	47.00 cd	0.00 f
C11SC	49.97 cde	52.20 ab	0.00 f
C11SR	40.47 hij	46.70 cd	0.00 f
C11SM	24.30 k	41.10 efg	0.00 f
C11PC	38.37 ij	51.10 abc	0.00 f
C11PR	41.50 hij	50.00 bc	0.00 f
C11PM	26.43	42.20 ef	0.00 f

(ต่อ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

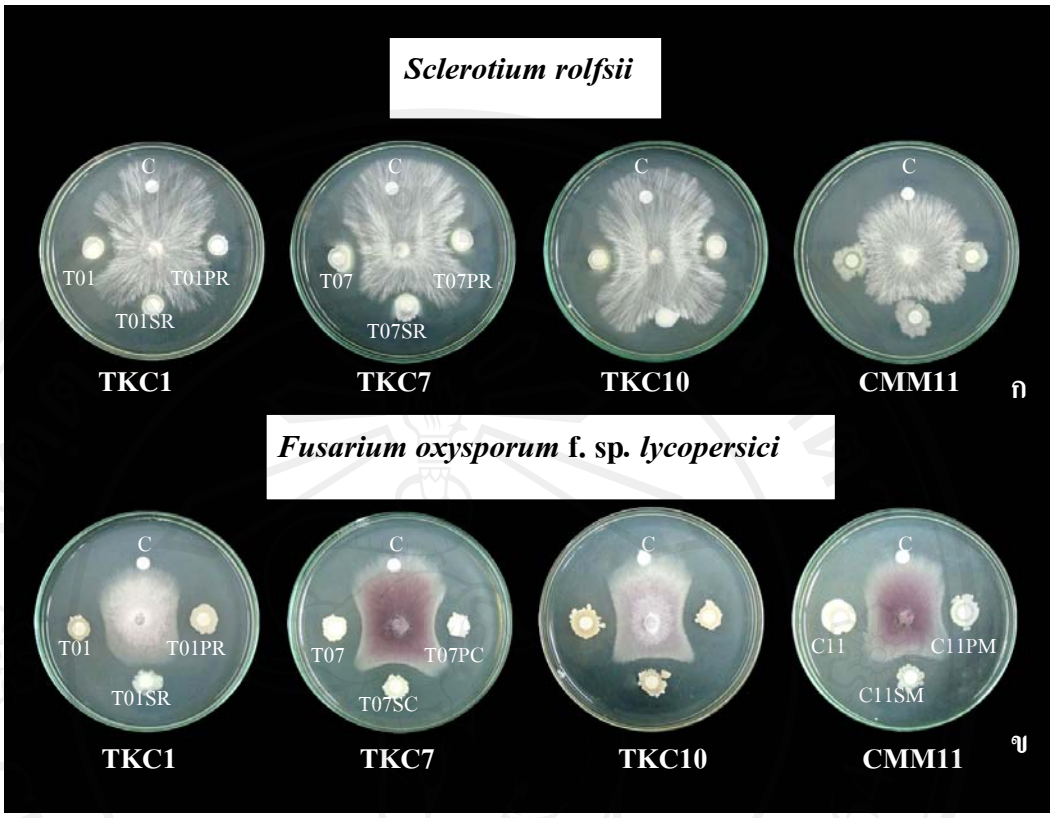
ตาราง 11 (ต่อ) การทดสอบสูตรสารชีวภัณฑ์ใน*รูปแบบสารละลายเข้มข้น*ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทางดินของมะเขือเทศ

สูตรสารชีวภัณฑ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ[1] (%)		ความกว้างบริเวณใส[1] (มม.)
	S. rolfsii	*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*	*R. solanacearum*
CMM13+NB (C13)	0.00 l	0.00 j	0.00 f
C13SC	0.00 l	0.00 j	0.00 f
C13SR	0.00 l	0.00 j	0.00 f
C13SM	0.00 l	0.00 j	0.00 f
C13PC	0.00 l	0.00 j	0.00 f
C13PR	0.00 l	0.00 j	0.00 f
C13PM	0.00 l	0.00 j	0.00 f
ชุดควบคุม(น้ำกลั่น)	0.00 l	0.00 j	0.00 f
LSD (*P*=0.01)	5.93	4.44	0.23
CV (%)	10.39	7.89	19.73

[1] ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least Significant Difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก จ. ตารางที่ 10-12)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 25 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสารชีวภัณฑ์ใน*รูปแบบสารละลายเข้มข้น*ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท (TKC1, TKC7, TKC10 และ CMM11) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* และ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* โดยวิธี Dual Culture

ก.การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii*

ข.การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

หมายเหตุ T01 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TKC1 ในอาหาร NB

T07 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TKC7 ในอาหาร NB

T10 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TKC10 ในอาหาร NB

C11= เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CMM11 ในอาหาร NB

C13 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CMM13 ในอาหาร NB

SC = สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ supernatant ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และแป้งข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ

SR = สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ supernatant ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และแป้งข้าวเจ้าเป็นส่วนประกอบ

SM= สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ supernatant ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และ Microcrystalline cellulose (MCC) เป็นส่วนประกอบ

PC = สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ pellet ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และแป้งข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ

PR = สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ pellet ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และแป้งข้าวเจ้าเป็นส่วนประกอบ

PM = สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ pellet ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และ MCC เป็นส่วนประกอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 12 การทดสอบสูตรสารชีวภัณฑ์ใน*รูปแบบสารละลายน้ำมัน*ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทางดินของมะเขือเทศ

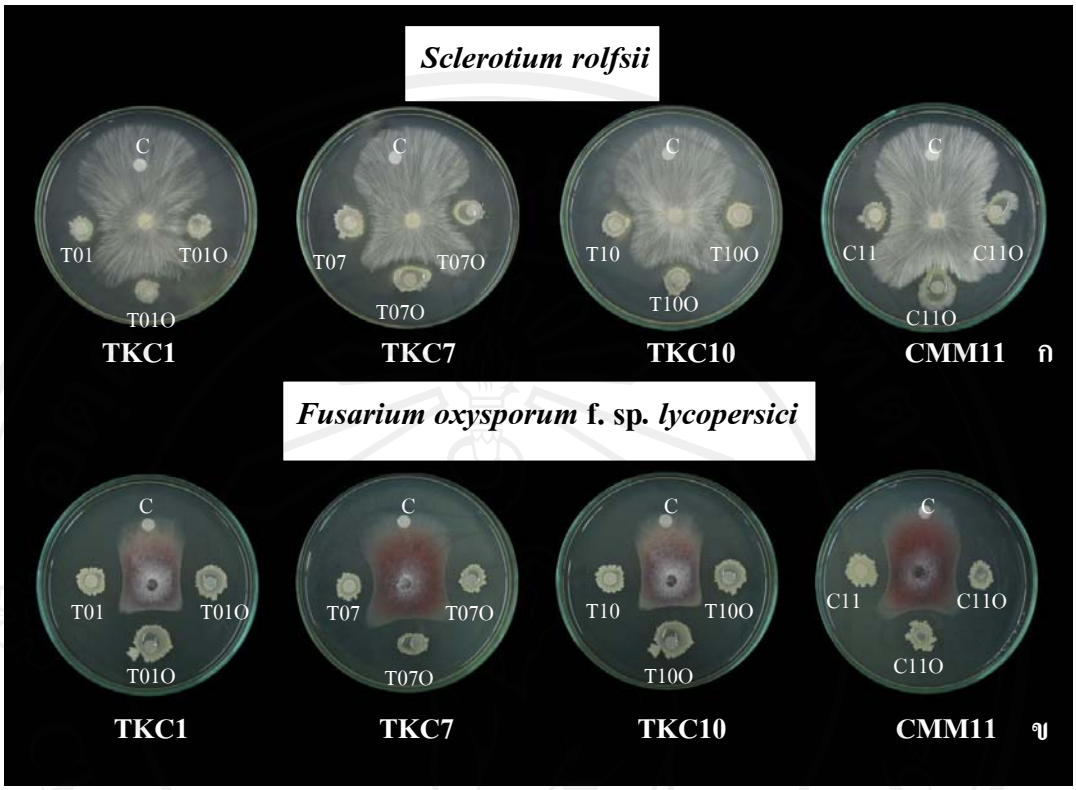
สูตรสารชีวภัณฑ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ[1] (%)		ความกว้างบริเวณใส[1] (มม.)
	S. rolfsii	*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*	*R. solanacearum*
TKC1+NB (T01)	60.33 ab[2]	54.33 bc	1.67 a
T01O	60.00 ab	55.67 ab	0.00 c
TKC7+NB (T07)	63.00 a	51.00 d	1.00 b
T07O	59.33 ab	50.00 d	0.00 c
TKC10+NB (T10)	57.00 b	50.67 d	1.00 c
T10O	59.00 ab	58.00 a	0.00 c
CMM11+NB (C11)	57.00 b	52.00 cd	1.00 b
C11O	58.67 ab	55.67 ab	0.00 c
CMM13+NB (C13)	0.00 c	0.00 e	0.00 c
C13O	0.00 c	0.00 e	0.00 c
ชุดควบคุม(น้ำกลั่น)	0.00 c	0.00 e	0.00 c
LSD(*P*=0.01)	0.15	3.20	0.15
CV (%)	6.37	4.87	26.11

[1] ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least Significant Difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

(ภาคผนวก จ. ตาราง 13-15)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 26 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสารชีวภัณฑ์ใน*รูปแบบสารละลายน้ำมัน*ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท (TKC1, TKC7, TKC10 และ CMM11) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* และ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* โดยวิธี Dual Culture

ก.การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii*

ข.การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

หมายเหตุ T01 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TKC1 ในอาหาร NB

T07 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TKC7 ในอาหาร NB

T10 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TKC10 ในอาหาร NB

C11 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CMM11 ในอาหาร NB

C13 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CMM13 ในอาหาร NB

O = สารชีวภัณฑ์ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5.3 การประเมินความมีชีวิตของสารชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

สารชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้ในรูปแบบผง, สารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมันที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท คือ TKC1, TKC7, TKC10, CMM11 และ CMM13 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง มาทำการทดสอบความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ หลังการผลิต 4-6 เดือน พบว่าสารชีวภัณฑ์ทุกรูปแบบที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทดังกล่าว สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ และสามารถเจริญเติบโตได้ดี (ตาราง 13, ภาพ 27)

ตาราง 13 ระดับความมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลทในสารชีวภัณฑ์รูปแบบผง สารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมัน

สูตรสารชีวภัณฑ์		ระดับความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสารชีวภัณฑ์		
รูปแบบ	**ชื่อสูตร**	**4 เดือน**	**5 เดือน**	**6 เดือน**
ผง	T01C	+++	+++	+++
	T01R	+++	+++	+++
	T01M	+++	+++	+++
	T07C	+++	+++	+++
	T07R	+++	+++	+++
	T07M	+++	+++	+++
	T10C	+++	+++	+++
	T10R	+++	+++	+++
	T10M	+++	+++	+++
	C11C	+++	+++	+++
	C11R	+++	+++	+++
	C11M	+++	+++	+++
	C13C	+++	+++	+++
	C13R	+++	+++	+++
	C13M	+++	+++	+++
สารละลายเข้มข้น	T01SC	+++	+++	+++
	T01SR	+++	+++	+++
	T01SM	+++	+++	+++
	T01PC	+++	+++	+++
	T01PR	+++	+++	+++
	T01PM	+++	+++	+++
	T07SC	+++	+++	++
	T07SR	+++	+++	+++

(ต่อ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

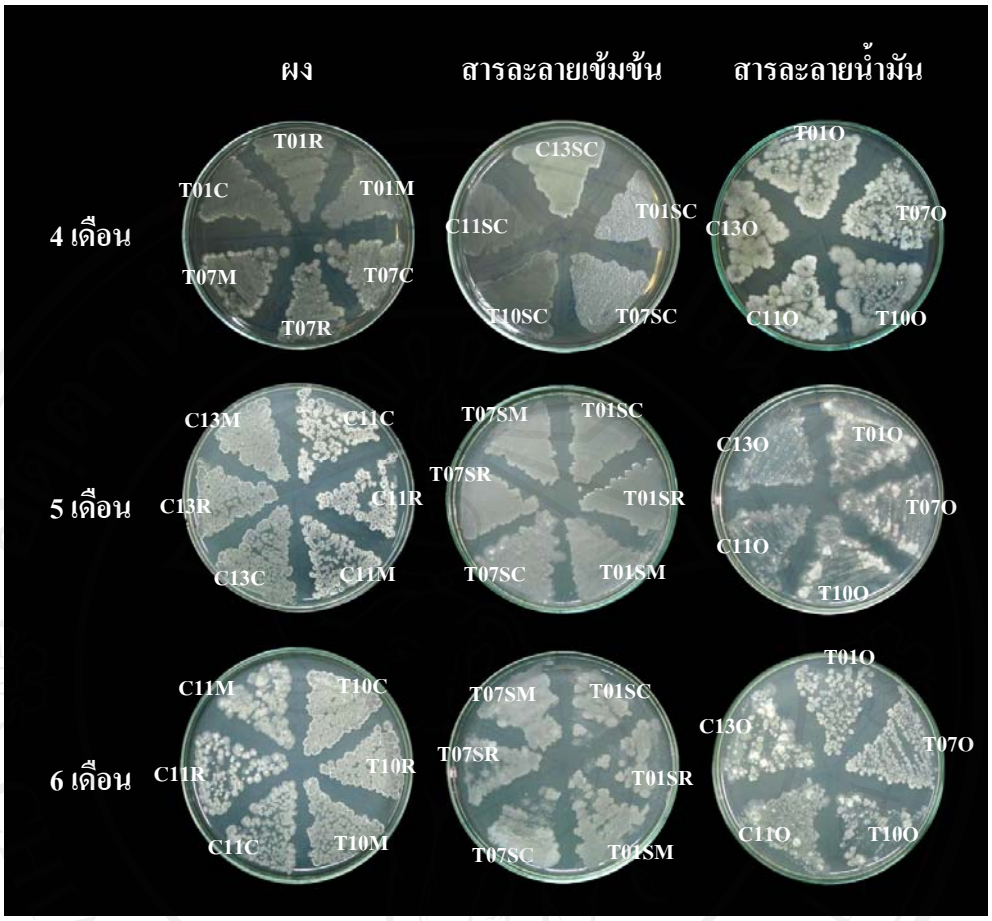
ตาราง 13 (ต่อ) ระดับความมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลทในสารชีวภัณฑ์รูปแบบผงสารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมัน

สูตรสารชีวภัณฑ์		ระดับความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสารชีวภัณฑ์		
รูปแบบ	**ชื่อสูตร**	**4 เดือน**	**5 เดือน**	**6 เดือน**
สารละลายเข้มข้น	T07PC	+++	+++	+++
	T07PR	+++	+++	++
	T07PM	+++	+++	+++
	T10SC	+++	+++	+++
	T10SR	+++	+++	+++
	T10SM	+++	+++	+++
	T10PC	+++	+++	++
	T10PR	+++	+++	+++
	T10PM	+++	+++	+++
	C11SC	+++	+++	+++
	C11SR	+++	+++	++
	C11SM	+++	+++	+++
	C11PC	+++	+++	++
	C11PR	+++	+++	++
	C11PM	+++	+++	+++
	C13SC	+++	+++	++
	C13SR	+++	+++	+++
	C13SM	+++	+++	+++
	C13PC	+++	+++	++
	C13PR	+++	+++	++
	C13PM	+++	+++	++
		+++	+++	+++
สารละลายน้ำมัน	T01O	+++	+++	+++
	T07O	+++	+++	+++
	T10O	+++	+++	+++
	C11O	+++	+++	+++
	C13O	+++	+++	+++

หมายเหตุ +++ มีชีวิตรอดมากกว่า 75-100 เปอร์เซ็นต์

++ มีชีวิตรอดมากว่า 50-75 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 27 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสารชีวภัณฑ์รูปแบบผง หลังจากการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง และรูปแบบสารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมัน หลังจากการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 6 เดือน บนอาหาร NA

หมายเหตุ T01 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TKC1 C11 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CMM11
T07 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TKC7 C13 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CMM13
T10 = เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท TKC10
C = สารชีวภัณฑ์ที่มีแป้งข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ
R = สารชีวภัณฑ์ที่มีแป้งข้าวเจ้าเป็นส่วนประกอบ
M = สารชีวภัณฑ์ที่มี Microcrystalline cellulose (MCC) เป็นส่วนประกอบ
SC = สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ supernatant ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และแป้งข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ
SR = สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ supernatant ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และแป้งข้าวเจ้าเป็นส่วนประกอบ
SM = สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ pellet ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และ MCC เป็นส่วนประกอบ
PC = สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ pellet ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และแป้งข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ
PR = สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ pellet ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และแป้งข้าวเจ้าเป็นส่วนประกอบ
PM = สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ supernatant ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และ MCC เป็นส่วนประกอบ
O = สารชีวภัณฑ์ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคทางดินของมะเขือเทศในสภาพเรือนทดลอง

คัดเลือกสารชีวภัณฑ์สูตร T01R มาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *S. rolfsii*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* และเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยทำการทดสอบบนต้นมะเขือเทศอายุ 40 วัน และประเมินความเสียหายของโรคโดยวัดระดับความรุนแรงในการเกิดโรค เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีโดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ พบว่าหลังการปลูกเชื้อรา *S. rolfsii* ลงบริเวณโคนต้นมะเขือเทศชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุอย่างเดียวให้ระดับการเกิดโรคสูงสุดเป็น 4.77 รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้สารชีวภัณฑ์ T01R ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ 3 วัน และกรรมวิธีที่ใช้สารชีวภัณฑ์ T01R หลังการปลูกเชื้อสาเหตุ 3 วัน ที่มีระดับการเกิดโรคเป็น 2.04 และ 2.70 ตามลำดับ พบว่าทั้งสองกรรมวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* พบว่าหลังการปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ลงบริเวณโคนต้นมะเขือเทศ ชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุอย่างเดียวให้ระดับการเกิดโรคสูงสุดเป็น 3.61 รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้สารชีวภัณฑ์ T01R หลังการปลูกเชื้อสาเหตุ 3 วัน และกรรมวิธีที่ใช้สารชีวภัณฑ์ T01R ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ 3 วัน ที่มีระดับการเกิดโรคเป็น 2.19 และ 1.97 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ และการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าหลังการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* ลงบริเวณโคนต้นมะเขือเทศ ชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อสาเหตุอย่างเดียวให้ระดับการเกิดโรคสูงสุดเป็น 4.51 รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้สารชีวภัณฑ์ T01R หลังการปลูกเชื้อสาเหตุ 3 วัน และกรรมวิธีที่ใช้สารชีวภัณฑ์ T01R ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ 3 วัน ที่มีระดับการเกิดโรคเป็น 2.42 และ 2.38 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการใช้สารชีวภัณฑ์ก่อนหรือหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคก็มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ในขณะที่ชุดควบคุมปกติที่มีน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว ส่วนประกอบของสารชีวภัณฑ์ที่ไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ และสารชีวภัณฑ์ T01R เพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการปลูกเชื้อสาเหตุลงบนต้นมะเขือเทศแสดงอาการปกติในแต่ละกรรมวิธี (ตาราง 14, ภาพ 28-30)

สำหรับสารชีวภัณฑ์รูปแบบผงสูตร C13R พบว่ามีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ดี คือมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเตสได้ เมื่อนำมาทดสอบกับต้นมะเขือเทศอายุ 30 วัน พบว่าไม่ทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติ และช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นมะเขือเทศได้ดี เมื่อทำการวัดความสูงของต้นมะเขือเทศ น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ภายหลังจากการใช้สารชีวภัณฑ์ C13R 28 วัน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ใช้สารชีวภัณฑ์ C13R ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ ซึ่งให้ความสูงของต้นเป็น 39.70 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมน้ำกลั่นที่ให้ความสูงเป็น 27.36 เซนติเมตร ส่วนน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่าในกรรมวิธีที่ใช้สารชีวภัณฑ์ C13R ต้นมะเขือเทศมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 1.91 และ 0.26 กรัม ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมน้ำกลั่นต้นมะเขือเทศมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 1.39 และ 0.16 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 15, ภาพ 31)

ตาราง 14 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรสารชีวภัณฑ์ T01R ในการควบคุมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง และเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศในสภาพโรงเรือน

กรรมวิธี	ระดับการเกิดโรค[1]		
	S. rolfsii	*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*	*R. solanacearum*
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	1.00 d[2]	1.00 c	1.00 c
ส่วนประกอบของสารชีวภัณฑ์ไม่มีแบคทีเรียปฏิปักษ์	1.00 d	1.00 c	1.00 c
เชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียว	4.77 a	3.61 a	4.51 a
สารชีวภัณฑ์ T01R	1.00 d	1.00 c	1.00 c
สารชีวภัณฑ์ T01R ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ	2.04 c	1.97 b	2.38 b
สารชีวภัณฑ์ T01R หลังการปลูกเชื้อสาเหตุ	2.70 b	2.19 b	2.42 b
LSD (*P*=0.01)	0.36	0.40	0.35
CV (%)	39.56	51.44	39.39

[1] ค่าเฉลี่ยเกิดจาก 35 ซ้ำๆละ 2 ต้น

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Least Significant Difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก จ. ตาราง 16-18)

หมายเหตุ การวัดค่าความรุนแรงของโรค

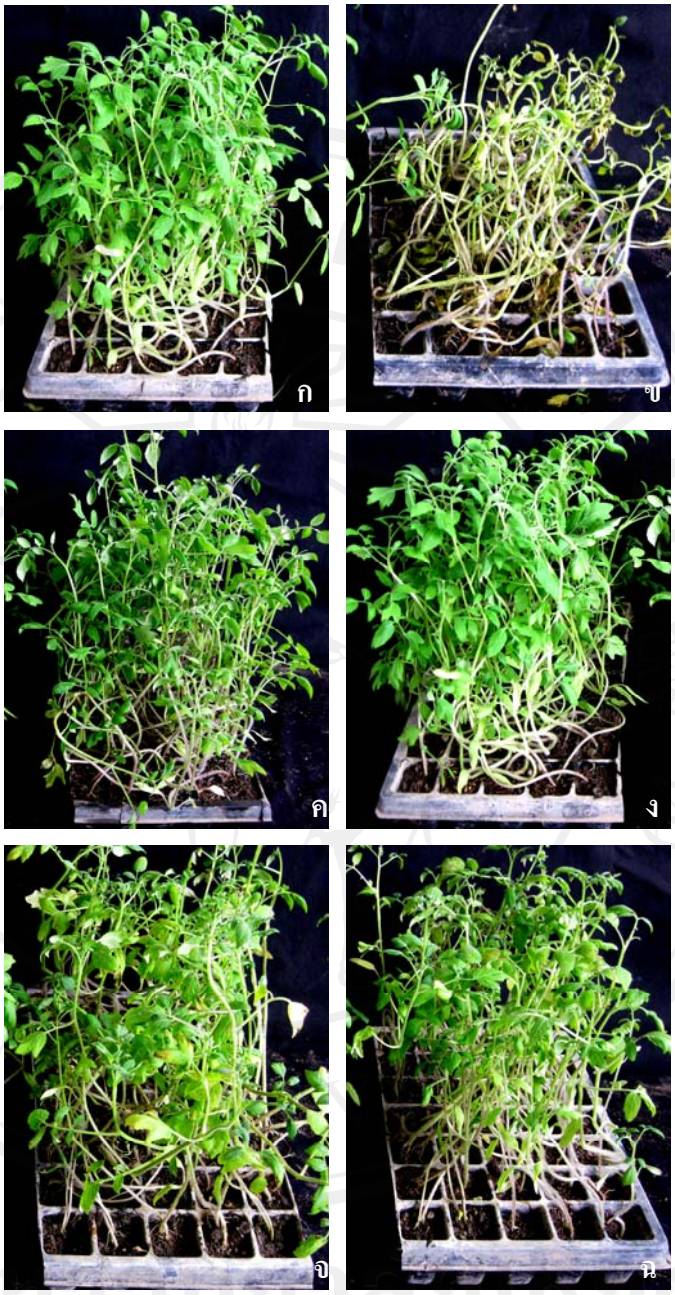
ระดับ 1 หมายถึง 0%	ไม่แสดงอาการ (แผลที่โคนต้น หรือเหี่ยว)
ระดับ 2 หมายถึง 1-25%	เริ่มแสดงอาการ
ระดับ 3 หมายถึง 26-50%	แสดงอาการของโรคชัดเจน
ระดับ 4 หมายถึง 51-75%	แสดงอาการของโรครุนแรง
ระดับ 5 หมายถึง มากกว่า 76%	แสดงอาการของโรครุนแรงมากจนกระทั่งตาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 28 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรสารชีวภัณฑ์ T01R หลังจากการใช้ 7 วัน ในการควบคุมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า บนต้นมะเขือเทศอายุ 40 วัน ในแต่ละกรรมวิธี

ก. ชุดควบคุมน้ำกลั่น
ข. ปลูกเชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียว
ค. ส่วนประกอบสารชีวภัณฑ์ไม่มีแบคทีเรีย
ง. สารชีวภัณฑ์ T01R
จ. สารชีวภัณฑ์ T01R ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ
ฉ. สารชีวภัณฑ์ T01R หลังการปลูกเชื้อสาเหตุ

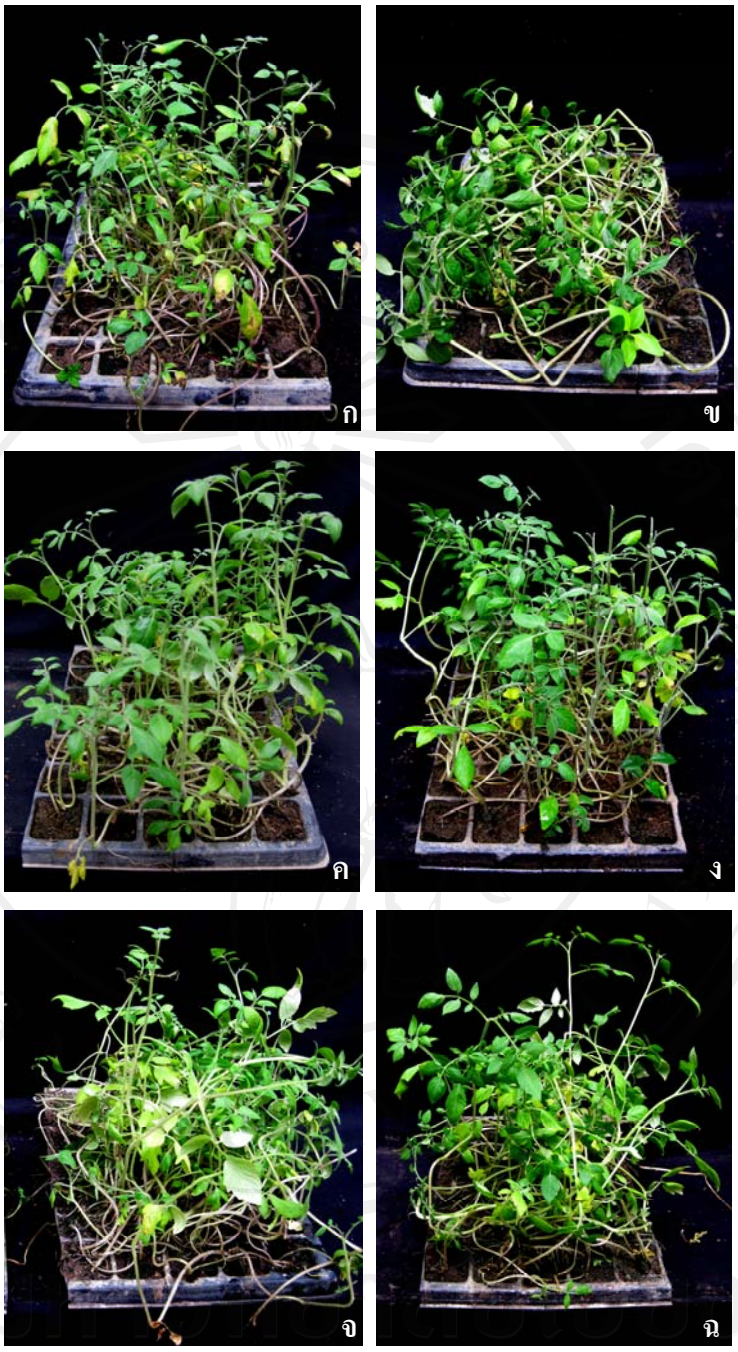
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 29 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรสารชีวภัณฑ์ T01R หลังจากการใช้ 22 วัน ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง บนต้นมะเขือเทศอายุ 65 วัน ในแต่ละกรรมวิธี

ก. ชุดควบคุมน้ำกลั่น
ข. ปลูกเชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียว
ค. ส่วนประกอบสารชีวภัณฑ์ไม่มีแบคทีเรีย
ง. สารชีวภัณฑ์ T01R
จ. สารชีวภัณฑ์ T01R ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ
ฉ. สารชีวภัณฑ์ T01R หลังการปลูกเชื้อสาเหตุ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 30 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรสารชีวภัณฑ์ T01R หลังจากการใช้ 22 วัน ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียว บนต้นมะเขือเทศอายุ 65 วัน ในแต่ละกรรมวิธี

ก. ชุดควบคุมน้ำกลั่น
ข. ปลูกเชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียว
ค.ส่วนประกอบสารชีวภัณฑ์ไม่มีแบคทีเรีย
ง. สารชีวภัณฑ์ T01R
จ. สารชีวภัณฑ์ T01R ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ
ฉ. สารชีวภัณฑ์ T01R หลังการปลูกเชื้อสาเหตุ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 15 เปรียบเทียบความสูง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของต้นมะเขือเทศในชุดควบคุม และหลังการใช้สูตรสารชีวภัณฑ์รูปแบบผงสูตรC13R ราดบริเวณโคนต้น 28 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์	ความสูงของต้น (เซนติเมตร)[1]	น้ำหนักสด (กรัม)[1]	น้ำหนักแห้ง (กรัม)[1]
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	27.36 b[2]	1.39 b	0.16 b
สารชีวภัณฑ์ C13R1	39.70 a	1.91 a	0.26 a
LSD (*P*=0.01)	1.82	0.15	0.02
CV (%)	12.31	20.61	24.72

[1] ค่าเฉลี่ยเกิดจาก 35 ซ้ำ ๆละ 2 ต้น

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Least Significant Difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์
(ภาคผนวก จ. ตาราง 19-21)

ภาพ 31 เปรียบเทียบต้นมะเขือเทศในชุดควบคุมและหลังจากใช้สูตรสารชีวภัณฑ์รูปแบบผงสูตร C13R
ก. ชุดควบคุมน้ำกลั่น
ข. ราดด้วยสารชีวภัณฑ์รูปแบบผงสูตร C13R

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.7 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และตรวจสอบตำแหน่งของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม

4.7.1 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทางดิน คือไอโซเลท TKC1 มาทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API CH 50 kit (API, Bio – Merieux, France) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKC1 คือเชื้อ *B. subtilis*/amyloliquefaciens โดยมีค่า similarity 99.2 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) โดยเชื้อ *Bacillus* เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยก่อผลกระทบน้อยมากต่อคน สัตว์ และพืช สามารถเข้าทำลายได้โดยตรง และสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ในขณะเดียวกันก็สามารถแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน และมีความสามารถในการปรับตัว ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แปรเปลี่ยนและวิกฤต โดยการสร้างสปอร์และทนต่ออากาศร้อนชื้นได้เป็นอย่างดี (Visual Unlimited, Inc., 2009)

4.7.2 การตรวจสอบตำแหน่งของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม

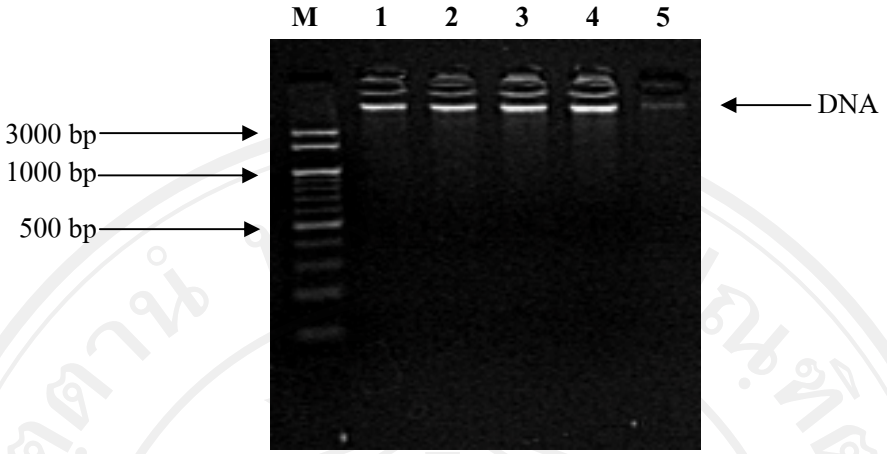
4.8.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้คัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อสาเหตุโรคทางดินของมะเขือเทศ และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ดี ทั้ง 5 ไอโซเลท คือ TKC1, TKC7, TKC10, CMM11 และCMM13 แล้วนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยวิธี agarose gel electrophoresis (ภาพ 32) จากภาพแถบดีเอ็นเอที่ได้ แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีปริมาณมากและมีคุณภาพดี

4.8.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขั้นต้นมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ เพื่อตรวจสอบตำแหน่งของยีนที่สร้างสาร subtilosin โดยใช้ sboAFwd (forward primer) (5’ CGCGCAAGTAGTC GATTTCTAACA 3’) และ sboARev (reverse primer) (5’ CGCGCAAGTAGTCGATTTCTAACA 3’) นำมาทำ Gradient PCR โดยทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมจากการปรับอุณหภูมิของปฏิกิริยาในขั้นตอน annealing ให้อยู่ระหว่างระหว่าง 30-50 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าสภาวะในขั้นตอน annealing ที่เหมาะสมคือ 42 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตของพีซีอาร์ที่ชัดเจนขนาดประมาณ 1500 bp พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKC1, TKC10 และ CMM11 อาจมีตำแหน่งของยีนที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



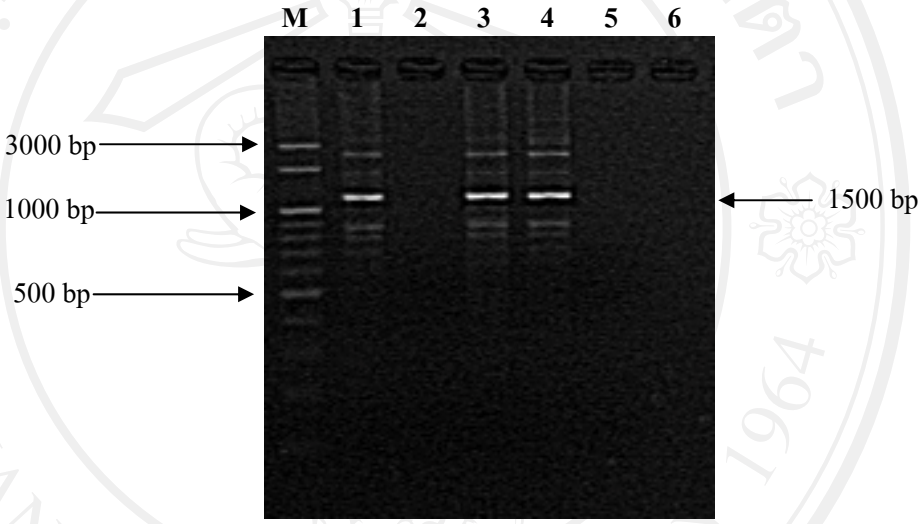
ภาพ 32 Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของ total DNA ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท (TKC1, TKC7, TKC10, CMM1 และ CMM13)

แถวที่ M = DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder
แถวที่ 1 = ไอโซเลท TKC1
แถวที่ 2 = ไอโซเลท TKC7
แถวที่ 3 = ไอโซเลท TKC10
แถวที่ 4 = ไอโซเลท CMM11
แถวที่ 5 = ไอโซเลท CMM13

สร้างสาร subtilosin โดยให้ผลผลิตของพีซีอาร์ที่ชัดเจนขนาดประมาณ 1500 bp (ภาพ 33) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Babasaki *et al.* ในปี 1985 กล่าวว่า *B. subtilis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ subtilosin ได้ ซึ่งมีฤทธิ์เป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์หลายชนิด โดยมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำให้กรดอะมิโน และฟอสเฟตภายในเซลล์แบคทีเรียและอิออนต่าง ๆที่เป็นอิเลคโตรไลท์ ที่ใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ผิดปกติ (Sathiah *et al.,* 2005) โดยเชื้อในจีนัส *Bacillus* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะมากกว่า 167 ชนิด (Berdy, 1974) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารโพลีเปปไทด์ บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ได้แก่ *B. subtilis* ผลิตสารปฏิชีวนะเปปไทด์ได้ 66 ชนิด และ *B. brevis* ผลิตได้ 23 ชนิด (Katz and Dermain, 1977 ; Lee *et al*., 2007) ที่มีฤทธิ์ต่อต้านจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ปรสิต และแมลง (Aliniazee, 1998; Kugler and Turvey, 1987; Lebbadi *et al*., 1994; Munimbazi and Bullerman, 1998) การสร้างสารเหล่านี้ของ *Bacillus* อาจมีความสำคัญมากต่อการอยู่รอดของเชื้อในระบบนิเวศน์ เนื่องจากสารเหล่านี้ถูกสร้างขึ้นในสภาวะต่างๆ เช่น สภาวะที่ขาดแคลนอาหาร (nutritional stress) โดยจะถูกสร้างจากแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ stationary phase โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะเริ่มมีการสร้างสปอร์ extracellular enzyme และสารปฏิชีวนะ (Losick and Youngman, 1984) ทำให้เกิดการแข่งขันเพื่อความอยู่รอดในสภาวะที่มีอาหารจำกัด (Katz and Demain, 1997) เพื่อปรับตัวเองให้มีชีวิตรอดในสภาพแวดล้อม การสร้างสารปฏิชีวนะของ *Bacillus* เกิดจากความจำเป็นต้องแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Zuber *et al*., 1993) และอาจเป็นสารที่ทำหน้าที่เป็นสัญญาณ (intercellular signals) ที่ส่งต่อกันเป็นลำดับให้ตอบสนองต่อสิ่งเร้าในสภาวะแวดล้อม และการผลิตสารทั้งหมดถูกควบคุมโดยยีน(Losick and Youngman, 1984)



ภาพ 33 Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มประมาณด้วย specific primers sboAFwd / sboARev ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท (TKC1, TKC7, TKC10, CMM1 และ CMM13)

แถวที่ M = DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder
แถวที่ 1 = ไอโซเลท TKC1
แถวที่ 2 = ไอโซเลท TKC7
แถวที่ 3 = ไอโซเลท TKC10
แถวที่ 4 = ไอโซเลท CMM11
แถวที่ 5 = ไอโซเลท CMM13
แถวที่ 6 = น้ำกลั่น (negative control)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved