บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำงานวิจัย

โรคใบจุดก้างปลา(Corynespora leaf disease) เป็นซึ่งมีเชื้อรา *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei เป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในพืชหลายชนิดเช่น ยางพารา เป็นต้น (http://www.live-rubber.com) ยาพาราเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่ทำรายได้ส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย นอกจากนี้เชื้อรา *Corynespora* ยังเป็นสาเหตุก่อโรคพืชในพืช ได้แก่ มะละกอ มะเขือเทศ และพืชคลุมตระกูลถั่ว เป็นต้น

แอนแทรคโนส(Antracnose)ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Collectrotrichum* sp. มีการระบาดและทำความเสียหายให้พืชหลายชนิด เช่นพริก มะปราง กล้วยไม้ เป็นต้น การระบาดจะเกิดช่วงอากาศร้อน ชื้น อบอ้าว โดยสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืช ตัวอย่างเช่นอาการทางใบ เริ่มแรกจะเป็นจุดเล็กๆบนใบอ่อน ขอบใบเป็นสีน้ำตาลเข้ม

โรครากเน่า (Sclerotium root rot) สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อรา *Sclerotium roifsii* Sacc. เชื้อรานี้จะอาศัยอยู่ในดินทั่วไป โดยเฉพาะดินที่มีสภาพเป็นกรด ดังนั้นการใส่ปุ๋ยที่ทำให้ดินเป็นกรด จะช่วยให้เชื้อรานี้แพร่ระบาดมากขึ้น อาการของโรค ทำให้ใบพืชเหลืองเหี่ยวและแห้ง และทำให้พืชตายทั้งกอ ถ้าถอนรากขึ้นมาดูจะพบรากเน่าเปื่อย โคนต้นมีเส้นใยราสีขาวและเม็ดราเป็นก้อนกลมสสีขาวหรือสีน้ำตาลหรือสีดำ

ไรโซสเฟียร์(Rhizosphere) หมายถึงดินที่เกาะอยู่ตามบริเวณรอบรากพืชหลังจากเขย่าดินที่เกาะบนอยู่หลวมๆออกไปแล้วขนาดของไรโซสเฟียร์ขึ้นกับขนาดของราก พืชที่มีระบบรากฝอยจะมีพื้นผิวมากกว่าระบบรากแก้วบริเวณไรโซสเฟียร์เป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรียและมีการพึ่งพาอาศัยระหว่างรากพืชกับจุลินทรีย์ บริเวณพื้นผิวของรากพืชเรียกว่าไรโซแพลน(Rhizoplane) (http://th.wikipedia.org)

รากพืชเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์โดยจะพบจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ในปริมาณสูงรอบๆรากพืช เพราะจุลินทรีย์ในดินและรากพืชจะเอื้อเฟื้อซึ่งกันและกันในด้านอาหาร รวมทั้งพบว่ามีจุลินทรีย์ปริมาณสูงในบริเวณไรโซเพลนและไรโซสเฟียร์ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2549)

ผลของจุลินทรีย์ในไรโซสเฟียร์ต่อพืช พบว่าส่งเสริมการเจริญของพืช โดยเพิ่มการหมุนเวียนน้ำและแร่ธาตุ สร้างวิตามินและสารส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น ออกซิน จิบเบอเรลลิน นอกจากนี้ยังต่อต้านเชื้อก่อโรคโดยการแข่งขันหรือโดยการสร้างยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

ปัจจุบันมีความพยายามที่จะใช้การควบคุมโรคทางชีวภาพ(Biological control) เพื่อแก้ไขหรือลดปัญหาจากการใช้สารเคมีในการควบคุมโรค เช่น การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มาควบคุมโรค เช่น การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มาควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคต่างๆ เช่น การนำจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus* spp. และ *Pseudomonas* spp. และในกลุ่มของเชื้อรา ได้แก่ *Chaetomium* sp., *Glioladium* sp., *Penicillium* sp. และ *Trichoderma* spp. มาใช้ควบคุมโรคต่างๆในพืช เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันทั่วโลกได้ตระหนักถึงพิษภัยของสารเคมี ความสนใจในเรื่องเกษตรอินทรีย์จึงมีมากขึ้นการใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการต่อต้านเชื้อโรคจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง และมีชีวภัณฑ์ (Bioproduct) ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดต่างๆออกมาจำหน่ายด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จะทำการคัดแยกแบคทีเรีย และรา จากดินบริเวณรอบรากพืช ที่สามารถต่อต้านเชื้อก่อโรคพืช *Corynespora* sp. *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1 เพื่อศึกษาคัดแยกแบคทีเรีย และราจากดินบริเวณรอบรากพืช ซึ่งเก็บตัวอย่างในพื้นที่เขื่อนสิรินธร

2 เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย และราในดินบริเวณรอบรากพืชที่คัดแยกได้ซึ่งสามารถยับยั้ง เชื้อราก่อโรคพืช

3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรีย และราที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคพืช

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1 การวิจัยนี้เป็นการคัดแยกแบคทีเรีย และราในดินบริเวณรอบรากพืช ซึ่งจะทำการเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เทคนิค Spread plate บน soil extract agar และ Potato dextrose agar

2. นำแบคทีเรีย และราที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Corynespora* sp. *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp.

3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรีย และรา เช่น ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ, โครงสร้างของจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์, การย้อมสีแกรม เป็นต้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 ได้ทราบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินรอบรากพืช ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเกษตร และจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมต่อไป

2 คัดแยกได้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคพืช *Corynespora* sp. *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp.

3 เพื่อเป็นความรู้ในการนำจุลินทรีย์ในดินรอบรากพืชที่เป็นเชื้อปฏิปักษ์ไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งโรคใบจุดที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Corynespora* sp. *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp.

4 ได้ข้อมูลวิจัยที่จะนำไปเสนอในงานประชุมด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี นอกจากนี้ยังคาดว่าจะได้ผลการทดลองในระดับดีที่สามารถนำไปตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์หรือเกษตรศาสตร์ได้

บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคใบจุดซึ่งมีเชื้อสาเหตุคือ *Corynespora* สร้างความเสียหายให้กับพืชหลายชนิด เช่น โรคใบจุดก้างปลา (Corynespora leaf disease) ระบาดในประเทศไทยครั้งแรก เมื่อปี พ.ศ. 2528 ที่ศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี กับยางพันธุ์ RRIC 103 ซึ่งเป็นพันธุ์จากประเทศศรีลังกา และพันธุ์ RRIT 21 ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมของไทย ทำให้ต้นยางยืนต้นตาย จึงต้องพิจารณาตัดพันธุ์ยางทั้งสองออก จากคำแนะนำพันธุ์ยางในปี 2536 (http://www.live-rubber.com) นอกจากนี้ยังพบโรคใบจุดของถั่วเขียวผิวดำ (black gram, vigna mungo (L.) Wilezek) ซึ่งมีเชื้อราสาเหตุ คือ *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei (http://it.doa.go.th)

ลักษณะอาการของโรคใบจุดก้างปลาได้แก่ ใบอ่อนแสดงอาการแผลเป็นจุดกลม ขอบแผลสีน้ำตาลดำ กลางแผลสีซีดหรือเทา ถ้าเชื้อเข้าทำลายรุนแรงใบจะบิดงอแล้วร่วง ในระยะใบเพสลาดแผลจะกลมเห็นสีน้ำตาลหรือดำ ขอบแผลสีเหลือง และขยายลุกลามเข้าไปตามเส้นใย ทำให้แผลมีลักษณะคล้ายก้างปลา เนื้อเยื่อบริเวณรอยแผลมีสีเหลืองถึงน้ำตาล และใบร่วงในที่สุด ถ้าเชื้อเข้าทำลายส่วนของก้านใบกิ่งแขนงและลำต้นที่เป็นสีเขียว จะเป็นแผลสีดำ มีลักษณะยาวรี เนื่อเยื่อตรงกลางแผลบุ๋มลง ถ้าสภาพอากาศเหมาะสมจะขยายขนาดและลุกลามจนทำให้กิ่งหรือยอดที่เป็นโรคแห้งตาย

พืชอาศัยของเชื้อโรคใบจุดก้างปลามีมากกว่า 80 ชนิด เช่น งา ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ฝ้าย ยาสูบ มะละกอ แตงโม มะเขือเทศ ผักกาดหอม สะระแหน่ ฟักเขียว และพืชคลุมตระกูลถั่ว เป็นต้น ซึ่งพืชเหล่านี้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในประเทศไทย การป้องกันกำจัดโรคที่เกิดกับพืชเหล่านี้ทำได้โดยการใช้สารเคมี(ไตรดีมอร์ฟ)ฉีดพ่น ซึ่งการฉีดพ่นด้วยสารเคมีจะทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และมนุษย์ ดังนั้น การป้องกันกำจัดโรคพืชด้วยชีววิธี เช่นการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่กำลังนิยมใช้ในปัจจุบัน

รากพืชจะมีผลต่อจุลินทรีย์ในดินบริเวณไรโซสเฟียร์เพราะมีการปล่อยสารที่มีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ โดยผลของรากพืชต่อจุลินทรีย์ในไรโซสเฟียร์ได้แก่(1) การดูดน้ำของพืช การปล่อยสารอินทรีย์ลงสู่ดิน เป็นการปรับแต่งสภาพแวดล้อมในดินซึ่งมีผลต่อจำนวนจุลินทรีย์โดยตรง จุลินทรีย์ในบริเวณใกล้รากจะมีมากกว่าบริเวณที่ไกลออกไปจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลงไปตามระยะการเจริญของพืช เพราะสารที่พืชปล่อยออกมาในช่วงชีวิตต่างๆจะไม่เหมือนกัน (2) สารที่พืชหลั่งออกมาเป็นแหล่งพลังงานและสนับสนุนกิจกรรมของจุลินทรีย์ ในขณะที่ผลของจุลินทรีย์ในไรโซสเฟียร์ต่อพืชนั้นมีมากมายเช่น ส่งเสริมการเจริญของพืช และต่อต้านเชื้อก่อโรคโดยการแข่งขันหรือโดยการสร้างยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สำคัญในสิ่งแวดล้อม มีหลายสายพันธุ์ทั้ง แบคทีเรีย และรา ซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะในดินและรอบรากพืช จุลินทรีย์เหล่านี้นอกจากจะเป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชแล้วยังมีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุอาหารในสิ่งแวดล้อม

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช เป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรโดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา อาทิเช่น *Corynespora* sp.ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคใบจุด ใบด่างในแตงกวาและมะละกอเป็นต้น ลักษณะของแผลที่ใบจะกลมหรือเหลี่ยมมีสีน้ำตาล กลาง ๆ แผลมีสีเขียวหรือเหลือง เมื่อมี

แผลมากและแผลมีขนาดใหญ่ขึ้น ใบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแห้งตาย แผลบนกิ่งก้าน มีลักษณะยาวตามส่วนของพืช ผลที่ถูกเชื้อเข้าทำลายมักจะเป็นผลที่แก่และผลที่มีสีเหลือง(http://www.thaikasetsart.com), เชื้อ *Collectrotrichum* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ในผลพริก อาการที่ใบเกิดแผลสีน้ำตาลอ่อนมีขนาดค่อนข้างใหญ่แผลมักจะเริ่มจากขอบใบ หรือปลายใบ ลามเข้าสู่กลางใบ เมื่อมีอาการรุนแรงแผลจะขยายอย่างรวดเร็วทำให้ใบแห้งและร่วง อาการที่ผล บนผลพริกที่แก่จัด หรือผลเริ่มสุก เกิดรอยช้ำเป็นแอ่งลึกลงไปเล็กน้อยมี สีน้ำตาล แผลขยายออกเป็นวงกลม รี หรือรูปไข่ และมักจะพบโครงสร้างของเชื้อราที่เรียกว่า acervulus มีลักษณะเป็นจุดเล็ก ๆ สีดำเรียงเป็นวงซ้อนกัน เมื่ออากาศชื้นจะมีเมือกสีชมพูอมส้มปรากฏบนแผล แผลที่เก่ามีสีน้ำตาลดำ ลักษณะอาการที่รุนแรงคือผลพริกจะโค้งงอ บิดเบี้ยวคล้ายกุ้งแห้ง ผลจะร่วงก่อนกำหนด และเชื้อ *Sclerotium* sp. ที่ก่อให้เกิดโรครากเน่า (Root Rot) ในมะเขือเทศ ซึ่งเชื้อจะเข้าทำลายรากฝอย รากแขนง และตามโคนต้น จะเห็นอาการของพืชโดยใบจะมีสีเหลืองซีดถึงเหลือง โดยเริ่มที่เส้นกลางใบก่อนแล้วลุกลามไปเรื่อย ๆ จากโคนใบไปถึงยอด ใบจะเขียวม้วนงอ เมื่อโดนแดดจัด ๆ ในตอนกลางวัน หรือใบเหี่ยวคล้ายขาดน้ำ ใบจะร่วงกิ่งแห้งตาย ผลมีสีเหลืองร่วงหล่นง่าย เมื่อขุดดูที่รากจะพบว่ารากฝอยเน่า ถอดปลอก รากแขนงหรือรากขนาดโตเน่าเปื่อยยุ่ย และลุกลามไปทั่ว ใบแห้ง ผลร่วง ถ้าเป็นมากอาจถึงต้นตายได้ ในเวลารวดเร็ว

(ที่มา: http://hcsupply.blogspot.com/2008_10_01_archive.html)

รูปที่ 1 โรคใบจุดในแตงกวาที่มีสาเหตุเกิดจาก *Corynespora* sp.

(ที่มา: http://dc195.4shared.com/doc/Y2EOkhCK/preview.html)

รูปที่ 2 โรคแอนแทรคโนสในพริกที่มีสาเหตุเกิดจาก *Collectotrichum* sp.

(http://www.oard1.org/techniquestory/28052552/oksite1/Index9.htm)

รูปที่ 3 โรครากและโคนเน่าในมะเขือเทศที่มีสาเหตุเกิดจาก *Sclerotium* sp.

