

ผลการวิจัย (Results)

1. การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างดินจำนวน 30 ตัวอย่างจากแหล่งที่มีไคดิน-ไคโตซานสะสมอยู่ โดยตัวอย่างดินที่เก็บเป็นดินที่สันนิษฐานว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายไคตินได้ รายละเอียดของตัวอย่างดิน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ตำแหน่งและลักษณะของตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ

อันดับตัวอย่างดิน และแหล่งที่เก็บ	ลักษณะการใช้ดิน	สีของดิน	ลักษณะของเนื้อดิน จากการสัมผัส	ปริมาณอินทรีย์ วัตถุที่ดูจากสายตา
จังหวัดราชบุรี				
1.ดินจอมปลวกใต้ต้นมะพร้าว	ทำไร่	สีน้ำตาล	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืชและใบไม้
2.ดินชายป่า	ป่า	สีน้ำตาลดำ	เนื้อละเอียด	มีรากพืชและใบไม้
3.ดินบริเวณรากต้นมะม่วง	สวนมะม่วง	สีน้ำตาล	ดินร่วนแข็ง ก้อนเล็กๆ	มีรากพืชและใบไม้
4.ดินจอมปลวกใต้ต้นขนุน	สวนขนุน	สีน้ำตาล	ดินร่วนแข็ง ก้อนเล็กๆ	มีรากพืชและใบไม้
5.ดินจอมปลวกใต้ต้นมะพร้าว	สวนผลไม้	สีน้ำตาล	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืชและใบไม้
6.ดินจอมปลวกใต้ต้นมะม่วง	สวนมะม่วง	สีน้ำตาล	ดินร่วนแข็งก้อนเล็กๆ	มีรากพืชและใบไม้
7.ดินจอมปลวกใต้ต้นปาล์ม	สวนผลไม้	สีน้ำตาล	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืชและใบไม้
8.ดินจอมปลวกใกล้ขอนไม้ฝุ่	สวนผลไม้	สีน้ำตาล	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืชและใบไม้
9.ดินจอมปลวกในอุทยาน	วนอุทยาน	สีน้ำตาลดำ	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีเศษใบไม้
10.ดินจอมปลวกในอุทยาน	วนอุทยาน	สีน้ำตาล	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืช เศษใบไม้
11.ดินจอมปลวกใต้ต้นส้มโอ	สวนผลไม้	สีน้ำตาล	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืช เศษใบไม้
12.ดินจอมปลวกใต้ต้นกระเทียม	สวนผลไม้	สีน้ำตาล	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืช เศษใบไม้
13.ดินจากวนอุทยาน	วนอุทยาน	สีน้ำตาล	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืช เศษใบไม้
14.ดินจากน้ำตก	วนอุทยาน	สีน้ำตาล	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืช เศษใบไม้
จังหวัดลพบุรี				
15.ดินจากไร่พริก	ทำไร่พริก	สีน้ำตาลดำ	ดินร่วนแข็งก้อนเล็กๆ	มีรากพืช เศษใบไม้
จังหวัดกาญจนบุรี				
16.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาล	ดินร่วนปนทราย	มีเศษรากพืช ใบไม้
17.ดินจอมปลวก น้ำตกเอราวัณ	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลดำ	ดินร่วนปนทราย	มีรากพืชเศษไม้
18.ดินจอมปลวก ต้นน้ำตก	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลดำ	ดินแข็ง ร่วนปนทราย	มีรากพืช เศษใบไม้
19.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลเข้ม	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืช เศษไม้
20.ดินจอมปลวก ต้นน้ำตก	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลดำ	ดินจับตัวเป็นก้อน	มีรากพืช เศษใบไม้
21.ดินจอมปลวก ต้นน้ำตก	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลดำ	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืช เศษใบไม้
22.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลดำ	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืช เศษไม้

ตารางที่ 1. (ต่อ) ตำแหน่งและลักษณะของตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ

อันดับตัวอย่างดิน และแหล่งที่เก็บ	ลักษณะการใช้ดิน	สีของดิน	ลักษณะของเนื้อดิน จากการสัมผัส	ปริมาณอินทรีย์ วัตถุที่ดูจากสายตา
จังหวัดกาญจนบุรี				
16.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลเข้ม	ดินร่วนปนทราย	มีเศษรากพืช ใบไม้
17.ดินน้ำตก เอราวัณ	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลดำ	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืช เศษไม้
18.ดินจอมปลวก ด่านน้ำตก	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลดำ	ดินแข็ง ร่วนปนทราย	มีรากพืชเศษใบไม้
19.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลเข้ม	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืช เศษไม้
20.ดินจอมปลวก ด่านน้ำตก	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลดำ	ดินจับตัวเป็นก้อนๆ	มีรากพืช เศษใบไม้
21.ดินจอมปลวก ด่านน้ำตก	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลดำ	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืช เศษใบไม้
22.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลเข้ม	ดินร่วนเนื้อละเอียด	มีรากพืช เศษไม้
23.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลเข้ม	ดินร่วนปนทราย	มีรากพืช เศษใบไม้
24.ดินจอมปลวก ริสอร์ทเรือนน้ำ	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลเข้ม	ดินร่วนปนทรายเนื้อ ละเอียด	มีรากพืช เศษใบไม้
25.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลเข้ม	ดินร่วนปนทราย	มีรากพืชเศษใบไม้
จังหวัดสุโขทัย				
26.ดินสวนผักคะน้า อ.ศรีสำโรง	ทำสวนผัก	สีน้ำตาลดำ	เป็นก้อน เหนียว	มีรากพืชเศษใบไม้
27.ดินจอมปลวก อ.ศรีสำโรง	ไม่ได้ทำเกษตรกรรม	สีน้ำตาลแดง	ดินร่วนปนทราย	มีเศษซากปลวก
28.ดินจอมปลวก อ.ศรีสำโรง	สีน้ำตาลดำ	สีน้ำตาลแดง	ดินร่วนปนทราย	มีรากพืชเศษใบไม้
กรุงเทพมหานคร				
29.ดินจอมปลวก เขตบางกระดี	สีน้ำตาลดำ	สีน้ำตาลดำ	ดินร่วนปนทรายเนื้อ ละเอียด	มีเศษใบไม้
30.ดินป่าชายเลน อ.บางขุนเทียน	ป่าโกงกาง	สีน้ำตาลดำ	โคลน	มีรากพืช เศษใบไม้

2. การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซิที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไลตินจากตัวอย่างดิน

จากตัวอย่างดิน 30 ตัวอย่างสามารถคัดแยกแอคติโนมัยซิที่ย่อยสลาย colloidal chitin ในอาหาร Colloidal chitin agar ได้จำนวนทั้งสิ้น 51 ไอโซเลท ดังแสดงผลในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. จุลินทรีย์ย่อยสลายไคตินจากตัวอย่างดินจากแหล่งดินที่มีไคตินสะสม

ตัวอย่างดิน	Chitinolytic actinomycetes isolate
1.ดินจอมปลวกใต้ต้นมะพร้าว	CS15
2.ดินชายป่า	CS20.1, CS20.2, CS20.3
3.ดินบริเวณรากต้นมะม่วง	CS21.1, CS 21.2, CS21.3
4.ดินจอมปลวกใต้ต้นขนุน	CS22.1
5.ดินจอมปลวกใต้ต้นมะพร้าว	CS23.1, CS 23.2, CS23.3
6.ดินจอมปลวกใต้ต้นมะม่วง	CS24.1
7.ดินจอมปลวกใต้ต้นปาล์ม	CS25.1, CS 25.2, CS25.3
8.ดินจอมปลวกใกล้โคนไม้ฝู	CS26.1, CS 26.2, CS26.3
9.ดินจอมปลวกในอุทยาน	CS27.1
10.ดินจอมปลวกในอุทยาน	CS28.2, CS 28.3, CS28.4, CS 28.5
11.ดินจอมปลวกใต้ต้นส้มโอ	CS30.1
12.ดินจอมปลวกใต้ต้นกระท้อน	CS34.1, CS35.1
13.ดินจากวนอุทยาน	CS36.1
14.ดินจากน้ำตก	CS37.1
15.ดินจากไร่พริก	CS38.1
16.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	CS39.1
17.ดินจอมปลวกน้ำตกเอราวัณ	CS40.1
18.ดินจอมปลวก ต้นน้ำตก	CS41.1
19.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	C2.2
20.ดินจอมปลวก ต้นน้ำตก	C5.2
21.ดินจอมปลวก ต้นน้ำตก	C8.2
22.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	C9.3
23.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	P2.2, P2.3, P2.4
24.ดินจอมปลวก รีสอร์ทเรือน้ำ	S22
25.ดินจอมปลวก อ.ศรีสวัสดิ์	P9.2, P9.3
26.ดินสวนผักคะน้า อ.ศรีสำโรง	BB1, BB2
27.ดินจอมปลวก อ.ศรีสำโรง	S1
28.ดินจอมปลวก อ.ศรีสำโรง	BP1
29.ดินจอมปลวก เขตบางกระดี กทม	BS1, BS2, BS3
30.ดินป่าชายเลน อ.บางขุนเทียน กทม	S9, S24, S32

3. ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของแอคติโนมัยซิฟที่คัดแยกได้

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของแอคติโนมัยซิฟที่คัดแยกได้จากข้อ 2 ในการย่อยสลายคอลลอยคอลลไคตินบน Colloidal chitin agar อ่านผลโดยการย้อมด้วยสี Congo red คอลลอยคอลลไคตินที่ไม่ถูกย่อยจะติดสีแดง ส่วนที่ถูกย่อยสลายจะไม่มีสี ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อโดยเปรียบเทียบสัดส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณไฮรอลโคโลนี (cz) ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อ (cs) ผลแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3. ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของแอคติโนมัยซิฟ (อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนไฮรอลต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี: cz/cs บน Colloidal chitin agar)

Isolate No.	Chitinolytic activity (cz/cs)	Isolate No.	Chitinolytic activity (cz/cs)	Isolate No.	Chitinolytic activity (cz/cs)
CS15	1.25	CS26.3	1.40	C8.2	3.00
CS20.1	1.13	CS27.1	1.40	C9.3	3.00
CS20.2	1.10	CS28.2	1.50	P2.2	2.00
CS20.3	1.10	CS28.3	1.20	P2.3	3.00
CS21.1	1.50	CS28.4	1.00	P2.4	2.50
CS21.2	1.10	CS28.5	1.00	S22	3.10
CS21.3	2.17	CS30.1	2.00	P9.2	2.50
CS22.1	1.10	CS34.1	1.10	P9.3	1.75
CS23.1	2.40	CS35.1	1.10	BB1	1.20
CS23.2	1.13	CS36.1	1.80	BB2	1.20
CS23.3	1.30	CS37.1	1.00	S1	3.10
CS24.1	2.40	CS38.1	1.00	BS1	2.00
CS25.1	1.13	CS39.1	1.00	BS2	2.20
CS25.2	1.17	CS40.1	1.50	BS3	2.00
CS25.3	1.67	CS41.1	1.25	S9	1.00
CS26.1	1.00	C2.2	2.50	S24	2.00
CS26.2	1.13	C5.2	3.00	S32	2.10



4. ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคโตซานของแอคติโนมัยซิที่คัดแยกได้

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของแอคติโนมัยซิที่คัดแยกได้จากข้อ 2 ในการย่อยสลายคอลลอยคอลลไคโตซานบน Colloidal chitosan agar อ่านผลโดยการย้อมด้วยสี Congo red คอลลอยคอลลไคตินที่ไม่ถูกย่อยจะติดสีแดง ส่วนที่ถูกย่อยสลายจะไม่มีสี ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อโดยเปรียบเทียบสัดส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี (cz) ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อ (cs) ผลแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4. ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคโตซานของแอคติโนมัยซิ (อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี: cz/cs บน Colloidal chitosan agar)

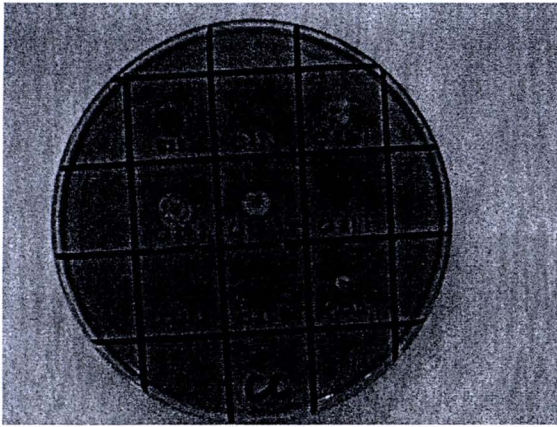
Isolate No.	Chitosan hydrolysis activity (cz/cs)	Isolate No.	Chitosan hydrolysis activity (cz/cs)	Isolate No.	Chitosan hydrolysis activity (cz/cs)
CS15	1.25	CS26.3	1.40	C8.2	3.00
CS20.1	1.50	CS27.1	1.40	C9.3	3.00
CS20.2	1.53	CS28.2	1.50	P2.2	2.00
CS20.3	1.45	CS28.3	1.20	P2.3	3.00
CS21.1	1.50	CS28.4	1.00	P2.4	2.50
CS21.2	1.10	CS28.5	1.00	S22	1.61
CS21.3	2.17	CS30.1	2.00	P9.2	2.50
CS22.1	1.00	CS34.1	1.00	P9.3	1.75
CS23.1	2.40	CS35.1	1.00	BB1	1.20
CS23.2	1.13	CS36.1	1.80	BB2	1.20
CS23.3	1.30	CS37.1	1.00	S1	3.10
CS24.1	2.40	CS38.1	1.00	BS1	2.00
CS25.1	1.13	CS39.1	1.00	BS2	2.20
CS25.2	1.17	CS40.1	1.30	BS3	2.00
CS25.3	1.67	CS41.1	1.25	S9	1.00
CS26.1	1.00	C2.2	1.20	S24	2.00
CS26.2	1.13	C5.2	3.00	S32	2.10

5. ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแอคติโนมัยซิฟที่ย่อยสลายไคตินที่คัดแยกได้

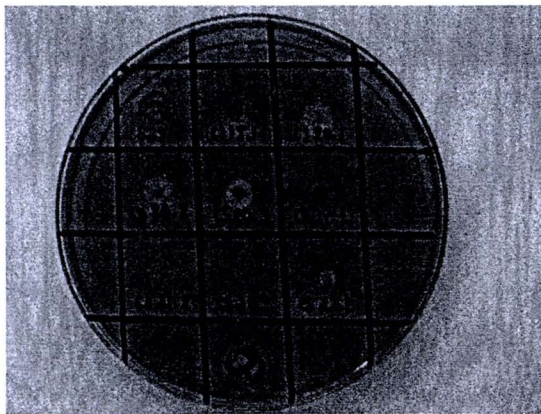
เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของแอคติโนมัยซิฟที่คัดแยกได้จากข้อ 2 ในการย่อยสลาย carboxyl methylcellulose (CMC) บน CMC agar อ่านผลโดยการย้อมด้วยสี Congo red CMC ที่ไม่ถูกย่อยจะติดสีแดง ส่วนที่ถูกย่อยสลายจะไม่มีสี ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อโดยเปรียบเทียบสัดส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณไฮรอปโคโลนี (cz) ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อ (cs) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ใช้ค่าเฉลี่ย ผลแสดงในตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าแอคติโนมัยซิฟที่ย่อยสลายไคตินได้มักจะมีการย่อยสลายเซลลูโลสได้

ตารางที่ 5. ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแอคติโนมัยซิฟ (อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนไฮรอปต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี: cz/cs บน CMC agar)

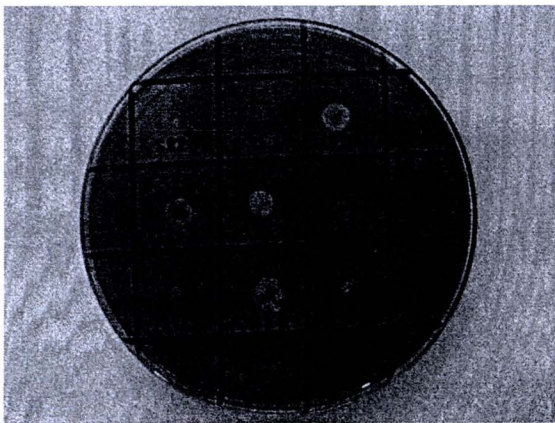
Isolate No.	Cellulolytic activity (cz/cs)	Isolate No.	Cellulolytic activity (cz/cs)	Isolate No.	Cellulolytic activity (cz/cs)
CS15	5.00	CS26.3	6.67	C8.2	1.20
CS20.1	2.00	CS27.1	3.80	C9.3	1.50
CS20.2	1.71	CS28.2	6.00	P2.2	2.33
CS20.3	1.86	CS28.3	1.75	P2.3	3.67
CS21.1	1.86	CS28.4	4.60	P2.4	5.50
CS21.2	3.00	CS28.5	2.00	S22	6.00
CS21.3	3.13	CS30.1	3.25	P9.2	3.50
CS22.1	2.00	CS34.1	2.55	P9.3	4.00
CS23.1	3.00	CS35.1	2.55	BB1	1.20
CS23.2	1.67	CS36.1	1.40	BB2	6.00
CS23.3	2.50	CS37.1	1.00	S1	2.67
CS24.1	2.00	CS38.1	1.71	BS1	6.00
CS25.1	3.80	CS39.1	3.67	BS2	4.28
CS25.2	1.40	CS40.1	1.00	BS3	5.00
CS25.3	6.67	CS41.1	4.00	S9	1.00
CS26.1	5.25	C2.2	1.20	S24	2.00
CS26.2	5.25	C5.2	6.50	S32	2.80



รูปที่ 3. ตัวอย่างการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของแอคติโนมัยซีทส์บน Colloidal chitin agar อ่านผลโดยย้อมด้วยสี Congo red



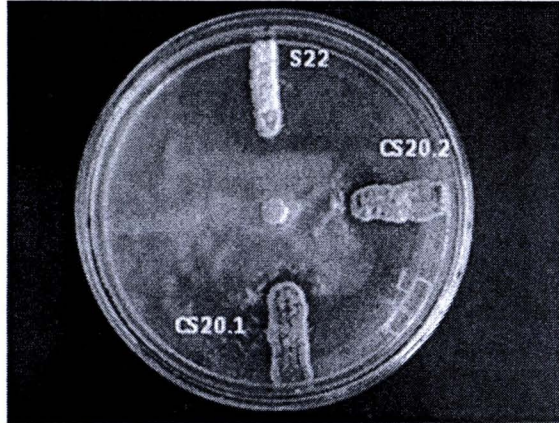
รูปที่ 4. ตัวอย่างการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคโตซานเนสของแอคติโนมัยซีทส์บน Colloidal chitosan agar อ่านผลโดยย้อมด้วยสี Congo red



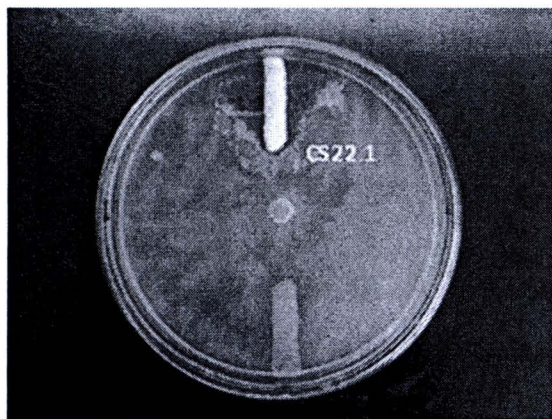
รูปที่ 5. ตัวอย่างการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแอคติโนมัยซีทส์บน CMC agar อ่านผลโดยย้อมด้วยสี Congo red

6. ความสามารถของแอคติโนมัยซิฟที่คัดเลือกได้ในการยับยั้งการเจริญของ *P. aphanidermatum*

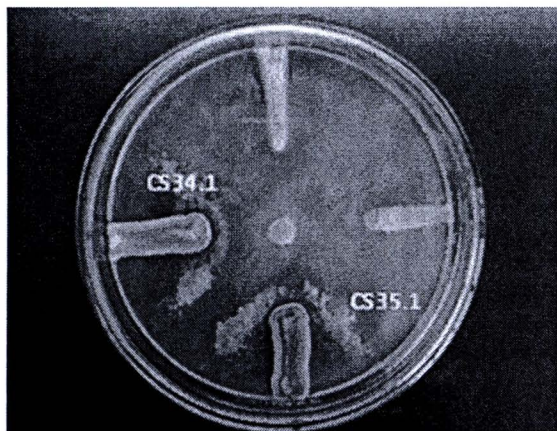
เมื่อทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญ (antagonistic test) ของเชื้อแอคติโนมัยซิฟที่คัดเลือกได้ จากข้อ 2 บนอาหาร PDA พบว่ามีเพียงไอโซเลท S22, CS20.1, CS20.2, CS22.1, CS34.1, CS35.1, CS37.1, CS40.1, CS41.1, C2.2, C8.2, และ P9.3 ดังแสดงในรูปที่ 6-11



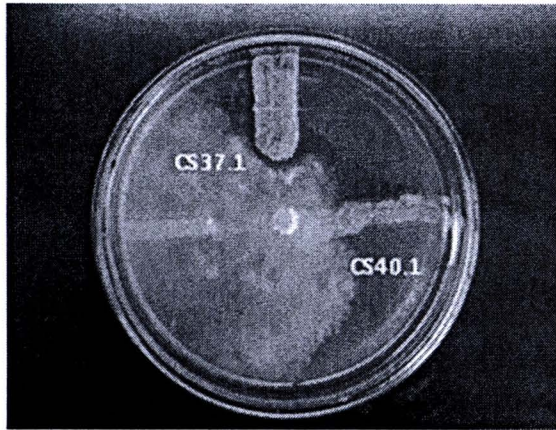
รูปที่ 6. การยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยแอคติโนมัยซิฟไอโซเลท S22, CS20.1, และ CS 20.2



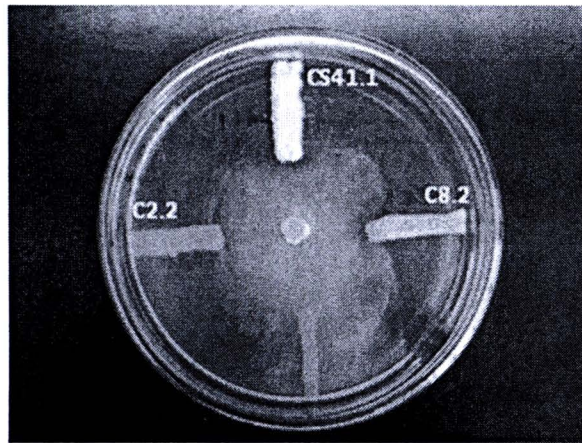
รูปที่ 7. การยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยแอคติโนมัยซิฟไอโซเลท CS22.1



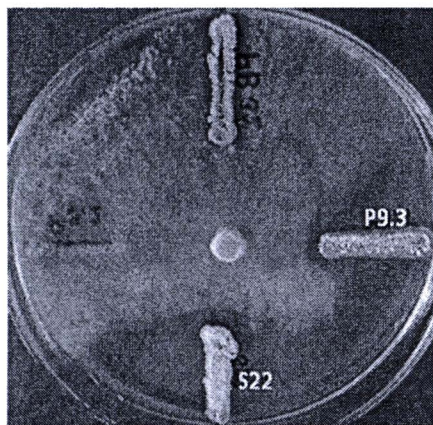
รูปที่ 8. การยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยแอคติโนมัยซิฟไอโซเลท CS34.1 และ CS35.1



รูปที่ 9. การยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยแอคติโนมัยซีตส์ไอโซเลท CS37.1 และ CS40.1



รูปที่ 10. การยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยแอคติโนมัยซีตส์ไอโซเลท CS41.1, C2.2 และ C8.2



รูปที่ 11. การยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยแอคติโนมัยซีตส์ไอโซเลท S22 และ P9.3

7. การจำแนกชนิดเชื้อแอคติโนมัยซีส์ที่คัดเลือกเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่ใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจาก *P. aphanidermatum*

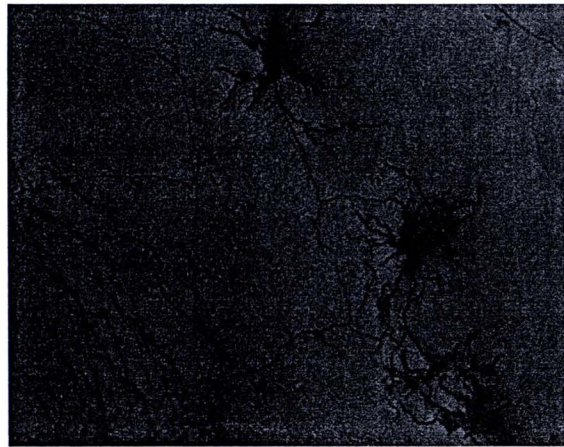
จากแอคติโนมัยซีส์ที่มีความสามารถเป็นปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค *P. aphanidermatum* ซึ่งมีทั้งหมด 12 ไอโซเลท จากทั้งหมด 51 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายไคติน ไคโตซาน และเซลลูโลสของเชื้อแอคติโนมัยซีส์ปฏิปักษ์ดังตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่า ไอโซเลท S22 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* และมีความสามารถในการย่อยสลายไคตินและ CMC ได้ดี ซึ่งจะทำให้การควบคุมโรค seedling damping off ที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การควบคุมเกิดทั้งจากการที่เชื้อแอคติโนมัยซีส์สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราและเอนไซม์ที่เชื้อสร้าง เอนไซม์เซลลูเลสและไคตินเอสจะทำลายโครงสร้างของเชื้อราได้ ดังนั้นเชื้อที่ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรค คือ ไอโซเลท S22

ตารางที่ 6. ความสามารถในการย่อยสลายไคติน ไคโตซาน และ CMC ของแอคติโนมัยซีส์ที่แสดงการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. aphanidermatum*

ไอโซเลท	Antagonistic activity	Chitinase Activity (cz/cs)	Chitosanase activity (cz/cs)	Cellulase Activity (cz/cs)
S22	+++	3.10	1.61	6.00
CS20.1	++	1.13	1.50	2.00
CS20.2	++	1.10	1.53	1.71
CS22.1	+	1.10	1.00	2.00
CS34.1	+	1.10	1.00	2.55
CS35.1	+	1.10	1.00	2.55
CS37.1	+	1.10	1.00	1.00
CS40.1	++	1.50	1.30	1.00
CS41.1	+	1.25	1.25	4.00
C2.2	+	2.50	1.20	1.20
C8.2	+	3.00	3.00	1.20
P9.3	+	1.75	1.50	4.00



เมื่อนำมาศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อ การสร้างและการจัดเรียงตัวของ conidia ของเชื้อเพื่อจัดจำแนกชนิด ใช้เทคนิค slide culture เพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยซีทส์ไอโซเลท S22 แล้วย้อมดูลักษณะของเชื้อด้วยสี carbon fuchsin เพื่อดูลักษณะเส้นใย (substrate mycelium) และการสร้าง aerial mycelium การสร้างและการจัดเรียงตัวของ conidia พบว่าแอสคิโนมัยซีทส์ไอโซเลท S22 สร้าง conidia ต่อกันเป็นสายยาวและขดเป็นเกลียวหรือรูปร่างเหมือนตาขอ (รูปที่ 12) ทำให้สรุปเบื้องต้นได้ว่าเป็นแอสคิโนมัยซีทส์ ที่อยู่ใน genus *Streptomyces*



รูปที่ 12. ลักษณะเส้นใยของแอสคิโนมัยซีทส์ปฏิปักษ์ไอโซเลท S22

8. ผลของไคโตซานที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum*

ศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนอาหาร PDA ที่มี chitosan 0, 100, 200, 300, 400, และ 500 $\mu\text{g/ml}$ เติบโต mycelium plug (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm) จากขอบโคโลนี ของ *P. aphanidermatum* ที่อายุ 7 วัน วางตรงกลางจานเพาะเชื้อ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารแข็ง PDA ที่มี chitosan แต่ละความเข้มข้นทุกวันเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบน PDA ที่ไม่มีไคโตซานเป็นงานควบคุม กำหนดเป็นเปอร์เซ็นต์การเจริญเทียบกับการเจริญของเชื้อราในงานควบคุม แต่ละความเข้มข้นของไคโตซาน ทำ 3 ซ้ำ วัดการเจริญทุกวันจนเชื้อราในงานควบคุมเจริญถึงขอบจานเพาะเชื้อ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นว่า การยับยั้งการเจริญเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณไคโตซานที่เพิ่มมากขึ้น และที่ความเข้มข้นของไคโตซานตั้งแต่ 400 $\mu\text{g/ml}$ เส้นใยของเชื้อราเกือบจะไม่เจริญออกจาก mycelium plug ดังนั้นความเข้มข้นของไคโตซานที่จะใช้ในการทดลองการควบคุมหรือยับยั้งโรค seedling damping off ในถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* จะใช้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 400 $\mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 7. ผลของไคโตซานความเข้มข้นต่างๆในอาหารแข็ง PDA ที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

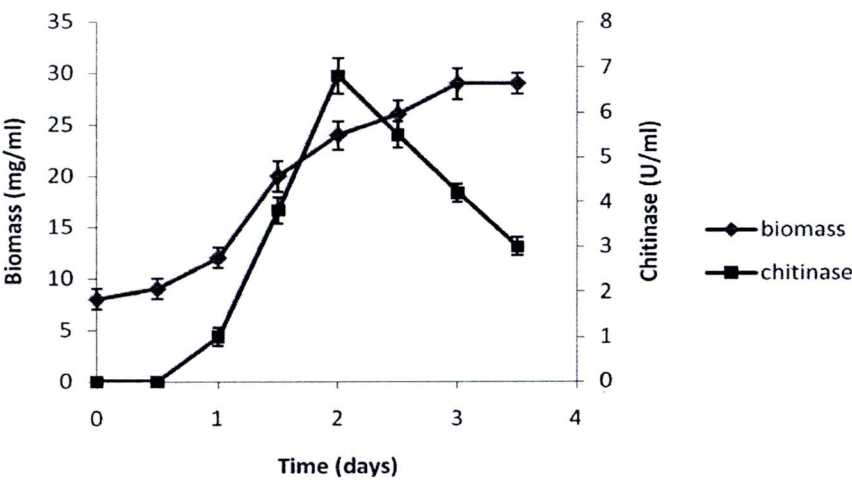
Chitosan concentration (µg/ml)	% อัตราการเจริญเทียบกับการเจริญในจานควบคุม
100	99.5±3.0
200	80.6±2.1
300	65.5±2.0
400	10.3±1.7
500	9.8±4.1

9. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อปฏิปักษ์ที่คัดแยกได้ในอาหารที่มี colloidal chitin ที่เตรียมจากเปลือกกุ้งเป็นองค์ประกอบหลัก

9.1 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสของเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S22 ในอาหาร colloidal chitin medium

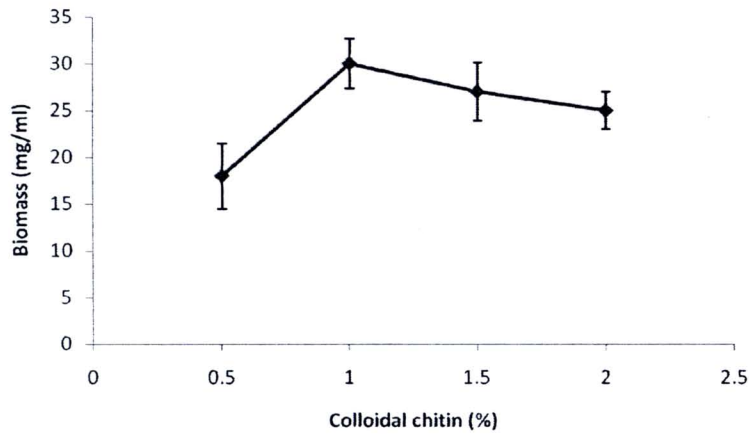
เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S22 ในอาหาร colloidal chitin medium ที่มี ส่วนประกอบของ colloidal chitin 1%w/v โดยใช้เชื้อเริ่มต้น ปริมาณ 1%w/v ในอาหาร 100 ml ที่อยู่ใน 250 ml Erlenmeyer flask เขย่าให้อากาศใน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C ติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ โดยเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวัด cell mass และ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสใน cell free supernatant

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 13 เชื้อเจริญสูงสุดในวันที่ 3 ของการเจริญ พร้อมกับมีการ สร้างเอนไซม์ไคตินเอสได้สูงถึง 6.8 U/ml ในวันที่ 2 ของการเจริญ



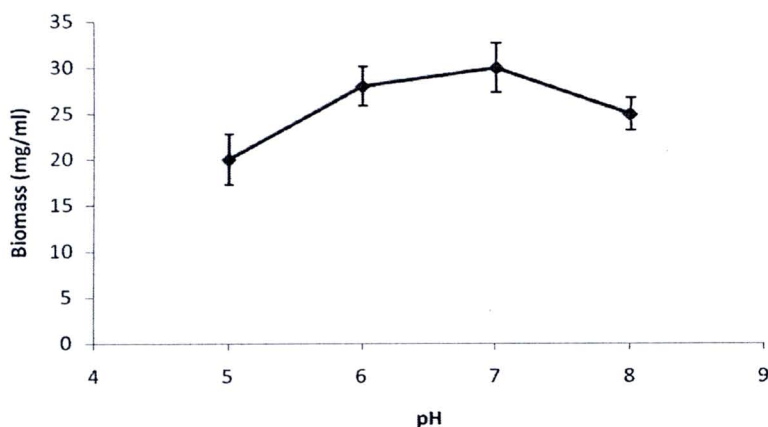
รูปที่ 13. การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสของเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S22 ในอาหาร colloidal chitin medium

9.2 ติดตามผลของปริมาณของ colloidal chitin ที่มีต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ ปฏิบัติในอาหารเหลว โดยแปรผันปริมาณของคอลลอยคอลไคตินจากเปลือกกุ้ง 0.5, 1.0, 1.5, และ 2.0% ในสูตรอาหาร Colloidal chitin medium (ดังข้อ 2) โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็น spore suspension ที่ 10^8 cfu/ml ปริมาณ 1 ml ใส่ในอาหาร 100 ml ที่อยู่ใน 250 ml Erlenmeyer flask บ่มใน rotary shaker at 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 3 วัน เปรียบเทียบการเจริญโดยวัด cell mass ของเชื้อ ปฏิบัติ จากรูปที่ 14 จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของคอลลอยคอลไคตินที่ 1% ให้การเจริญของเชื้อ ปฏิบัติ ไอโซเลท S22 สูงสุด



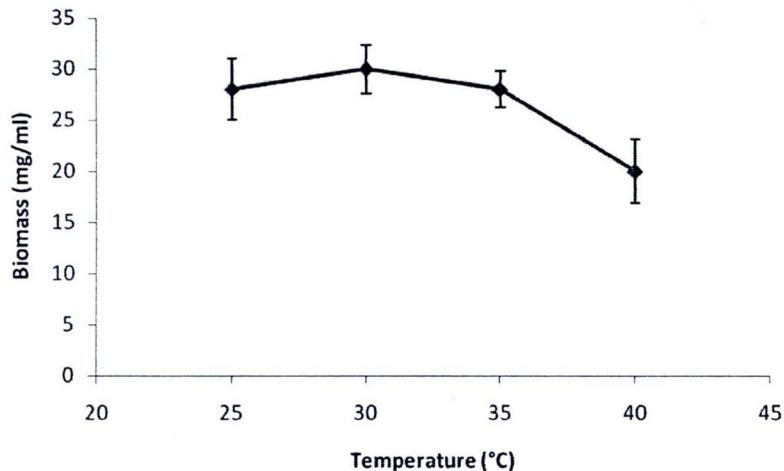
รูปที่ 14. ผลของปริมาณของคอลลอยคอลไคตินที่มีต่อการเจริญของเชื้อปฏิบัติ ไอโซเลท S22 ในอาหารเหลว Colloidal chitin medium

9.3 เปรียบเทียบผลของ pH ที่มีต่อการเจริญของเชื้อปฏิบัติในอาหารเหลวที่มีคอลลอยคอลไคติน โดยปรับ pH ของ Colloidal chitin medium ให้เป็น pH 5, 6, 7, และ 8 จากรูปที่ 15 พบว่าเชื้อปฏิบัติ ไอโซเลท S22 สามารถเจริญได้ในทุกช่วง pH ที่ทดสอบ แต่ที่ pH 7 เชื้อเจริญได้ดีที่สุด



รูปที่ 15. ผลของ pH ที่มีต่อการเจริญของเชื้อปฏิบัติ ไอโซเลท S22 ใน Colloidal chitin medium

9.3 เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของเชื้อปฏิปักษ์ในอาหารเหลวที่มีคอลลอยคอลลไคติน โดยบ่มให้เชื้อเจริญที่ 25, 30, 35, และ 40°C จากรูปที่ 16 จะเห็นได้ว่า เชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S22 เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง การเจริญที่อุณหภูมิ 25-35°C ไม่แตกต่างกัน แต่ถ้าอุณหภูมิสูงถึง 40°C การเจริญจะเกิดได้ไม่ดี



รูปที่ 16. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S22 ใน Colloidal chitin medium

10. ทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซาน เชื้อปฏิปักษ์ และผลิตภัณฑ์ไคโตซานกับเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรค Seedling damping off ในถั่วเหลือง

การทดสอบประสิทธิภาพของการใช้ chitosan อย่างเดียว การใช้เชื้อปฏิปักษ์อย่างเดียว และการใช้ chitosan ร่วมกับเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* ทำโดยศึกษาผลการปกป้องต้นถั่วเหลืองต่อการเกิดโรค 2 แบบ คือ การติดตามเปอร์เซ็นต์การออกของเมล็ดถั่วเหลือง เปอร์เซ็นต์การรอดจากการเป็นโรคของต้นกล้าถั่วเหลือง ในสถานะที่ดินปนเปื้อนด้วยเชื้อ *P. aphanidermatum* การทดลองทำโดยเตรียมดินทั้งหมด 6 แบบ (ทริทเมนต์) แต่ละแบบทำ 3 กระถาง ใช้เมล็ดถั่วเหลือง 10 เมล็ดต่อกระถาง

ทริทเมนต์ที่ 1 ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เรียกเป็นชุดควบคุม “Control”

ทริทเมนต์ที่ 2 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทำให้มีการปนเปื้อนด้วย *P. aphanidermatum* เรียกเป็น “P”

ทริทเมนต์ที่ 3 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคลุกด้วยสารละลายสปอร์ของเชื้อปฏิปักษ์ เรียกเป็น “A”

ทริทเมนต์ที่ 4 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อคลุกด้วยสารละลายสปอร์ของเชื้อปฏิปักษ์ แล้วให้มีการปนเปื้อนด้วย *P. aphanidermatum* เรียกเป็น “A+P”

ทริทเมนต์ที่ 5 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อคลุกด้วยสารละลายไคโตซานแล้วทำให้มีการปนเปื้อนด้วย *P. aphanidermatum* เรียกเป็น “C+P”

ทริทเมนต์ที่ 6 ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อคลุกด้วยสารละลายสปอร์ของเชื้อปฏิปักษ์ และ
สารละลายไคโตซานแล้วทำให้มีการปนเปื้อนด้วย *P. aphanidermatum*
เรียกเป็น “A+C+P”

เมื่อนำเมล็ดถั่วเหลืองมาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยการแช่ในแอลกอฮอล์ 30 วินาที แล้วแช่ด้วย
สารละลาย 0.1% โซโปคลอไรด์ นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อ อย่างน้อย 10 ครั้ง แช่ไว้
1 ชั่วโมงหรือจนเมล็ดขยายขนาดเต็มที่ ใช้ทดสอบการติดตามเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และใช้
ถั่วเหลืองที่ผ่านการเพาะให้มีรากงอกยาว 3-4 cm สำหรับติดตามเปอร์เซ็นต์การรอดไม่เป็นโรคของ
ต้นกล้าถั่วเหลือง เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเป็นต้นกล้าและเปอร์เซ็นต์การรอดไม่เป็นโรคของ
ต้นกล้าแสดงในตารางที่ 8 ซึ่งจะเห็นได้ว่า เมล็ดถั่วเหลืองที่ใช้มีเปอร์เซ็นต์การงอกโดยเฉลี่ย 86.3
(ควบคุม) เมื่อเพาะลงในดินที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *P. aphanidermatum* (P) เมล็ดถั่วเหลือง
ติดโรค เหลือเปอร์เซ็นต์การงอกเพียง 50.0% แต่เมื่อเพาะเมล็ดในดินที่มีเชื้อปฏิปักษ์ (A) กลับ
พบว่า การงอกของเมล็ดเพิ่มขึ้นเป็น 88.5% แต่ไม่แตกต่างจากทริทเมนต์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ ($p \geq 0.05$) แสดงว่าเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S22 ไม่มีผลทางลบต่อการเจริญของถั่วเหลือง
เมื่อใช้แอคติโนมัยซิฟสปิ์ปฏิปักษ์ใส่ในดินก่อนทำให้ดินถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อรา (A+P) พบว่า
เมล็ดติดเชือราน้อยลงเปอร์เซ็นต์การงอกเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับทริทเมนต์ที่มีเพียงเชื้อราก่อ
โรค (P) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในดินที่ใช้ไคโตซานอย่างเดียวในการควบคุมโรคจาก
เชื้อรา (C+P) พบว่าไคโตซานควบคุมโรคได้ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดในดินที่มีเชื้อราเพิ่ม
มากขึ้น แต่เปอร์เซ็นต์การงอกน้อยกว่าทริทเมนต์ที่ใช้แอคติโนมัยซิฟสปิ์ปฏิปักษ์ควบคุมซึ่งไม่
แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อใช้ทั้งแอคติโนมัยซิฟสปิ์ปฏิปักษ์และไคโตซาน
ควบคุมโรค (A+C+P) พบว่าการงอกของเมล็ดไม่แตกต่างจากทริทเมนต์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

เมื่อทดลองการป้องกันโรค seedling damping off กับต้นกล้าที่ปลูกในดินที่เตรียม
เช่นเดียวกับการทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด พบว่าการย้ายต้นกล้าลงในดินที่ไม่มีเชื้อ
ซึ่งเป็นทริทเมนต์ควบคุม ต้นกล้าไม่มีโรคและรอด 100% แต่เมื่อย้ายกล้าลงในดินที่มีเชื้อรา
P. aphanidermatum (P) ต้นกล้าติดเชื้อและมีเปอร์เซ็นต์รอดและไม่เป็นโรคเพียง 60.0% ทริทเมนต์
ที่มีแอคติโนมัยซิฟสปิ์ปฏิปักษ์ (A) พบว่าต้นกล้ามีเปอร์เซ็นต์การรอด 96.7 ซึ่งไม่แตกต่างจากทริท
เมนต์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ในทริทเมนต์ที่ใช้แอคติโนมัยซิฟสปิ์ปฏิปักษ์
ควบคุมโรคอย่างเดียว (A+P) และใช้ไคโตซานควบคุมโรคอย่างเดียว (C+P) ให้เปอร์เซ็นต์รอดของ
ต้นกล้า 87.3 และ 83.3 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากทริทเมนต์ที่ทำให้ต้นกล้าเป็นโรค (P) อย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ส่วนทริทเมนต์ที่ใช้ทั้งแอคติโนมัยซิฟสปิ์ปฏิปักษ์และไคโตซาน
ควบคุมโรค (A+C+P) พบว่าต้นกล้ามีการรอดสูงถึง 95.0% ซึ่งไม่แตกต่างจากทริทเมนต์ควบคุม
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

สรุปได้ว่าการใช้ทั้งแอคติโนมัยซิท์สปิวกิย์และไคโตซานใส่ในดินร่วมกันสามารถที่จะป้องกันเมล็ดถั่วเหลืองและต้นกล้าจากการติดโรคด้วยเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 8 เปรอ์เซ็นต์การออกของเมล็ดถั่วเหลืองและการรอดของต้นกล้าถั่วเหลืองที่ปลูกในดินที่ปนเปื้อนด้วย *P. aphanidermatum* ที่ใช้ไคโตซาน เชื้อสปิวกิย์ และไคโตซานกับเชื้อสปิวกิย์ในการควบคุมโรค

วิธีทดลอง	ค่าเฉลี่ย การออกของเมล็ด (%)	ค่าเฉลี่ย การรอดของต้นกล้า (%)
1. ดินปกติใช้เป็นแบบควบคุม (Control)	86.3 ^a	100.0 ^a
2. ดินปนเปื้อนด้วย <i>P. Aphanidermatum</i> (P)	50.0 ^c	60.0 ^c
3. ดินที่มีเชื้อแอคติโนมัยซิท์สปิวกิย์ (A)	88.5 ^a	96.7 ^a
3. ดินที่มีแอคติโนมัยซิท์สปิวกิย์และถูกปนเปื้อนด้วย <i>P. Aphanidermatum</i> (A+P)	83.8 ^b	87.3 ^b
5. ดินที่มีไคโตซานและถูกปนเปื้อนด้วย <i>P. aphanidermatum</i> (C+P)	82.0 ^b	83.0 ^b
6. ดินที่มีไคโตซาน แอคติโนมัยซิท์สปิวกิย์และถูกปนเปื้อนด้วย <i>P. Aphanidermatum</i> (A+C+P)	88.0 ^a	95.0 ^a

หมายเหตุ อักษร abc ที่เหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) โดย LSD



รูปที่ 17. การเตรียมเมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์เชิงใหม่ 60 เพื่อใช้ในการทดลอง



รูปที่ 18. ลักษณะการเจริญของถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 ระยะเวลา 0 – 14 วัน

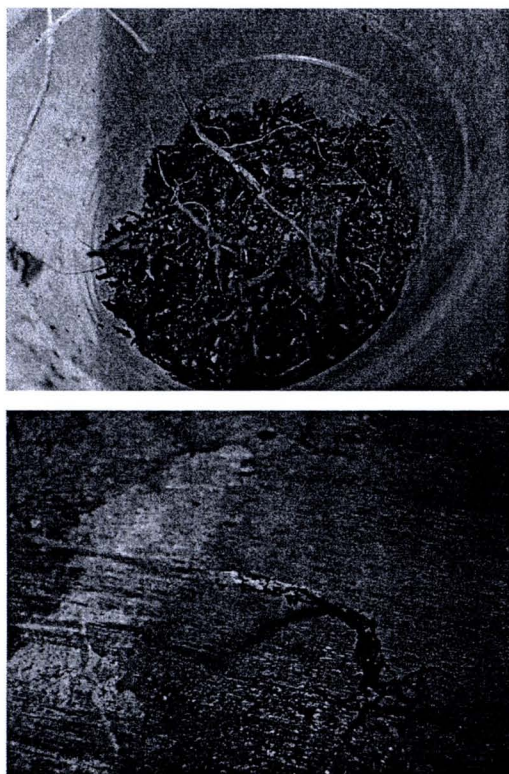


เมสิดที่ไม่เกิดโรค

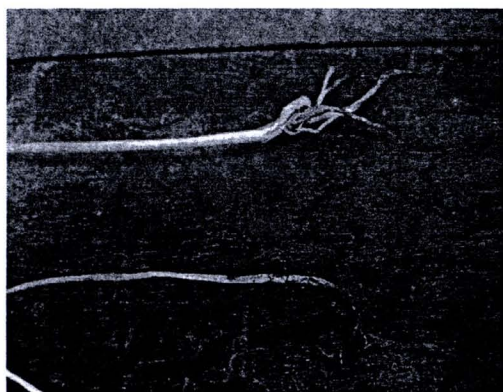
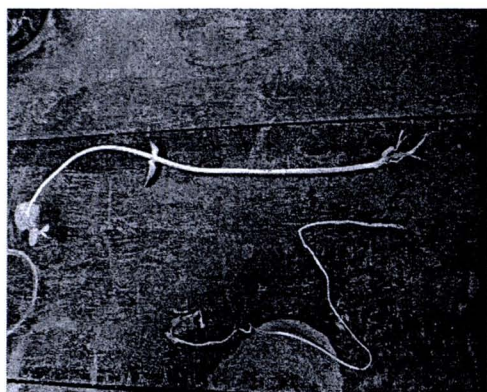
เมสิดที่มีการเกิดโรค

รูปที่ 19. แสดงเปรียบเทียบระหว่างเมสิดถั่วเหลืองที่ไม่ติดเชื้อและเมสิดที่มีการติดเชื้อ

ต้นกล้าถั่วเหลืองที่มีการเกิดโรคเน่าคอดินจากเชื้อ *P. aphanidermatum* จะมีลักษณะเน่าที่รากทำให้ลำต้นมีรอยและพับหักลงจนต้นถั่วเหลืองตายในที่สุด ซึ่งการเกิดโรคในระยะนี้ทำให้เกิดความเสียหายต่อการปลูกต้นถั่วเหลืองมาก ซึ่งลักษณะการเกิดโรคเน่าคอดินในระยะต้นกล้ามีลักษณะดังรูปที่ 20



รูปที่ 20. ต้นกล้าถั่วเหลืองที่มีการเกิดโรคเน่าคอดินจากเชื้อ *P. aphanidermatum* เส้นใยสีขาวของเชื้อรา *P. aphanidermatum* บนผิวดินและที่โคนต้นถั่วเหลือง



รูปที่ 21. ลักษณะการเกิดโรคเน่าคอดินในระยะต้นกล้าของต้นถั่วเหลืองมีเส้นใยราก่อโรคเจริญอยู่ที่รากและโคนต้น ลำต้นหักงอและตายเปรียบเทียบกับต้นกล้าที่ไม่มีการติดเชื้อราก่อโรค