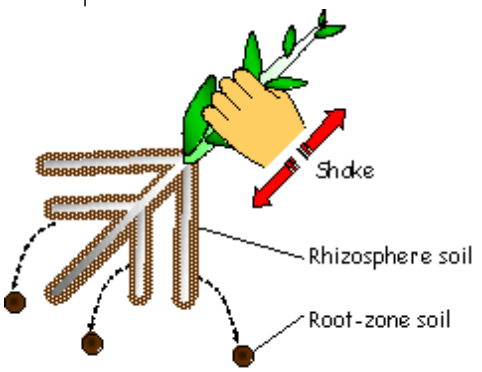
จะเห็นได้ว่าเชื้อสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่จะเกิดจากเชื้อรา ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลิตผลทางการเกษตร โดยเฉพาะในกลุ่มที่เป็นพืชเศรษฐกิจ เช่น แตงกวา, พริก และมะเขือเทศเป็นต้น ซึ่งสาเหตุเกิดจากเชื้อก่อโรคมีการบุกรุกเข้าไปในพืชได้ ทั้งนี้ปัจจัยที่สำคัญที่มีส่วนช่วยในการป้องกันการบุกรุกของเชื้อก่อโรคพืชมากที่สุดน่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อพืช ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มีทั้งชนิดที่อาศัยอยู่รวมกับพืชภายในเซลล์ในลักษณะของ endophytic bacteria และชนิดที่อาศัยบริเวณผิวภายนอกพืช (epiphytic bacteria) รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยร่วมกับพืชบริเวณรอบราก (rhizosphere bacteria) ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะมีคุณลักษณะสำคัญคือ

- การสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiotic)

- การแข่งขันอยู่ร่วมกับพืช
- การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting rhizobacteria ; PGPR)
- การผลิตสารยับยั้งเชื้อโรค เช่น ไซเดอโรฟอร์ (siderophore)
- ส่งเสริมกลไกจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อื่น ๆ
- การรักษาและแก้ไขความผิดปกติ ปรับสภาพความสมดุลให้พืชทางสรีระและชีวเคมี
- แก่งแย่ง จำกัด ยับยั้งการใช้สารอาหารจำเป็นของเชื้อโรค เช่น วิตามิน กรดอะมิโน สารยับยั้ง
- กระตุ้นให้พืชนำธาตุอาหารมาใช้มากขึ้น
- การสลายเศษซากพืช

(http://www.ku.ac.th/e-magazine/jan52/agri/agri2.htm)

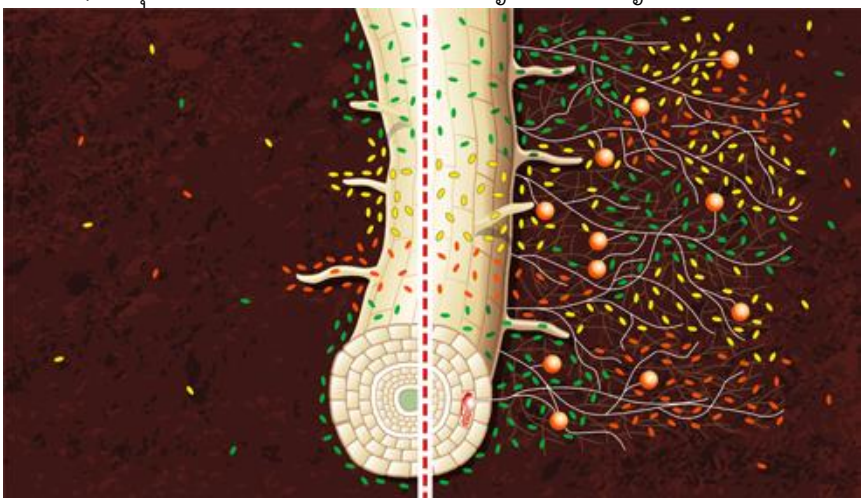
การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่แบคทีเรียในกลุ่มที่อาศัยอยู่บริเวณไรโซสเฟียร์เป็นสำคัญ ซึ่งบริเวณไรโซสเฟียร์ (Rhizosphere zone) หรือบริเวณรอบรากพืชนี้จะเป็นเป็นบริเวณรอบรากพืชที่มีดินเกาะอยู่หลังจากที่เขย่าดินที่เกาะอยู่อย่างหลวมๆออกไปแล้ว



(http://regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/3/2535_fujiiy.htm)

รูปที่ 4 Rhizosphere soil

ซึ่งขนาดของไรโซสเฟียร์จะขึ้นอยู่กับขนาดของรากพืชด้วย และบริเวณนี้จะเป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์หลากหลายชนิดซึ่งเรียกแบคทีเรียในกลุ่มนี้ว่า “Rhizobacteria" จุลินทรีย์เหล่านี้จะมีการอยู่แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืช (Mutualism) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชดังที่กล่าวมาแล้ว



(http://www.ganeshtree.com/services-provided/understanding-the-science/)

รูปที่ 5 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ rhizosphere

ดังนั้นจึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงความหลากหลายของจุลินทรีย์เหล่านี้ โดยเน้นไปที่ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อาจจะมีการสร้างสารบางชนิดออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชหรืออาจจะมีความสามารถในการแก่งแย่งแข่งขันเพื่อให้ได้มาซึ่งสารอาหารและหรือแร่ธาตุที่ต้องการได้ดี จึงทำให้เชื้อก่อโรคพืชถูกยับยั้งหรือถูกต่อต้านการเจริญด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จึงเป็นผลส่งเสริมให้ผลผลิตทางการเกษตรมีประสิทธิภาพและเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรให้มีคุณภาพยิ่งขึ้น ดังที่ได้มีการรายงานการวิจัยดังนี้

กรรณิการ์และคณะ(2552) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นปฏิปักษ์โดยการสร้างสารปฏิชีวนะที่สำคัญในสิ่งแวดล้อม ที่อยู่ในดินแหล่งต่างๆ ซึ่งเป็นดินรอบรากข้าวจากนาข้าวในหลายจังหวัด ได้แก่ สุพรรณบุรี เชียงใหม่ กาฬสินธุ์ นนทบุรี และกรุงเทพฯ และดินรอบรากพืชที่เก็บจากจังหวัดนครปฐม แล้วนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาคัดเลือก และศึกษาสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวชนิดต่างๆ รวมทั้งจำแนกสายพันธุ์ของแอคติโนมัยสีท เพื่อเป็นความรู้ในการนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้ไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งโรค ข้าว และช่วยส่งเสริมการปลูกข้าวเพื่อพัฒนาด้านเกษตรอินทรีย์ เมื่อทำการคัดแยกเชื้อแล้วนำมาทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร แข็ง และเลี้ยงให้สร้างสปอร์จนเจริญดี เมื่อนำมาจำแนกตามกลุ่มสีของสปอร์ สามารถแบ่งได้เป็น 7 กลุ่มสี ตามลักษณะสีสปอร์ พบว่ากลุ่มสปอร์สีเทามีสมาชิกจำนวนมากที่สุด จากนั้นได้วิเคราะห์ชนิดของ diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ที่ผ่านการย่อย พบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่ที่พบเป็นกลุ่มสเตรพโตมัยสีท เมื่อนำไอโซเลทที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ก่อโรคข้าว ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้ง โรคถอดฝักดาบ โรคใบจุดสีน้ำตาล และโรคกาบใบแห้ง พบว่ามี 41 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด และพบว่าไอโซเลท K8S3 มีสมบัติเหมือนกับ *Streptomyces hygroscopicus* ซึ่งเป็นไอโซเลทที่มีความสามารถสูงที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ เกือบทุกชนิด และมีผลต่อการส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังได้ค้นพบแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ คือ *Pseudonocardia acaceae* ไอโซเลท GMKU095 เจริญได้ดีที่ pH 6-7 อุณหภูมิระหว่าง 36-38 องศาเซลเซียส ย่อยสลายยูเรียได้ สร้างกรดจากน้ำตาลหลายชนิด เช่น ฟรุคโตส กลูโคส และสามารถย่อยสลายเจลาติน

ชุติมา (2008) ศึกษาการต่อต้านเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดแยกจากดินและกล้วยไม้สกุลหวาย โดยการศึกษาเริ่มจากการแยกแบคทีเรียจากส่นต่างๆของกล้วยไม้ และแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณสวนกล้วยไม้รวมถึงดินบริเวณรอบรากข้าว ต่อจากนั้นนำทุกไอโซเลทที่แยกได้มาทดสอบการปฏิปักษ์ต่อรา *S. rolfsii* โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture) คัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งรา *S. rolfsii* มาตรวจวัดการสร้างเอนไซม์ไคติเนทและกลูคาเนส สุดท้ายประเมินศักยภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียและแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกต่อการเจริญเติบโตของรา *S. rolfsii* จากการศึกษาพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ 201 ไอโซเลทและแอคติโนมัยสีท 146 ไอโซเลท จากการทดสอบการปฏิปักษ์ต่อรา *S. rolfsii* โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกัน พบว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. และเชื้อ *Streptomyces* sp. มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งรา *S. rolfsii* จากการตรวจวัดการสร้างเอนไซม์ไคติเนทและกลูคาเนส พบว่าทั้งสองสายพันธุ์สามารถสร้างเอ็นไซม์สองชนิดได้ในระยะ exponential น้ำเลี้ยงเชื้อจากทั้งสองสายพันธุ์ในระยะ exponential และ stationary สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตในอาหารเหลวของรา *S. rolfsii* ซึ่งน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในระยะ stationary มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *S. rolfsii* สูงกว่าในระยะ exponential อย่างมีนัยสำคัญ

วิชัย และ ชวเลิศ (2544) ศึกษาผลของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าของแง่งขิงระหว่างการเก็บรักษา นำเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากตัวอย่างขิงและดินที่ปลูกขิง นำมาทดสอบ

ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าบนแง่งขิง ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Tricoderma* sp. “KM20” และ “PD5” ในการทดสอบโดยการเตรียมแง่งขิงด้วยการล้างด้วยน้ำประปา แล้วใช้ใบมีดปลอดเชื้อทำบาดแผลบนแง่งขิง แล้วนำไปแช่ใน 5% Clorox นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้งผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ชุบแง่งขิงด้วย spore suspension ของเชื้อปฏิปักษ์นาน 3 นาที ผึ่งให้แห้ง แล้วฉีดพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* นำแง่งขิงไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ความชื้นสัมพัทธ์ 95-100% เป็นเวลา 16 วัน ทำการวัดค่าความหนาแน่นเนื้อและตรวจสอบประชากรของเชื้อ *F. oxysporum* ผลที่ได้พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อ *F. oxysporum* บริเวณบาดแผลเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา โดย treatment ที่ใช้ *Tricoderma* sp. “KM20” และ “PD5” มีประชากรของเชื้อ *F. oxysporum* ต่ำกว่า treatment ที่ไม่ได้ใช้เชื้อราปฏิปักษ์เล็กน้อยในช่วงแรกของการทดลอง ส่วนค่าความหนาแน่นเนื้อที่ผิวมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ในขณะที่บริเวณบาดแผลมีค่าความหนาแน่นเนื้อลดลงอย่างชัดเจนโดยเฉพาะ treatment ที่ใช้ *Tricoderma* sp. “KM20” มีค่าลดลงมากที่สุดเมื่อเทียบกับ *Tricoderma* sp. “PD5” และไม่ใช้เชื้อปฏิปักษ์

สุมาลี และ พิภพ (2550) ศึกษาถึงผลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในการควบคุมโรคทางรากบาง ชนิดของพริกภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ ซึ่งจากการทดสอบวางเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่า รากเน่า และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของพริกบนอาหารที่ผสมชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สำเร็จรูป *Pediococus acidilactici, Streptococcus faecalis, Bacillus amyloliquefaciens, Pichai farinosa และ Dekkera anomala* ตามอัตราการใช้สูงสุด และต่ำสุดภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สามารถควบคุมเชื้อรา *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคโคนเน่า รากเน่า ในพริกได้ โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวมีผลทำให้การเจริญทางด้านเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคลดลง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียว เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีผลทำให้การสร้างหน่วยสืบพันธุ์ (spore) ลดลง ที่อัตราการทดสอบต่ำสุด และทำให้เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคไม่สร้างหน่วยสืบพันธ์เลยที่อัตราการทดสอบสูงสุด นอกจากนี้ในเชื้อรา *Fusarium* sp. และเชื้อรา *Phytophthora* sp. เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยังมีผลทำให้การสร้างหน่วยสืบพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรคลดลง ทั้งที่อัตราการทดสอบสูงสุด และต่ำสุดของการใช้อัตราการทดสอบทั้ง 2 อัตราที่ใช้ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % ภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ

Jongjeen and Akio (2007) ศึกษาการคัดแยก การจัดจำแนก การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราทนร้อน ที่มีคุณสมบัติ ในการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสจากดินรอบรากพืชในป่าชุมชนเขื่อนสิรินธร อ.สิรินธร จ. อุบลราชธานี เมื่อนำตัวอย่างดินมาคัดแยกเชื้อราบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่เติม Carboxymethyl cellulose (CMC) และ avicel (Av) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน ทำการคัดแยกและจำแนกเชื้อราด้วยวิธี slide culture เพื่อตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ร่วมกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ malt extract agar (MEA) และ Czapck’s agar (CZA) พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราทนร้อนได้ 9 ชนิด ได้แก่ *Arthoderma* sp. Isolate 1, *Arthoderma* sp.Isolate 2, *Aspergillus fumigates* Fresenius, *Aspergillus fumigatus* var. ellipitcus, *Aspergillus niger*, *Aspergillus thomii* Smith , *Bispora* sp., *Penicillium* sp. และ *Thichothecium roseum* เมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ CMC หรือ Av เป็นสับสเตรทด้วย congo-red test หรือ Lugol’s iodine testmuj pH 3.0, 7.0 และ 10.0 พบว่า Aspergillus niger สามารถสร้าง endocellulase ได้ดีที่สุดในทุกสภาวะ

Garima JHA and Vanamala ANJAIAH (2006) ศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์รอบรากพืช การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช รวมถึงการศึกษาถึงสารเมตาบอไลต์ของแบคทีเรียรอบรากพืชต่อการ

ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชอย่าง *Fusarium semitectum, Fusarium udum, Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* เป็นต้น และจากการทดสอบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญสูงสุดคือ *Pseudomonas fluorescent* (SAB8, GM4) และ *Bacillus* sp. (A555, GF23)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินงาน

1. การเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ในดินบริเวณรอบรากพืช

เก็บดินที่เกาะอยู่ตามบริเวณรอบรากพืช ซึ่งเป็นพืชที่ขึ้นในป่าเช่น ดอกไม้ป่าเป็นต้น โดยเก็บ 10-20 ตัวอย่างต่อพื้นที่ ที่เขื่อนสิรินธร จ. อุบลราชธานี

2. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย และรา ในดินบริเวณรอบรากพืช

แบคทีเรีย

1.นำดินตัวอย่างบริเวณรอบรากพืช 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ซึ่งมีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มล. จากนั้นเขย่าให้จุลินทรีย์หลุดออกมา ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน

2.ทำการเจือจางน้ำตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}

3. นำสารละลายดินเจือจางมา spread plate technique บน soil extract agar โดยทำความเจือจางละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °c เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมานับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

รา

1.นำดินตัวอย่างบริเวณรอบรากพืช 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ซึ่งมีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มล. จากนั้นเขย่าให้จุลินทรีย์หลุดออกมา ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน

2.ทำการเจือจางน้ำตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}

3.นำสารละลายดินเจือจางมา spread plate technique บน Potato dextrose agar pH 5.0 โดยทำความเจือจางละ 3 ซ้ำบ่มที่อุณหภูมิ 30 °c เป็นเวลา 5 วันนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

3. การทดสอบแบคทีเรีย และราในดินบริเวณรอบรากพืชที่คัดแยกได้ในการควบคุม และยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp., *Sclerotium* sp.

3.1 การทดสอบแบคทีเรียในการควบคุมและยับยั้งต่อเชื้อราก่อโรคพืช

1. นำ Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะเพื่อนำชิ้นวุ้นเชื้อรา *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp. ที่บ่มไว้ 7 วัน วางลงในจานอาหาร PDA ตรงจุดศูนย์กลาง บ่มเชื้อไว้ 48 ซม.

2. หลังจากนั้นวางแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไว้ 4 จุดในแนวจัตุรัสโดยห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 1.5 ซม. และในชุดควบคุมจะไม่มีการวางแบคทีเรีย

3. จากนั้นบ่มเชื้อไว้ 7 วัน จากนั้นจึงทำการวัดความยาวรัศมีเส้นใยของรา *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp. ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.2 การทดสอบเชื้อราในการควบคุมและยับยั้งต่อเชื้อราก่อโรคพืช

1. นำ Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะเพื่อนำชิ้นวุ้นเชื้อรา *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp. ที่บ่มไว้ 7 วัน วางลงในจานอาหาร PDA ตรงจุดศูนย์กลาง บ่มเชื้อไว้ 3 วัน

2. หลังจากนั้นจึงวางเชื้อราที่คัดแยกได้ไว้ 1 จุดในแนวเดียวกันกับเชื้อราก่อโรคพืช โดยวางห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 1.5 ซม.และในชุดควบคุมจะไม่มีการวางเชื้อราที่คัดแยกได้

3. จากนั้นบ่มเชื้อไว้ 7 วัน จากนั้นจึงทำการวัดความยาวรัศมีเส้นใยของรา *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp. ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

4. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ(Percent inhibition of radial growth-PIRG) คำนวณได้ ดังนี้

$$PIRG = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

เมื่อ R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานทดสอบ

หาค่าเฉลี่ยความยาวรัศมีของโคโลนี แล้วนำมาคำนวณหาค่า PIRG(Korsten et, al., 1995)

5. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียและราในดินบริเวณรอบรากพืช

1. แบคทีเรีย

1.1 ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยทำการศึกษา ขนาดของโคโลนี, รูปร่างของโคโลนี, ขอบหรือริมของโคโลนี, พื้นผิวหน้าของโคโลนี, ความสูงของโคโลนี, ความหนืด, ความขุ่น, การสร้างสีหรือรงควัตถุ

1.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยการย้อมสีแกรม มีวิธีการดังต่อไปนี้

1.2.1 การเตรียมสไลด์ มีวิธีการทำความสะอาดดังนี้ ให้ปราศจากไขมันทำได้ง่ายๆ โดยการใช้นิ้วจุ่มน้ำให้เปียก แตะผงซักฟอกและถูบนสไลด์ให้ทั่วทั้ง 2 ด้าน ทิ้งไว้ให้แห้งพอหมาดๆ แล้วใช้ผ้าแห้งสะอาดหรือกระดาษทิชชู่ เช็ดคราบผงซักฟอกโดยถูแรงๆให้คราบผงซักฟอกออกให้หมดจากสไลด์ทั้ง 2 ด้าน

1.2.2 เตรียมรอยสเมียร์โดยการทำเครื่องหมายวงกลมบริเวณที่จะสเมียร์ด้านหลังสไลด์ ในกรณีที่แบคทีเรียเจริญบนอาหารแข็ง ให้ใช้ loop เขี่ยเชื้อแตะน้ำ 1-2 loop ลงบนสไลด์ แล้วเขี่ยเชื้อเพียงเล็กน้อยแตะลงบนหยดน้ำแล้วทำการสเมียร์เชื้อให้ทั่วในหยดน้ำบริเวณตรงกลาง ทิ้งให้รอยสเมียร์แห้งเอง แล้วทำการ heat fix รอยสเมียร์โดยการลนผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง

1.2.3 หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที

เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วชะด้วยสารละลาบยไอโอดีน โดยหยดสารละลายไอโอดีนและทิ้งไว้นาน 1 นาที

1.2.4 เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95% หรือแอลกอฮอล์อาซีโตน จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำไหลผ่านเบาๆ

1.2.5 ซับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยการหยดสี safranin ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที

1.2.6 เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษทิชชู่ วางทิ้งไว้ให้แห้ง

1.2.7 นำสไลด์ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. รา

2.1 ลักษณะบางชนิดของราที่เจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยศึกษาผิวหน้าของโคโลนี (colony texture), ขอบของโคโลนี(colony margin), เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี(colony diameter(mm.)), สีของโคโลนี(colony color), สีที่เชื้อผลิตออกมาในอาหาร(soluble pigments in agar)

2.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทบยา โดยการศึกษาโครงสร้างของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้เทคนิค slide culture ซึ่งมีวิธีการทำดังต่อไปนี้

2.2.1 เทอาหาร PDA ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อให้ระดับอาหารสูงประมาณ 2 มม. ทิ้งไว้ให้เย็นและให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

2.2.2 ใช้มีดหรือมีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้วจึงกรีดอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างด้านละประมาณ 6 มม.

2.2.3 ใช้ปากคีบๆสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95% แล้วเผาไฟ 2 ครั้งแล้วจึงวางลงบนแท่งแก้วซึ่งงอเป็นข้อศอกในจานเพาะเชื้อ

2.2.4 ใช้มีดยกชิ้นวุ้น ที่ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส มาวางตรงกลางสไลด์ในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้

2.2.5 ใช้เข็มเขี่ยเขี่ยรามาแตะที่ส่วนหนาทั้ง 4 ด้านของชิ้นวุ้น

2.2.6 นำกระจกปิดสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95% และเผาไฟแล้ว ค่อยๆวางปิดชิ้นวุ้นซึ่งปลูกเชื้อแล้ว

2.2.7 เทน้ำกลั่นซึ่งมี 20% glycerol ลงไปให้ชุ่มกระดาษ หรืออาจจะใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออย่างเดียว

2.2.8 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเส้นใยของราเจริญจนถึงขอบของกระจกปิดสไลด์

2.2.9 ยกกระจกปิดสไลด์ขึ้น หยดแอลกอฮอล์ 95% ลงไปที่ตรงกลางของกระจกปิดสไลด์ด้านในซึ่งมีเส้นใยเชื้อราเจริญอยู่ เพื่อให้แอลกอฮอล์กระจายเข้าสู่เส้นใยรา

2.2.10 ก่อนที่แอลกอฮอล์จะแห้ง นำกระจกปิดสไลด์วางลงบนน้ำยา lactophenol cotton blue ซึ่งหยดตรงกลางสไลด์แผ่นใหม่

2.2.11 เขี่ยชิ้นวุ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสออกทิ้งไป และหยดแอลกอฮอล์ 95% ลงบนแผ่นสไลด์แล้วหยดน้ำยา lactophenol cotton blue ลงไปตรงกลางแผ่นสไลด์ก่อนแอลกอฮอล์แห้งสนิท ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์แผ่นใหม่

2.2.12 นำสไลด์ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ทั้งสองแผ่น มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

6. การจัดจำแนกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระดับเบื้องต้น

แบคทีเรีย: ศึกษาชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ระดับจีนัสโดยทำการทดลองและทดสอบคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบลักษณะกับในหนังสือ Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, volume 4 ปี 1989

รา: ศึกษาชนิดของราปฏิปักษ์ในระดับจีนัสโดยทำการทดลองและเปรียบเทียบกับในหนังสือ Compendium of soil fungi

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ในดินบริเวณรอบรากพืช

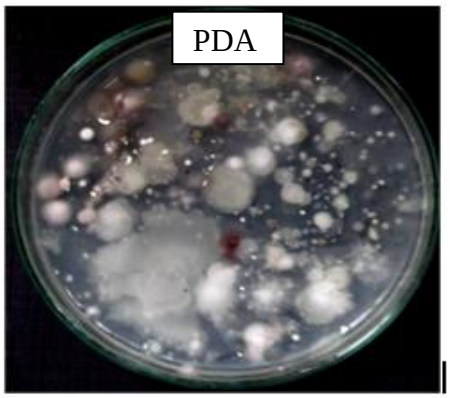
เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชในพื้นที่ป่าเขื่อนสิรินธร จ. อุบลราชธานี ซึ่งเก็บทั้งหมด 3 เส้นทาง และเก็บทั้งหมด 2 รอบ ในรอบที่ 1 (11-14 มกราคม 2554) ประกอบด้วยเส้นทางที่ 1 เก็บมาทั้งหมด 8 ตัวอย่าง เส้นทางที่ 2 เก็บมา 21 ตัวอย่างและเส้นทางที่ 3 เก็บมาทั้งหมด 9 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 38 ตัวอย่าง และรอบที่ 2 (กรกฎาคม 2554) ประกอบด้วยเส้นทางที่ 1 เก็บมาทั้งหมด 11 ตัวอย่าง เส้นทางที่ 2 เก็บมาทั้งหมด 12 ตัวอย่าง และเส้นทางที่ 3 เก็บมาทั้งหมด 5 ตัวอย่างรวมทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างดินที่เก็บในแต่ละเส้นทาง

เส้นทางที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่เก็บในแต่ละรอบ	
	รอบที่ 1	รอบที่ 2
1	8	11
2	21	12
3	9	5
รวมทั้งหมด	38	28

2. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย และรา ในดินบริเวณรอบรากพืช

ตัวอย่างดินรอบรากพืชที่เก็บมาทั้งหมด เมื่อนำมาศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ Soil extract agar และ Potato dextrose agar ดังรูปที่ 6 ซึ่งสามารถคัดเลือกโคโลนีจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันจากตัวอย่างดินรอบรากพืชทั้ง 2 รอบ ได้โคโลนีที่แตกต่างกันทั้งหมด 228 ไอโซเลท โดยในรอบที่ 1 สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 128 ไอโซเลท ดังนี้ เส้นทางที่ 1 คัดแยกได้จุลินทรีย์ทั้งหมด 18 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรีย 15 ไอโซเลท และเชื้อรา 3 ไอโซเลท เส้นทางที่ 2 คัดแยกได้จุลินทรีย์ทั้งหมด 64 ไอโซเลท ประกอบด้วย แบคทีเรีย 27 ไอโซเลท เชื้อรา 8 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 29 ไอโซเลท เส้นทางที่ 3 คัดแยกได้ทั้งหมด 46 ไอโซเลท ประกอบด้วย แบคทีเรีย 27 ไอโซเลท เชื้อรา 14 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 45 ไอโซเลท และในรอบที่ 2 สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลท ดังนี้ เส้นทางที่ 1 คัดแยกได้ 70 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรีย 45 ไอโซเลท และเชื้อรา 25 ไอโซเลท เส้นทางที่ 2 ได้ 20 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรีย 9 ไอโซเลท และเชื้อรา 11 ไอโซเลท และเส้นทางที่ 3 คัดแยกได้ 10 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรีย 5 ไอโซเลทและเชื้อรา 5 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 6 ความหลากหลายของโคโลนีจุลินทรีย์ที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด

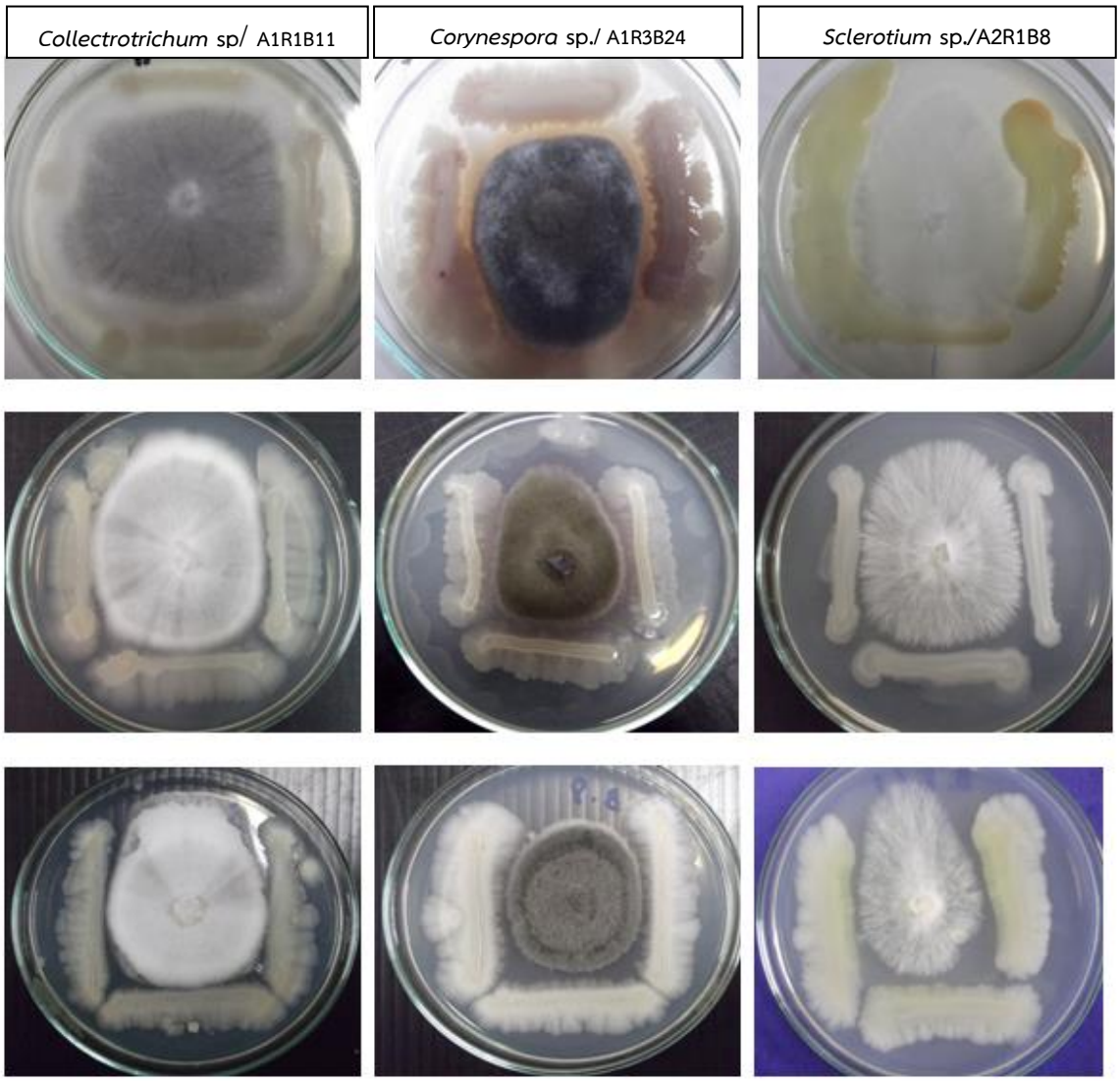
ตารางที่ 2 จำนวนไอโซเลทจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินรอบรากพืช

เส้นทางที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้					
	รอบที่ 1			รอบที่ 2		
	แบคทีเรีย	เชื้อรา	แอคติโนมัยสีท	แบคทีเรีย	เชื้อรา	แอคติโนมัยสีท
1	15	3	-	45	25	-
2	27	8	29	9	11	-
3	27	3	16	5	5	-
รวมทั้งหมด	69	14	45	59	41	-
	128			100		
	228 ไอโซเลท					

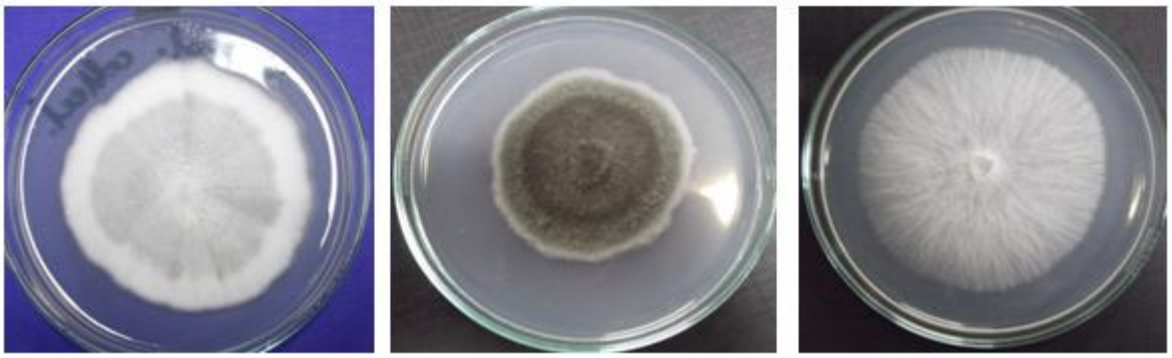
3. การทดสอบแบคทีเรีย และราในดินบริเวณรอบรากพืชที่คัดแยกได้ในการควบคุม และยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp.

ทุกไอโซเลทได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Corynespora* sp., *Collectrotrichum* sp. และ *Sclerotium* sp. ในการบันทึกผลจะดูผลบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะเห็นการต่อต้านการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยเห็นเป็นโซนใสกั้นแบ่งระหว่างเชื้อสองชนิดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมจะเห็นโคโลนีของเชื้อราสามารถเจริญได้ปกติ ซึ่งผลที่ได้พบว่าจากไอโซเลทเชื้อทั้งหมด 228 ไอโซเลท มีเพียง 40 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Collectrotrichum* sp. ได้ ประกอบด้วยแบคทีเรีย 19 ไอโซเลท รา 16 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 5 ไอโซเลท ส่วนไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Corynespora* sp. ได้มีทั้งหมด 48 ไอโซเลทได้แก่ แบคทีเรีย 27 ไอโซเลท รา 18 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 3 ไอโซเลท และมีเพียง 27 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sclerotium* sp. ได้ประกอบด้วยแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 19 ไอโซเลท ซึ่งในจำนวนนี้สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามรถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปได้ทั้งสิ้น 32 ไอโซเลท ดังนี้ ในรอบที่ 1 จากเส้นทางที่ 1 มี 9 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้ ได้แก่ แบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท A1R1B2, A1R1B3, A1R1B6, A1R1B9, A1R1B10, A1R1B11, A1R1B12 และไอโซเลท A1R1B14 และเชื้อรา 1 ไอโซเลทคือไอโซเลท A1R1F1 ในเส้นทางที่ 2 มี 8 ไอโซเลท

ประกอบด้วยแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท A1R2B13, A1R2B15, A1R2B16 และไอโซเลท A1R2B19 เชื้อรา 4 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท A1R2F3, A1R2F4, A1R2F5 และไอโซเลท A1R2F7 ในเส้นทางที่ 3 มี 5 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคด้วยแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท A1R3B12, A1R3B15 และ A1R3B24 และ แอคติโนมัยสีท 2 ไอโซเลท คือไอโซเลท A1R3A4 และไอโซเลท A1R3A6 และในส่วนของรอบที่ 2 จากเส้นทางที่ 1 มีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ได้แก่แบคทีเรีย 1 ไอโซเลทคือไอโซเลท A2R1B8 เชื้อรา 6 ไอโซเลท A2R1F3, A2R1F8, A2R1F11, A2R1F18, A2R1F20 และไอโซเลท A2R1F23 ในส่วนของเส้นทางที่ 2 มีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 3 ไอโซเลทซึ่งพบเพียงเชื้อราเท่านั้น ได้แก่ไอโซเลท A2R2F3, A2R2F6 และไอโซเลท A2R2F7 ดังแสดงผลในตารางที่ 3 และ 4 ซึ่งในจำนวนนี้มีเพียงแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชได้ทั้ง 3 ชนิด คือไอโซเลท A1R1B11, A1R3B24 และไอโซเลท A2R1B8 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 7 และ 8



รูปที่ 7 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชได้ทั้ง 3 ชนิด



รูปที่ 8 ชุดควบคุมของแต่ละเชื้อทดสอบได้แก่ *Collectrotrichum* sp., *Corynespora* sp. และ *Sclerotium* sp. ตามลำดับ

ตารางที่ 3 จุลินทรีย์จากตัวอย่างดินในรอบที่ 1 ที่ให้ผลบวกในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชแต่ละชนิด

ครั้งที่เก็บตัวอย่าง	เส้นทางที่เก็บตัวอย่าง	จุลินทรีย์	ไอโซเลท	*Collectotrichum* sp.	*Corynespora* sp.	*Sclerotium* sp.
1	1	แบคทีเรีย	A1R1B2	+	+	-
			A1R1B3	+	+	-
			A1R1B6	+	+	-
			A1R1B9	+	+	-
			A1R1B10	+	+	-
			A1R1B11	+	+	+
			A1R1B12	+	+	-
			A1R1B14	+	+	-
		รา	A1R1F1	+	+	-
	2	แบคทีเรีย	A1R2B13	-	+	+
			A1R2B15	+	+	-
			A1R2B16	-	+	+
			A1R2B19	-	+	+
		รา	A1R2F3	+	+	-
			A1R2F4	+	+	-
			A1R2F5	+	+	-
			A1R2F7	+	+	-
	3	แบคทีเรีย	A1R3B12	+	+	-
			A1R3B15	+	+	-
			A1R3B24	+	+	+
		แอคติโนมัยสีท	A1R3A4	+	+	-
			A1R3A6	+	+	-

หมายเหตุ : + = ยับยั้งได้ /-= ยับยั้งไม่ได้

ตารางที่ 4 จุลินทรีย์จากตัวอย่างดินในรอบที่ 2 ที่ให้ผลบวกในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชแต่ละชนิด

ครั้งที่เก็บตัวอย่าง	เส้นทางที่เก็บตัวอย่าง	จุลินทรีย์	ไอโซเลท	*Collectotrichum* sp.	*Corynespora* sp.	*Sclerotium* sp.
2	1	แบคทีเรีย	A2R1B8	+	+	+
		รา	A2R1F3	+	+	-
			A2R1F8	+	+	-
			A2R1F11	+	+	-
			A2R1F18	+	+	-
			A2R1F20	+	+	-
			A2R1F23	+	+	-
	2	รา	A2R2F3	+	+	-
			A2R2F6	+	+	-
			A2R2F7	+	+	-

หมายเหตุ : + = ยับยั้งได้ /-= ยับยั้งไม่ได้

4. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ

ในการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคพืชจะได้ทำการวัดความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อราก่อโรคพืช และถูกนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent inhibition of radial growth-PIRG) ซึ่งจะแสดงผลดังในตารางที่ 5 และ 6 ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่าในจำนวนของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมดที่ผ่านการทดสอบการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชจะให้เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญในระดับปานกลาง โดยพบว่าไอโซเลตที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Collectotrichum* sp. สูงที่สุดคือแบคทีเรียไอโซเลต A1R1B3 และ A1R2B15 ที่ระดับเปอร์ซ็นต์การยับยั้งที่ 42.85% เชื้อราไอโซเลต A1R2F3, A1R2F5, A2R1F3, A2R1F11 และไอโซเลต A2R1F20 ที่ระดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญที่ 50.00% และแอคติโนมัยสีทไอโซเลต A1R3A4 ที่ระดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญที่ 50.00% ส่วนไอโซเลตที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Corynespora* sp. สูงที่สุดคือแบคทีเรียไอโซเลต A1R2B13 ที่ระดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญที่ 51.25% เชื้อราไอโซเลต A1R2F5 ที่ระดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญที่ 56.25% และแอคติโนมัยสีทไอโซเลต A1R3A7 และไอโซเลตที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Sclerotium* sp. สูงที่สุดคือแบคทีเรียไอโซเลต A2R1B8 ที่ระดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญที่ 56.25% ในจำนวนนี้ทั้งหมดสามารถคัดเลือกได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชได้ทั้ง 3 ชนิด มี 3 ไอโซเลตได้แก่ไอโซเลต A1R1B11, A1R3B24 และไอโซเลท A2R1B8 ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Collectotrichum* sp. ที่ 30.77%, 31.42% และ 40.00% ตามลำดับ และให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Corynespora* sp. ที่ 33.33%, 35.71% และ 46.66% ตามลำดับ และให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Sclerotium* sp. ที่ 28.12%, 34.21% และ 56.26% ตามลำดับดังที่แสดงดังรูปที่ 9

ตารางที่ 5 ค่าความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราและค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญจากตัวอย่างดินในรอบที่ 1

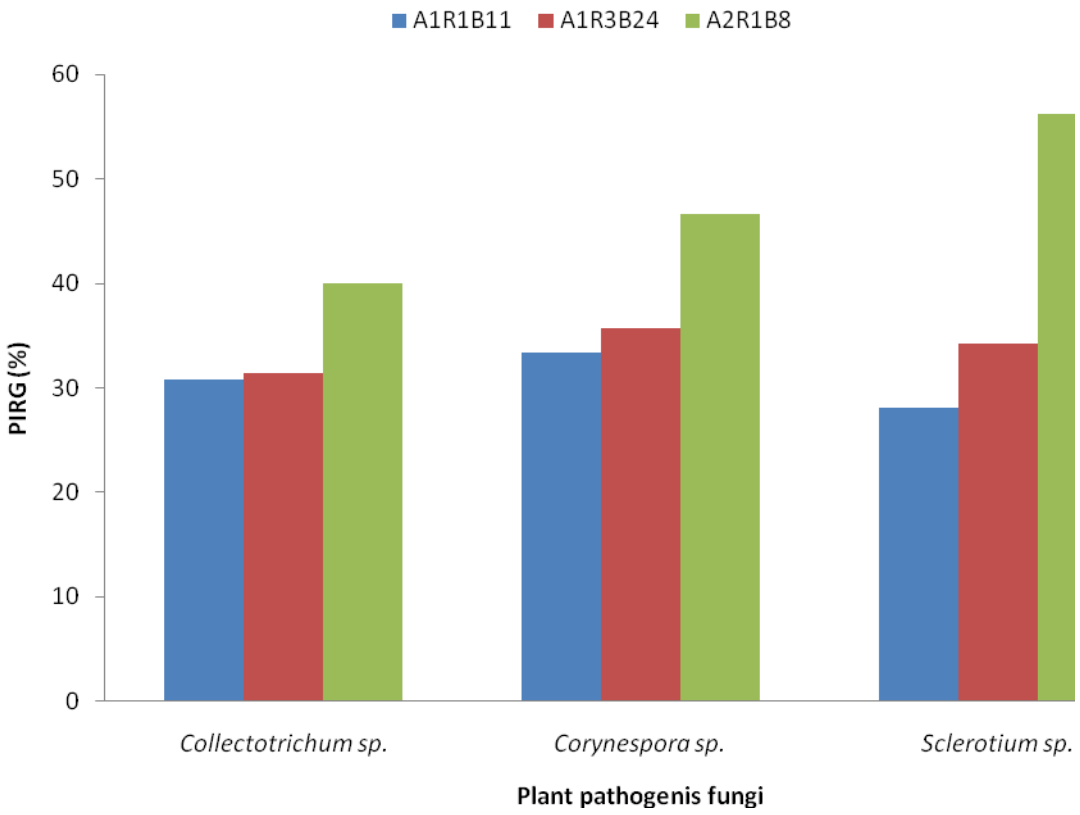
ครั้งที่เก็บตัวอย่าง	เส้นทางที่เก็บตัวอย่าง	จุลินทรีย์	ไอโซเลท	*Collectotrichum* sp.		*Corynespora* sp.		*Sclerotium* sp.	
				R(cm)*	PIRG	R(cm)*	PIRG	R(cm)*	PIRG
1	1	แบคทีเรีย	A1R1B2	4.50	30.77	3.00	50.00	-	-
			A1R1B3	2.00	42.85	2.40	20.00	-	-
			A1R1B6	2.60	35.00	2.00	33.33	-	-
			A1R1B9	2.60	38.09	1.80	35.71	-	-
			A1R1B10	2.80	30.00	2.10	32.25	-	-
			A1R1B11	2.70	30.77	2.00	33.33	2.30	28.12
			A1R1B12	2.50	37.50	1.90	32.14	-	-
			A1R1B14	2.60	39.53	2.00	33.33	-	-
		รา	A1R1F1	2.70	10.00	2.20	26.66	-	-
	2	แบคทีเรีย	A1R2B13	-	-	1.95	51.25	2.75	31.25
			A1R2B15	2.00	42.85	2.20	45.00	-	-
			A1R2B16	-	-	2.00	42.85	2.50	37.50
			A1R2B19	-	-	2.00	42.85	2.70	32.50
		รา	A1R2F3	1.50	50.00	1.50	53.12	-	-
			A1R2F4	1.70	43.33	1.50	53.12	-	-
			A1R2F5	1.50	50.00	1.40	56.25	-	-
			A1R2F7	1.70	43.33	1.60	50.00	-	-
	3	แบคทีเรีย	A1R3B12	2.35	32.85	2.25	35.71	-	-
			A1R3B15	2.37	32.28	2.25	35.71	-	-
			A1R3B24	2.40	31.42	2.25	35.71	2.50	34.21
		แอคติโนมัยสีท	A1R3A4	2.00	50.00	2.00	42.85	-	-
			A1R3A6	2.20	45.00	1.75	50.00	-	-

หมายเหตุ : R* = ค่าเฉลี่ยความยาวรัศมีของโคโลนี

ตารางที่ 6 ค่าความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราและค่าเปอร์เนต์การยับยั้งการเจริญจากตัวอย่างดินในรอบที่ 2

ครั้งที่เก็บตัวอย่าง	เส้นทางที่เก็บตัวอย่าง	จุลินทรีย์	ไอโซเลท	*Collectotrichum* sp.		*Corynespora* sp.		*Sclerotium* sp.	
				R(cm)*	PIRG	R(cm)*	PIRG	R(cm)*	PIRG
2	1	แบคทีเรีย	A2R1B8	2.25	40.00	2.00	46.66	1.75	56.25
		รา	A2R1F3	1.50	50.00	1.65	45.00	-	-
			A2R1F8	1.60	46.66	1.75	41.66	-	-
			A2R1F11	1.50	50.00	1.50	50.00	-	-
			A2R1F18	2.00	33.33	2.00	33.33	-	-
			A2R1F20	1.50	50.00	1.75	41.66	-	-
			A2R1F23	1.75	41.66	1.70	43.33	-	-
	2	รา	A2R2F3	1.85	38.33	1.50	50.00	-	-
			A2R2F6	1.75	41.66	1.75	41.66	-	-
			A2R2F7	1.70	43.33	1.50	50.00	-	-

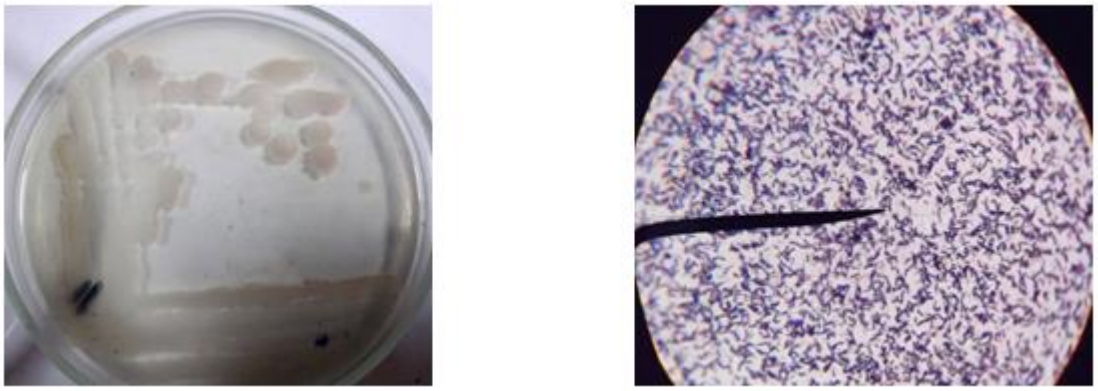
หมายเหตุ : R* = ค่าเฉลี่ยความยาวรัศมีของโคโลนี



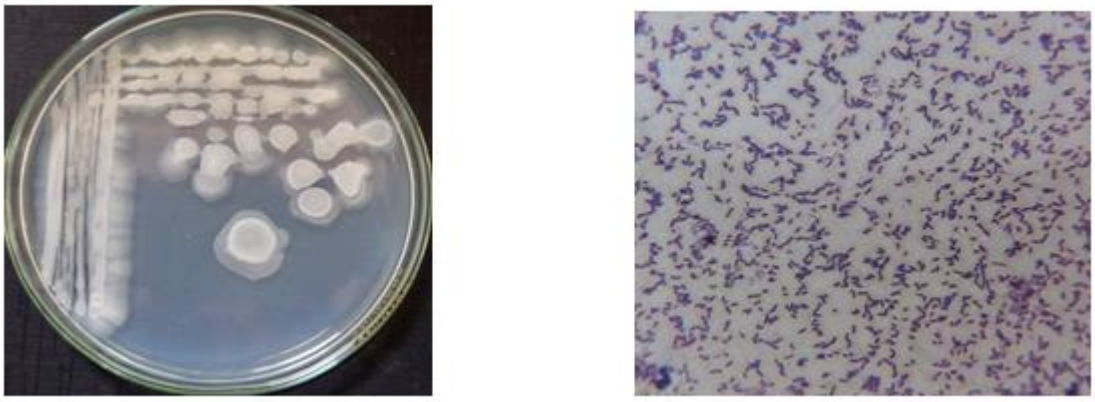
รูปที่ 9 ค่าระดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

5. **การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียและราในดินบริเวณรอบรากพืช**

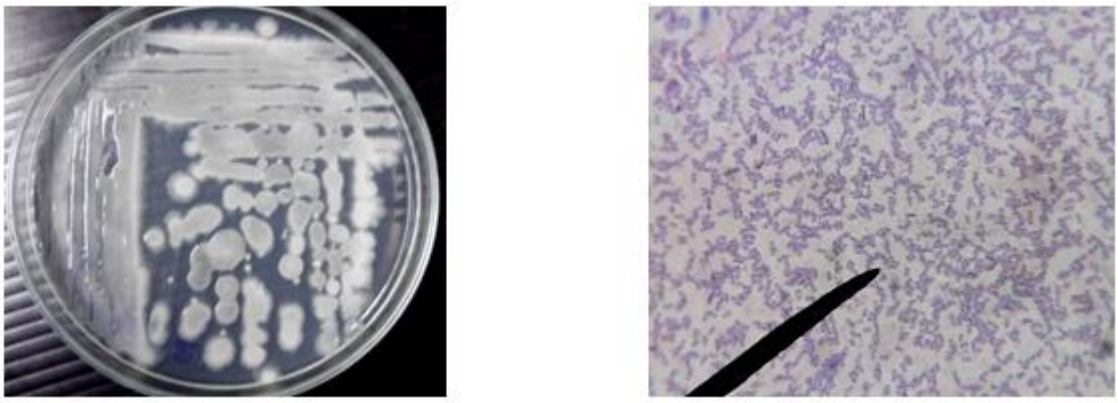
เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท A1R1B11, A1R3B24 และไอโซเลท A2R1B8 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชได้ทั้ง 3 ชนิดมาศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่าลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท A1R1B11 จะมีลักษณะสีขาว-ชมพูอ่อน มีขนาดใหญ่ ผิวหน้าเรียบมัน ขอบไม่เรียบ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเซลล์รูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก การเรียงตัวของเซลล์จะเรียงตัวแบบเซลล์เดี่ยวหรือเรียงกัน 2-4 เซลล์ ไม่พบการสร้างสปอร์ดังแสดงดังรูปที่ 10 ส่วนลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท A1R3B24 จะมีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ผิวหน้าแบบเรียบมัน ขอบโคโลนีไม่เรียบ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเซลล์รูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก เรียงตัวเซลล์เดี่ยวหรือเรียงต่อกัน ไม่พบการสร้างสปอร์ดังแสดงดังรูปที่ 11 และไอโซเลท A2R1B8 ลักษณะโคโลนีสีขาวครีม ขอบของโคโลนีไม่เรียบ ผิวหน้าแบนไม่โค้งนูน มันวาว ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์แบคทีเรียรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวกที่หัวท้ายเซลล์อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวเรียงตัวกระจัดกระจาย แสดงดังรูปที่ 12



รูปที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท A1R1B11



รูปที่ 11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท A1R3B24



รูปที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท A2R1B8

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชที่ได้เก็บมาศึกษาทัง 2 รอบนั้น สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันได้ถึง 228 ไอโซเลท โดยพบว่าจุลินทรีย์ในรอบที่ 2 (เดือนกรกฎาคม) มีความหลากหลายมากกว่าในรอบที่ 1 (เดือนมกราคม) เนื่องจากในช่วงเดือนกรกฎาคมเป็นช่วงฤดูฝน ซึ่งเป็นช่วงที่สภาวะแวดล้อมต่างๆมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งในจำนวนนี้เมื่อนำมาทดสอบถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 32 ไอโซเลท ประกอบไปด้วยแบคทีเรียทั้งหมด 16 ไอโซเลท เชื้อรา 14 ไอโซเลท และแอคติโนมัยสีท 2 ไอโซเลท ซึ่งจะเห็นว่าไอโซเลตส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Collectotrichum* sp. และ *Corynespora* sp. ได้ดีกว่า *Sclerotium* sp. อาจเนื่องมาจาก *Sclerotium* sp. เจริญได้เร็วกว่าเชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจำนวนนี้มีแบคทีเรียเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่แบคทีเรียไอโซเลท A1R1B11, A1R3B24 และไอโซเลท A2R1B8 ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลทนี้จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Collectotrichum* sp. ที่ 22.85%, 31.42% และ 40.00% ตามลำดับ และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *Corynespora* sp. ที่ 39.39%, 35.71% และ 46.66% ตามลำดับ และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *Sclerotium* sp. ที่ 42.50%, 34.21% และ 56.25% ตามลำดับ และเมื่อนำมาศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่า โคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท A1R1B11 จะมีลักษณะสีขาว-ชมพูอ่อน มีขนาดใหญ่ ผิวหน้าเรียบมัน ขอบไม่เรียบ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเซลล์รูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก การเรียงตัวของเซลล์จะเรียงตัวแบบเซลล์เดี่ยวหรือเรียงกัน 2-4 เซลล์ ไม่พบการสร้างสปอร์ ส่วนลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท A1R3B24 จะมีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ผิวหน้าแบบเรียบมัน ขอบโคโลนีไม่เรียบ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเซลล์รูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก เรียงตัวเซลล์เดี่ยวหรือเรียงต่อกัน ไม่พบการสร้างสปอร์ และไอโซเลท A2R1B8 ลักษณะโคโลนีสีขาวครีม ขอบของโคโลนีไม่เรียบ ผิวหน้าแบนไม่โค้งนูน มันวาว ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์แบคทีเรียรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวกที่หัวท้ายเซลล์ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวเรียงตัวกระจัดกระจาย

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ ดวงมาลย์ และคณะ. 2552. จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สยบโรคข้าว. รายงานวิจัย. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผักและไม้ประดับ กองโรคพืชและจุลชีวเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2554). *ผักตระกูลแตงกับโรคที่เกิดกับผักตระกูลแตง.* 10 กุมภาพันธ์ 2555, จากเวบไซต์: http://www.thaikasetsart.com

ชุติมา เกื้อกูลวงศ์. 2008. การต่อต้านเชื้อรา Sclerotium rolfsii โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดแยกจากดินและกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล.

มหาวิทาลัยเกษตรศาสตร์. (2552). *ไรโซแบคทีเรีย.* 10 กุมภาพันธ์ 2555, จากเวบไซต์: thhp://www.ku.ac.th/e-magazine/jan52/agri/agri2.htm

วิชัย ก่อประดิษฐ์กุล และ ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์. 2544. ผลของสารสกัดจากพลู กานพลู CaCl2 D-fructose Chitosan และเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเน่าของแง่งขิงระหว่างการเก็บรักษา. รายงานการวิจัย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

สุมาลี เม่นสิน และ พิภพ ลำยอง. 2550. ผลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในการควบคุมโรคทางรากบางชนิดของพริกภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ. รายงานการวิจัย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Garima JHA, Vanamala ANJAIAH. (2006). Metabolites of rhizobacteria antagonistic towards fungal plant pathogens. Department of Botany, University of Delhi, Delhi - 110 007, India.

Jonjeen, J. and Akio, S. (2007). Screening and Identification of Thermophilic Cellulolytic Fungi from Soil. Agriculturcal Sci. J. 38(6) (Suppl.): 291-294

Korsten, L. and E.S. De Jager, (1995). Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado postharvest pathogens. S.Afr. Avocado Growers Assoc. Yearb, 18, 124-130.

http://it.doa.go.th

http://dc195.4shared.com/doc/Y2EOkhCK/preview.html

http://www.oard1.org/techniquestory/28052552/oksite1/Index9.htm

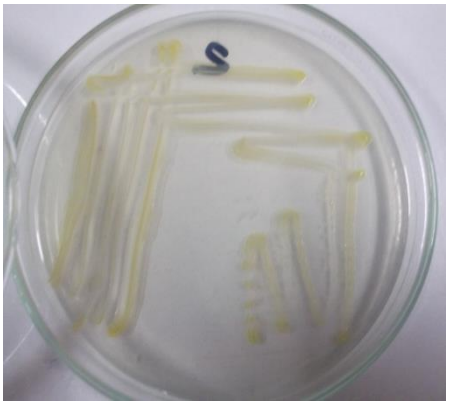
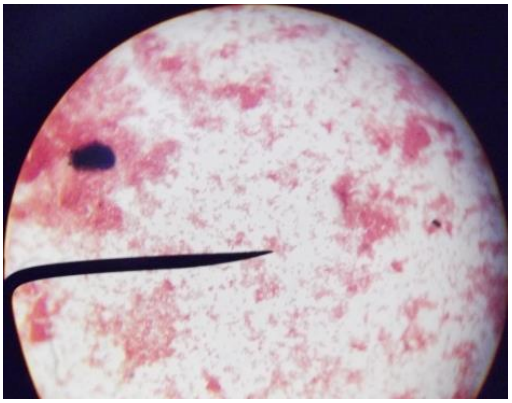
http://regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/3/2535_fujiiy.htm

ภาคผนวก ก

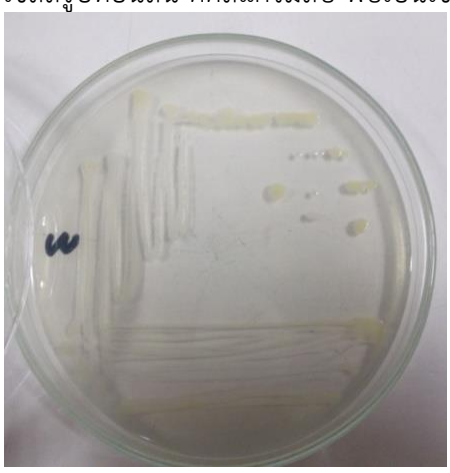
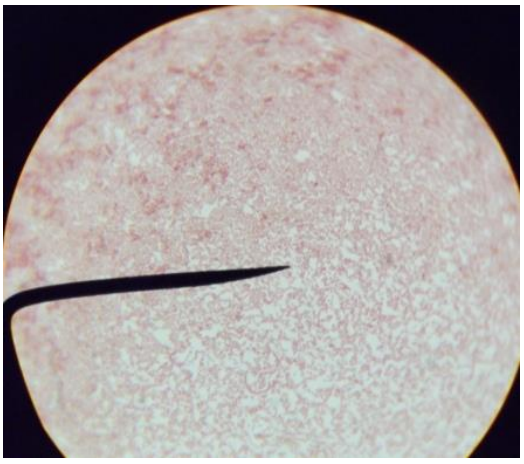
จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

1. แบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืช

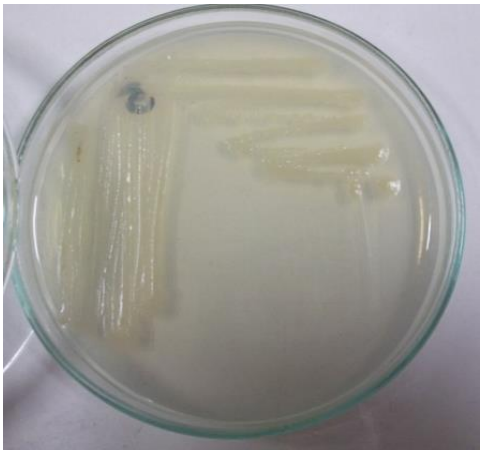
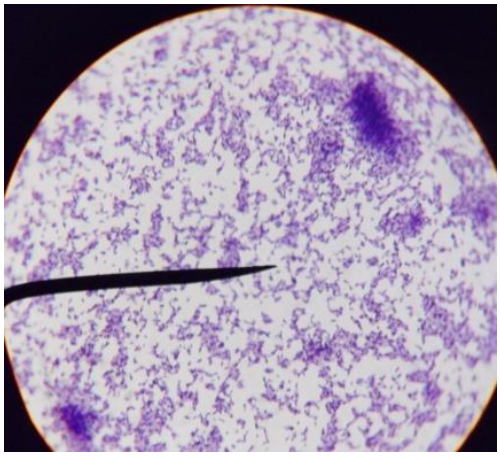
1.1 แบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินรอบที่ 1 แปลงที่ 1

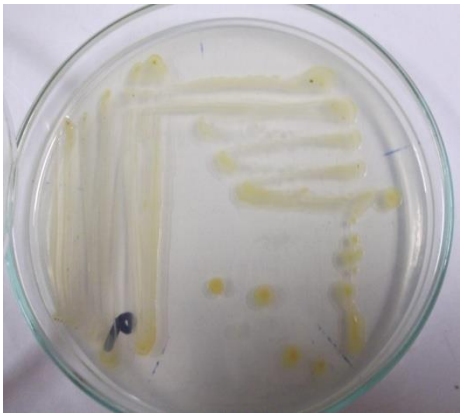
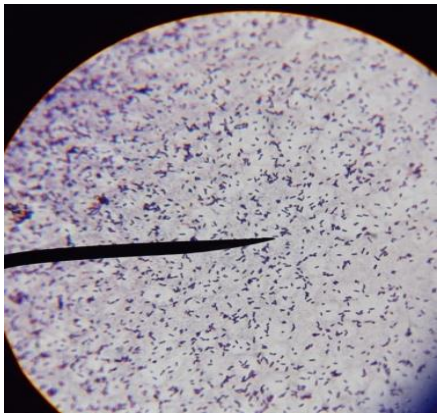
ไอโซเลท A1R1B2 โคโลนีขนาดเล็ก สีเหลืองอ่อน กลมขอบเรียบ ผิวหน้าโค้งนูน มันวาว เซลล์รูปท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวกัน 2-3 เซลล์ ไม่พบการสร้างสปอร์

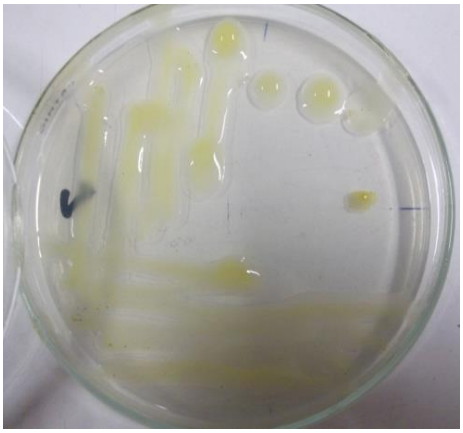
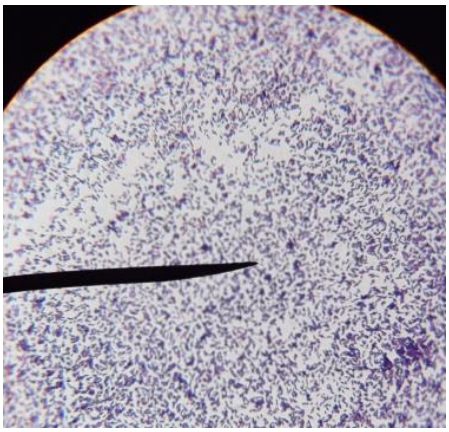
ไอโซเลท A1R1B3 โคโลนีสีขาวขุ่น-เหลืองผิวหน้าโค้งนูน ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวกัน 2-4 เซลล์ ไม่พบการสร้างสปอร์

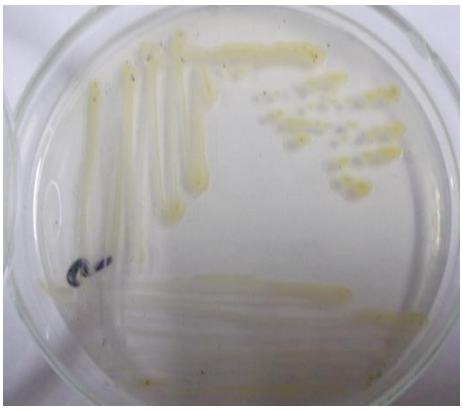
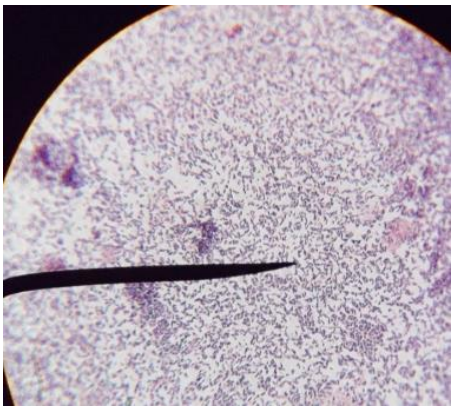
ไอโซเลท A1R1B5 โคโลนีกลมขอบเรียบสีเหลืองอ่อนๆ ผิวหน้าโค้งนูนมันวาว เซลล์รูปกลมรี-ท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือรวมกันเป็นกลุ่ม ไม่พบการสร้างสปอร์

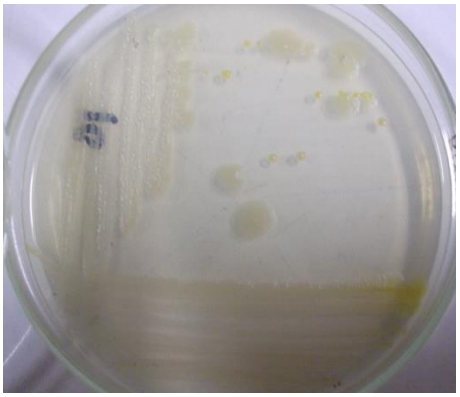
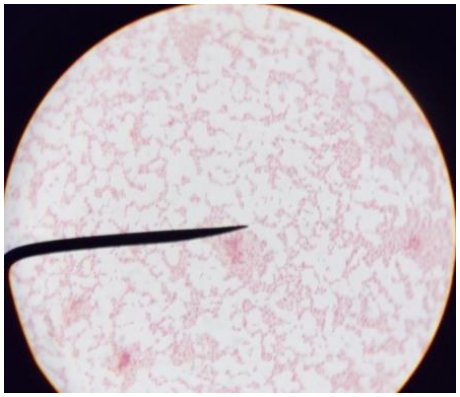
ไอโซเลท A1R1B 6 โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหน้าโค้งนูนตรงกลาง มันวาว ขอบไม่เรียบ เซลล์รูปท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวกัน 2-3 เซลล์ ไม่พบการสร้างสปอร์

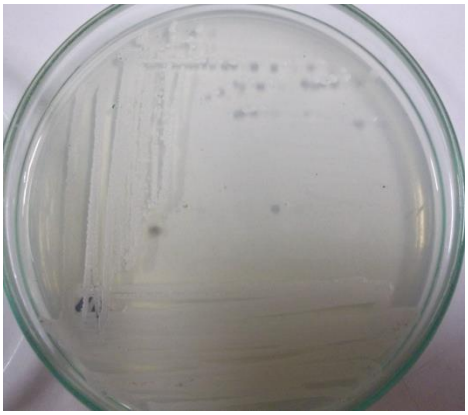
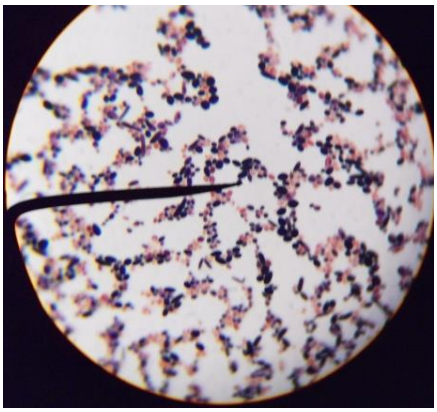
ไอโซเลท A1R1B7 โคโลนีสีเหลืองขุ่น ขนาดกลมใหญ่ ขอบเรียบ มันเยิ้ม เซลล์รูปกลมรี-ท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวกัน 2-3 เซลล์ ไม่พบการสร้างสปอร์

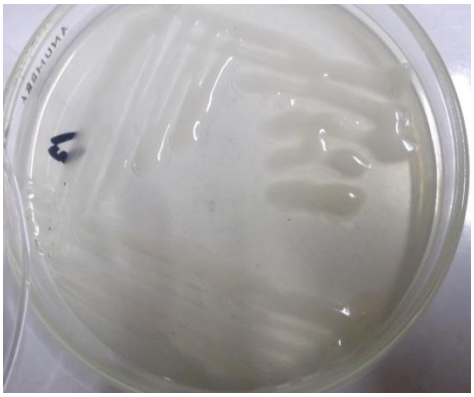
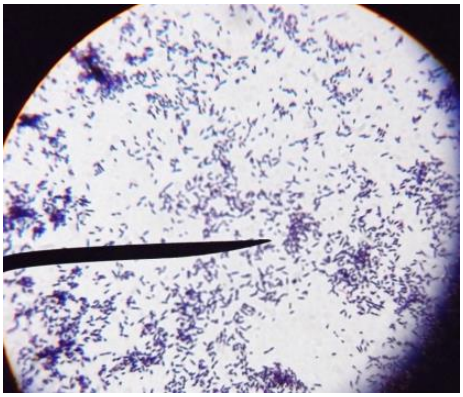
ไอโซเลท A1R1B9 โคโลนีสีเหลืองอ่อนขุ่น กลมเล็ก ขอบเรียบ ผิวหน้าโค้งนูน มันวาว เซลล์รูปกลมรี-ท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวกัน 2-3 เซลล์ ไม่พบการสร้างสปอร์

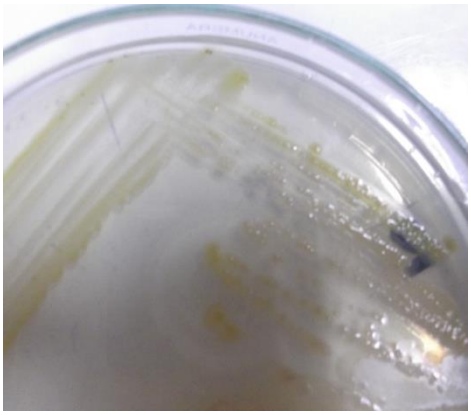
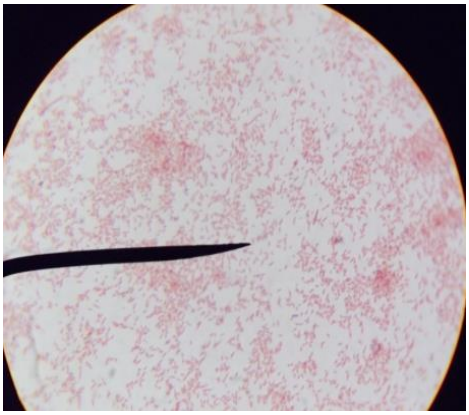
ไอโซเลท A1R1B10 โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหน้าโค้งนูนขรุขระ มัน ขอบไม่เรียบ เซลล์รูปกลมรี-ท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวกัน 2-4 เซลล์ ไม่พบการสร้างสปอร์

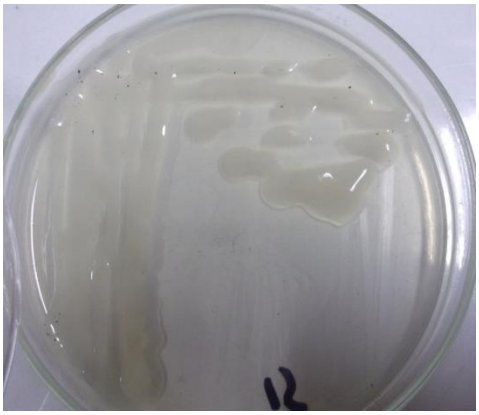
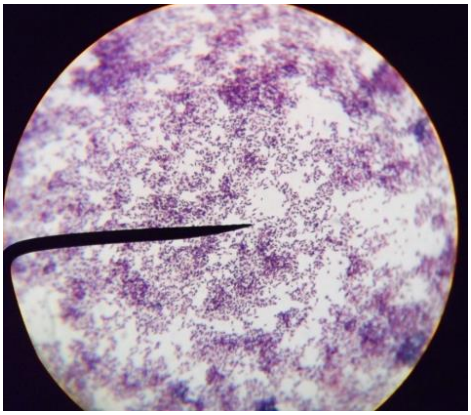
ไอโซเลท A1R1B12 โคโลนีสีขาว กลมเล็ก ขอบเรียบ ผิวหน้ามัน และโค้งนูน เซลล์รูปกลมรี-ยาวเรียว ติดสีแกรมบวก พบเรียงตัวกันแบบ streptococci ไม่พบการสร้างสปอร์

ไอโซเลท AR1B13 โคโลนีกลมขอบเรียบ โค้งนูน สีขาวขุ่น มันเยิ้ม เซลล์รูปท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวกัน 1-2 เซลล์ ไม่พบการสร้างสปอร์

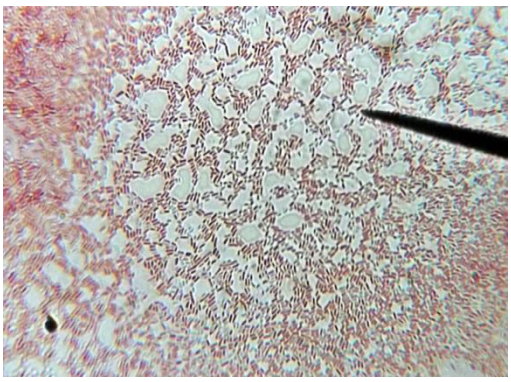



ไอโซเลท A1R1B14 โคโลนีขนาดเล็กสีเหลือง ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าโค้งนูน มันวาว เซลล์รูปท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวกัน 1-2 เซลล์ ไม่พบการสร้างสปอร์

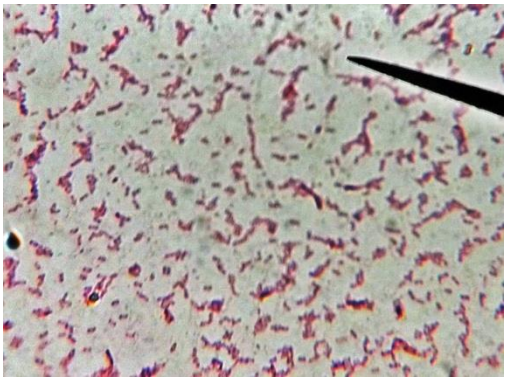



ไอโซเลท A1R1B15 โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น มันเยิ้ม ผิวหน้าโค้งนูน เซลล์รูปกลมรี-ท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวกัน 2-3 เซลล์หรืออยู่เป็นกลุ่ม ไม่พบการสร้างสปอร์

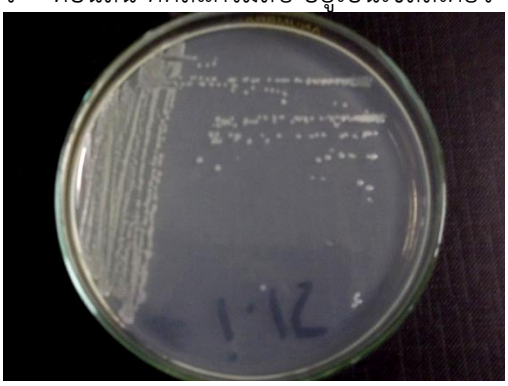
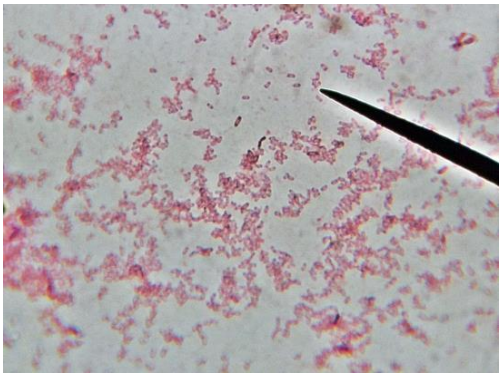
1.2 แบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินรอบที่ 1 แปลงที่ 1



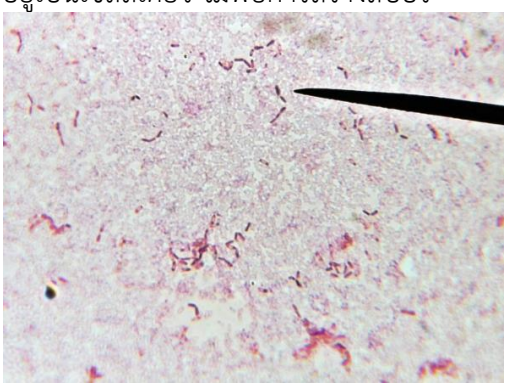
ไอโซเลท A1R2B6 โคโลนีมีขนาดใหญ่ สีขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าแห้ง ไม่โค้งนูน เซลล์มีรูปร่างกลมรี-ท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เรียงกัน 2-3 เซลล์



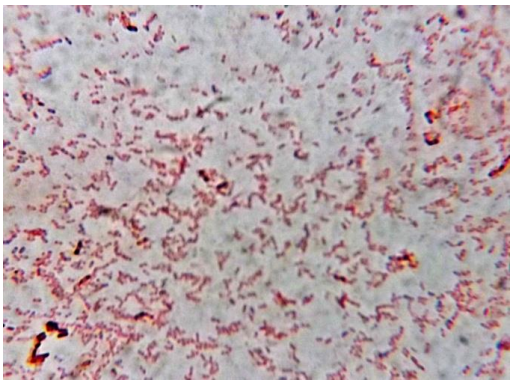
ไอโซเลท A1R2B13 โคโลนีขนาดใหญ่ สีขาวใส ขอบไม่เรียบ ผิวหน้ามัน เซลล์รูปร่างกลม รี – ท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว

ไอโซเลท A1R2B15 โคโลนีขนาดเล็ก สีขาว-เหลืองอ่อน ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว มีลักษณะโค้งนูน เซลล์รูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ไม่พบการสร้างสปอร์

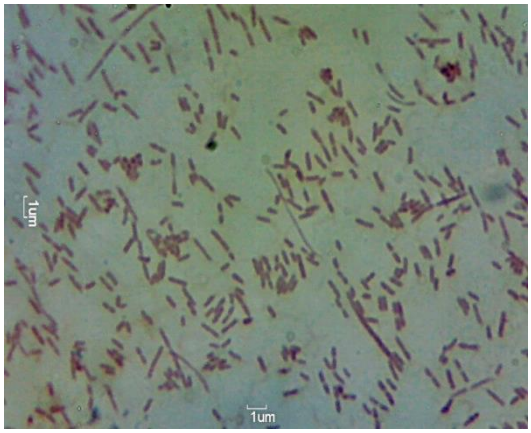


ไอโซเลท A1R2B16 โคโลนีใหญ่ สีขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ ผิวหน้ามัน ไม่โค้งนูน เซลล์รูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงต่อกัน 2-3 เซลล์ ไม่สร้างเอนโดสปอร์

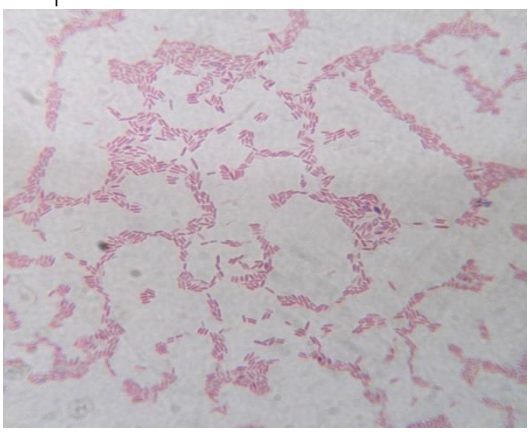


ไอโซเลท A1R2B19 โคโลนีขนาดใหญ่สีขาว ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าแห้งมัน ไม่โค้งนูน เซลล์รูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ไม่พบการสร้างสปอร์

1.3 แบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินรอบที่ 1 แปลงที่ 3



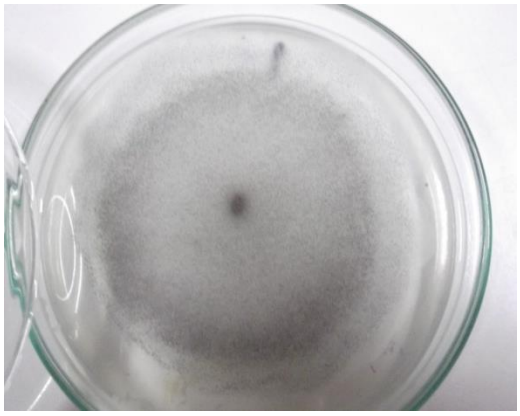
ไอโซเลท A1R3B12 โคโลนีขนาดใหญ่ มีลักษณะมันเยิ้ม ขุ่นๆ โค้งนูน แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว-คู่ หรือเรียงตัวเป็นเส้นสั้นๆ ไม่สร้างสปอร์

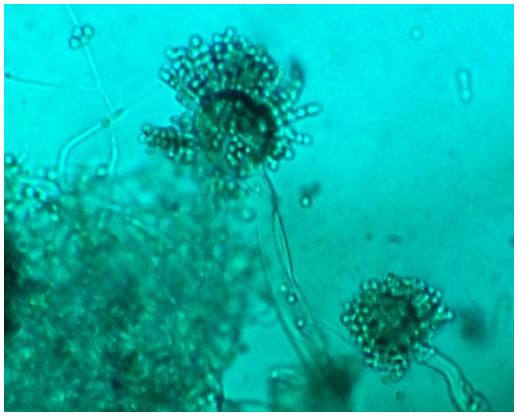


ไอโซเลท A1R3B15 โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ โค้งนูน แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว-คู่ ไม่สร้างสปอร์

2. ราปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืช

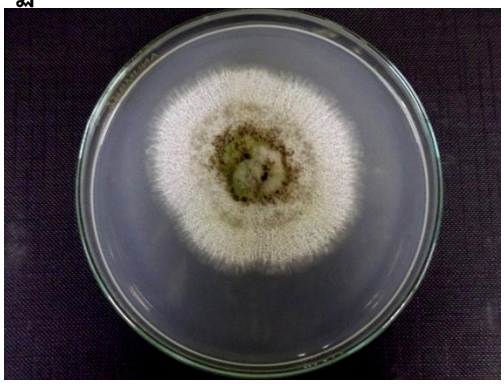
2.2 ราปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินรอบที่ 1 แปลงที่ 1



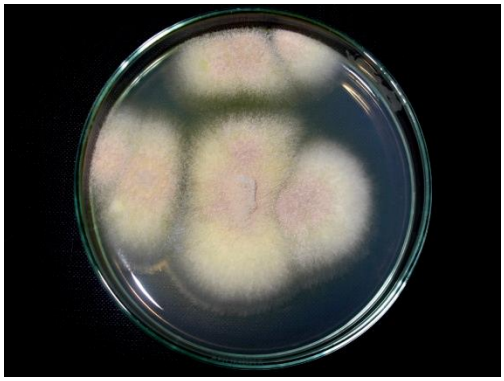
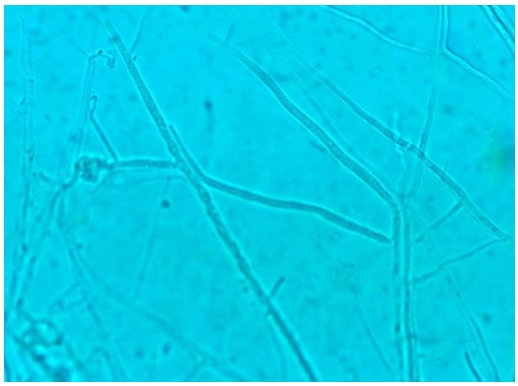


ไอโซเลท A1R1F1 เส้นใยราสีขาวฟู สร้างสปอร์สีดำ เส้นใยราไม่พบผนังกั้น มีการแตกแขนงของเส้นใยรา พบการสร้าง sporangium บน sporangiophore ที่มีลักษณะเป็นกระเปาะ

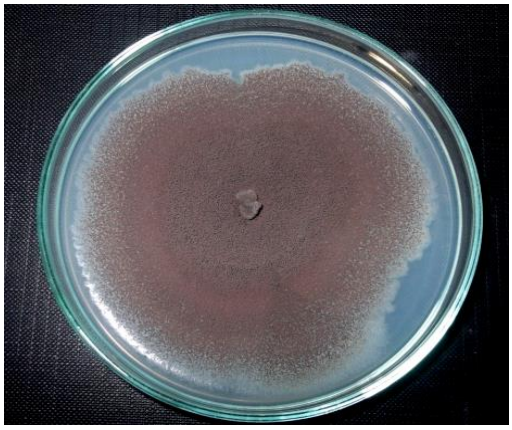
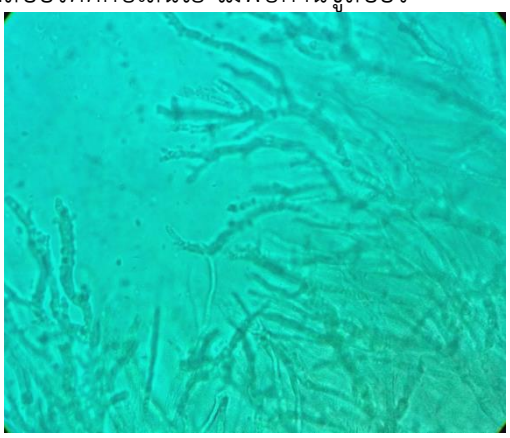
2.2 ราปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินรอบที่ 1 แปลงที่ 2



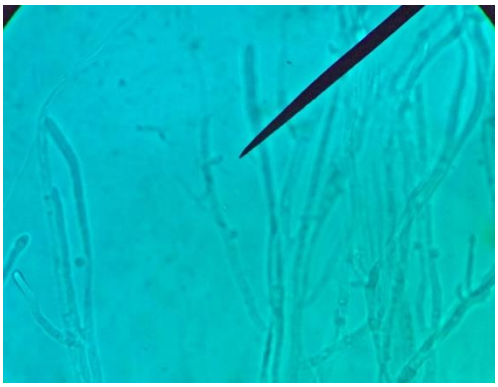
ไอโซเลท A1R2F3 เส้นใยราสีขาว ไม่ฟู สร้างสปอร์สีน้ำตาล บนเส้นใยรามีลักษณะเหมือนหยดน้ำเล็กๆเกาะอยู่ เส้นใยรามีผนังกั้น มีการแตกแขนงของเส้นใย และพบการสร้าง sporangium บน sporangiophore

ไอโซเลท A1R2F4 เส้นใยราฟู สีเหลืองอ่อน ไม่พบการสร้างอับสปอร์ เส้นใยราไม่พบผนังกั้น มีการแตกแขนงของเส้นใย พบมีการสร้างสปอร์ติดกับเส้นใย ไม่พบก้านชูสปอร์

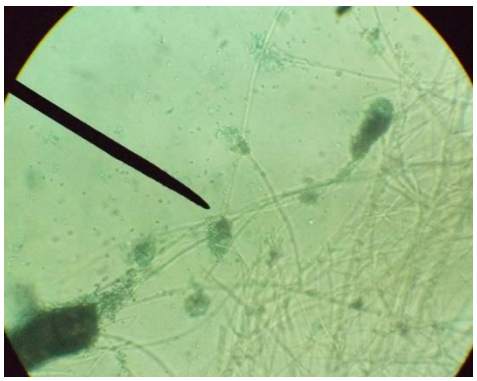



ไอโซเลท A1R2F5 เส้นใยราสีน้ำตาล สร้างสปอร์สีน้ำตาลดำ เส้นใยรามีผนังกั้น มีการแตกแขนงของเส้นใย มีการสร้างสปอร์บนเส้นใย ไม่มีก้านชูสปอร์

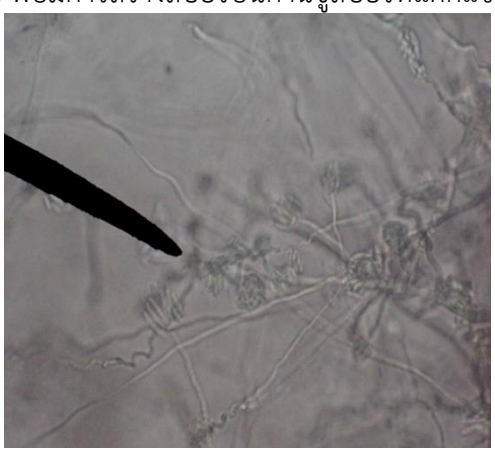


ไอโซเลท A1R2F7 เส้นใยราสีเขียวอมเหลือง สร้างสปอร์สีเขียวอมเหลือง-น้ำตาล เส้นใยรามีผนังกั้น มีการแตกแขนงของใยรา สร้างสปอร์ติดกับเส้นใยรา ไม่มีก้านชูสปอร์

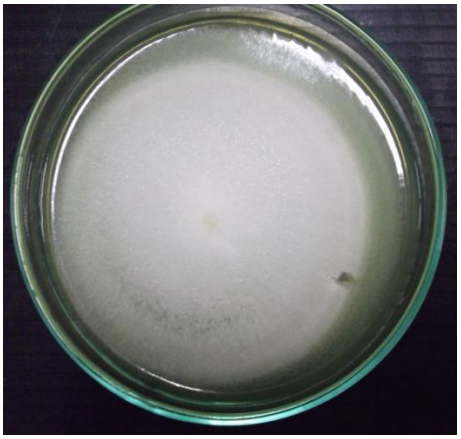
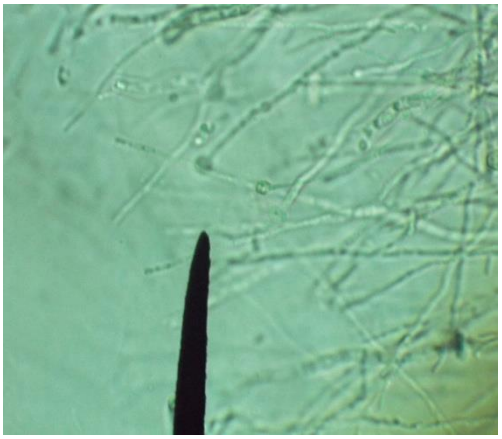
2.3 ราปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินรอบที่ 2 แปลงที่ 1



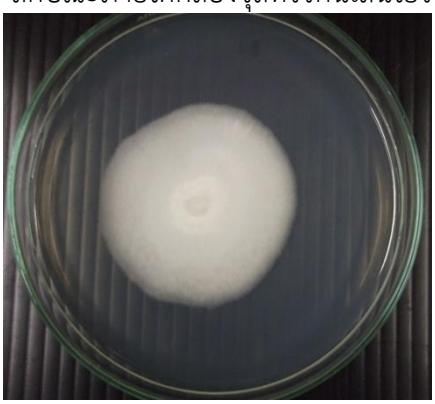
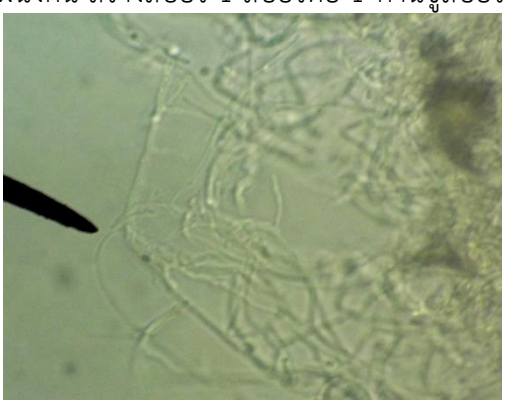
ไอโซเลท A2R1F3 ลักษณะโคโลนีเส้นใยราสีขาวครีม สร้างสปอร์สีเหลือง-น้ำตาลอ่อน ผิวหน้าย่น พบการสร้าง pigment สีน้ำตาลบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้านใต้โคโลนีมีลักษณะย่นๆ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยราไม่มีผนังกั้น พบมีการสร้างสปอร์บนก้านชูสปอร์ที่แตกแขนง



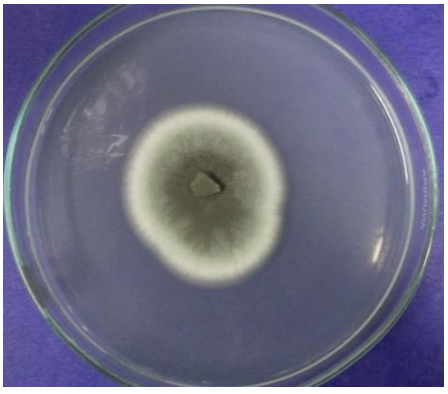
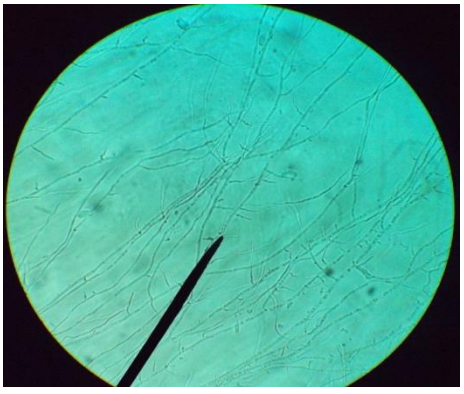
ไอโซเลท A2R1F8 เส้นใยราฟูสีชมพูอ่อน ไม่พบการสร้าง pigment บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยราไม่พบผนังกั้น พบสปอร์มีลักษณะเป็นรูปท่อนอยู่รวมเป็นกลุ่ม

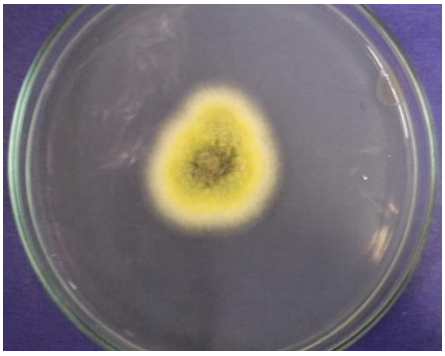
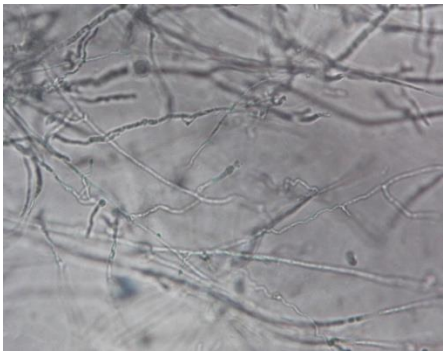
ไอโซเลท A2R1F11 เส้นใยราฟูสีขาว พบการสร้าง pigment สีเหลืองบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยราไม่มีผนังกั้น สร้างสปอร์ 1 สปอร์ต่อ 1 ก้านชูสปอร์

ไอโซเลท A2R1F18 ลักษณะโคโลนีสีขาวครีม เส้นใยรามีลักษณะฟูเล็กน้อย ไม่พบการสร้าง pigment บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศนีเส้นใยราไม่มีผนังกั้น พบการแตกกิ่งของเส้นใยรา

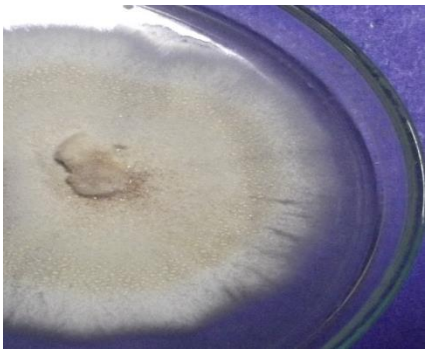
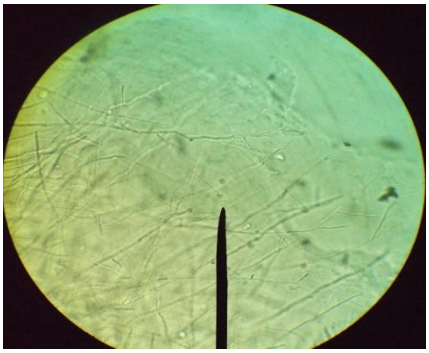



ไอโซเลท A2R1F20 เส้นใยราสีขาว สร้างสปอร์สีเขียวเข้ม เส้นใยรามีลักษณะฟูเล็กน้อย ไม่พบการสร้าง pigment บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยราไม่พบผนังกั้น พบการแตกกิ่งของใยราคล้ายรากของพืช

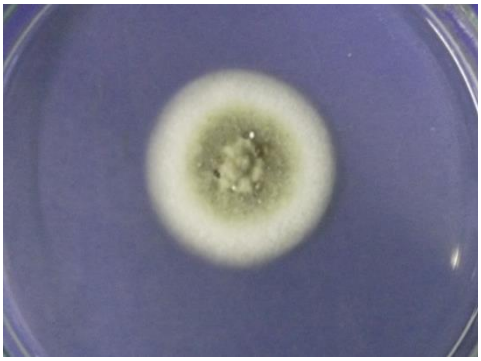
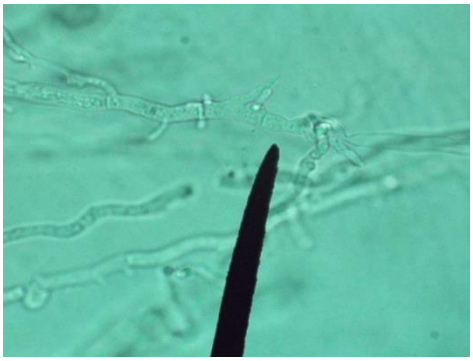



ไอโซเลท A2R1F23 เส้นใยราสีเหลืองฟูเล็กน้อย สร้างสปอร์สีเขียว ไม่พบการสร้าง pigment บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยรามีผนังกั้น เส้นใยรามีลักษณะทั้งที่เป็นเส้นตรงและเป็นเกลียว มีการสร้างสปอร์จากด้านข้างของเส้นสาย

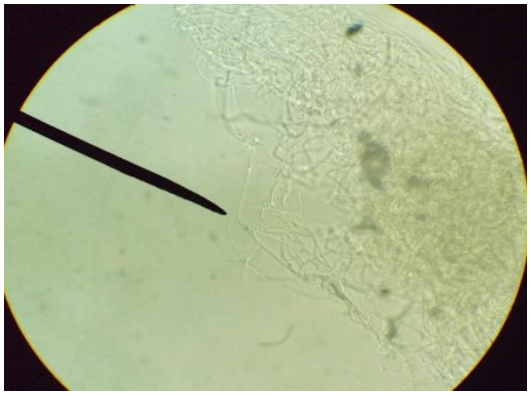
2.4 ราปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินรอบที่ 2 แปลงที่ 2

ไอโซเลท A2R2F3 เส้นใยราสีขาว สร้างสปอร์สีเขียวเข้ม-น้ำตาลเข้ม เส้นใยรามีลักษณะฟูเล็กน้อย ไม่พบการสร้าง pigment บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยรามีผนังกั้น พบมีการสร้าง 1 สปอร์บน 1 ก้านชูสปอร์

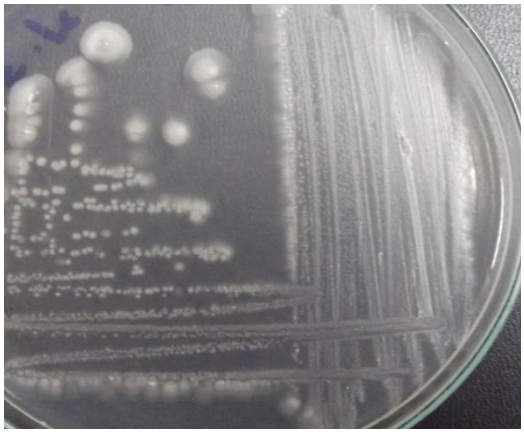
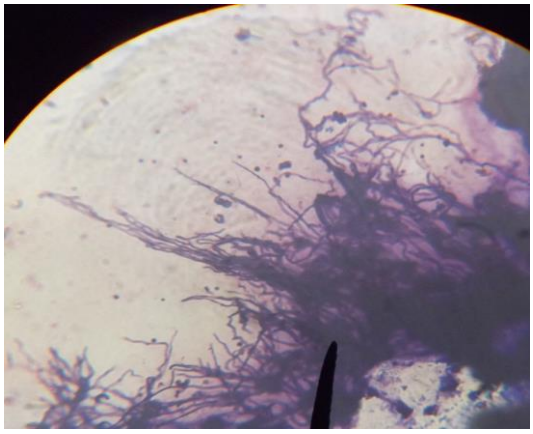
ไอโซเลท A2R2F6 เส้นใยราสีขาว สร้างสปอร์สีเขียวเข้ม เมื่อโคโลนีมีอายุมากขึ้นเส้นใยราจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน และพบการสร้าง pigment สีน้ำตาล-ส้ม บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เส้นใยรามีผนังกั้น พบการแตกกิ่งของใยรา



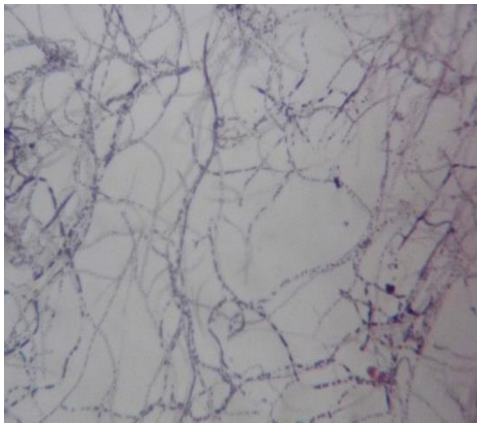
ไอโซเลท A2R2F7 เส้นใยราฟูสีขาว ไม่พบการสร้าง pigment บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อดูภายใต้โคโลนีจะมีลักษณะย่น ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเส้นใยราไม่มีผนังกั้น พบการแตกแขนงของเส้นใยรา

3. แอคติโนมัยสีทที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืช

3.1 แอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินรอบที่ 1 แปลงที่ 3

ไอโซเลท A1R3A4 สร้าง substrate mycelium สีขาว ไม่พบการสร้าง pigment บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเส้นใยราแต่มีขนาดเล็กกว่า เป็น truehyphae



ไอโซเลท A1R3A6 สร้าง substrate mycerium สีขาว สร้าง pigment สีน้ำตาลบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนเรียงต่อกันเป็นเส้นสายเป็น psuedohyphae

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose agar (PDA)

1. Potato 200 g
2. Dextrose sugar 20 g
3. Agar 15 g
4. น้ำกลั่น 1,000 ml
5. กระบอกตวงขนาด 1,000 ml
6. หม้อต้ม
7. มีดสำหรับปลอกเปลือกและหั่นมันฝรั่ง
8. เขียง

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ปลอกเปลือกมันฝรั่งออก แล้วหั่นมันฝรั่งให้เป็นชิ้นขนาด 1x1 mm.
2. นำมันฝรั่งที่เตรียมไว้ไปชั่งให้ได้ปริมาตร 200 g
3. นำไปต้มในหม้อที่มีน้ำกลั่น 500 ml ต้มจนมันฝรั่งนิ่มแต่ไม่เละ แล้วนำมากรองเอาน้ำต้มมันฝรั่ง
4. ละลายน้ำตาล Dextrose ในน้ำต้มมันฝรั่งที่กรองได้
5. เทใส่กระบอกตวงขนาด 1,000 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 ml แล้วนำไปต้ม
6. ใส่ agar ลงไปและต้มให้ละลายโดยคนตลอดเวลา
7. บรรจุใส่ภาชนะที่ต้องการ แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นด้วย autoclave

อาหารเลี้ยงเชื้อ Soil Extract agar

1. Peptone.....1.0 g
2. K_2HPO_4.....0.5 g
3. Yeast extract.....1.0 g
4. $(NH_4)_2HPO_4$.....0.5 g
5. $MgSO_4$.....0.05 g
6. $FeCl_3$.....0.01 g
7. $CaCl_2$.....0.1 g
8. Agar.....15.0 g
9. $CaCO_3$.....0.5 g
10. Soil extract.....250 ml
11. น้ำกลั่น.....750 ml

วิธีการเตรียม Soil extract agar

1. ช่างดิน 1,000 g นำมาใส่ในหม้อต้ม
2. ตวงน้ำกลั่นมา 1,000 ml ใส่ลงไปในหม้อต้มที่มีดินบรรจุอยู่
3. นำไปต้มหรือนึ่งเป็นเวลา 20 นาที และเติม $CaCO_3$ 0.5 g ลงไป
4. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกสิ่งแขวนลอยออก
5. นำน้ำต้มดินที่กรองได้มาวัดปริมาตรให้ได้ 250 ml แล้วนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 ml แล้วเทใส่หม้อต้มเพื่อนำไปต้มอีกครั้ง
6. เติมสารอาหารและสารเคมีที่เตรียมไว้ทั้งหมดลงไป ต้มจนละลาย
7. นำมาบรรจุใส่ภาชนะที่ต้องการ แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave