



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

Bioproduct Development of Antagonistic Bacteria for Controlling *Ralstonia solanacearum* Caused Bacterial Wilt of Tomato

นามผู้วิจัย นางสาวไก่อแก้ว สุธรรมมา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์นิพนธ์ ทวีชัย, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์จิระเดช แจ่มสว่าง, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กรรณิการ์ สัจจาพันธ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ณรงค์ สิงห์บุระอุดม, วท. ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*
สาเหตุโรครเหี่ยวของมะเขือเทศ

Bioproduct Development of Antagonistic Bacteria for Controlling *Ralstonia solanacearum*
Caused Bacterial Wilt of Tomato

โดย

นางสาวไก่แก้ว สุธรรมมา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2552

ไก่อแก้ว สุธรรมมา 2552: การพัฒนาชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม
เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ปริญญาวิทยา
ศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์พนธ์ ทวีชัย, Ph.D. 90 หน้า

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} (BS) มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} (RS) สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ จึงได้นำมาศึกษาพัฒนาชีวภัณฑ์เป็นสูตรผงสำเร็จ การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและคุณสมบัติการยับยั้งของเชื้อ BS ในอาหาร 10 ชนิด พบว่าอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล 1% + เปปโตน 0.5% ให้ปริมาณประชากรของเชื้อ BS สูงที่สุดคือ 13.39 logCFU/ml ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหาร Malt Yeast extract (MY) ที่มีประชากร BS 13.14 logCFU/ml ที่ใช้เป็นอาหารเปรียบเทียบ แต่ในขณะที่อาหารนี้สร้างบริเวณยับยั้งเชื้อ RS กว้าง 0.72 ซม. ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหาร MY ที่มีบริเวณยับยั้ง 0.78 ซม. อาหาร MY จึงถูกคัดเลือกมาใช้เลี้ยงกล้าเชื้อ BS สำหรับนำไปใช้พัฒนาชีวภัณฑ์ สูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ 6 ชนิด ได้พัฒนาขึ้นโดยการผสมเชื้อ BS ปริมาณ 8.25 logCFU/ml ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร MY กับสารอาหารหรือสารพษชนิดต่างๆ ในอัตราเชื้อต่อสารพา 1:2 โดยปริมาตร:น้ำหนัก หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสูตรชีวภัณฑ์ที่ 1 ประกอบด้วยผงเชื้อ BS+ทาลคัม+รำข้าว ให้ปริมาณเชื้อ BS สูงที่สุด 1.88 logCFU/ml และบริเวณยับยั้งเชื้อ RS กว้างที่สุด 0.9 ซม. บนอาหาร NGA การศึกษาวิธีควบคุมโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 ในโรงเรือนปลูกพืชแบบการค้าที่สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย จังหวัดปทุมธานี โดยการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้สูตรชีวภัณฑ์ที่ 1 และสารซิลิโคนแบบเดี่ยวหรือผสมกัน พบว่าการใช้สูตรชีวภัณฑ์ที่ 1 ผสมกับซิลิโคนในรูปโซเดียมซิลิเคต มะเขือเทศมีการรอดตายสูงสุด 88% และมีผลผลิตสูงที่สุด 240 กรัม/ต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีอื่นและเปรียบเทียบที่ใช้น้ำโดยมีต้นมะเขือเทศรอดตาย 11% และผลผลิต 10 กรัม/ต้น การศึกษานี้เป็นรายงานครั้งแรกถึงผลสำเร็จในการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ร่วมกับซิลิโคนในการควบคุมโรคเหี่ยวจากเชื้อแบคทีเรีย RS จนถึงระยะเก็บเกี่ยวผลผลิตในโรงเรือนปลูกพืชแบบการค้า

Kaikaew Suthumma 2009: Bioproduct Development of Antagonistic Bacteria for Controlling *Ralstonia solanacearum* Caused Bacterial Wilt of Tomato. Master of Science (Agriculture), Major Field : Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Niphone Thaveechai, Ph.D. 90 pages.

Antagonistic bacteria *Bacillus subtilis* strain CH4^{Am} (BS) having an effective growth inhibition of *Ralstonia solanacearum* strain To-Ud3^{Am} (RS), the causal agent of bacterial wilt of tomato (BWT) was carried out to develop bioproduct as powder formulation. Growth and inhibition activity of BS on the 10 media were compared and found that medium containing molasses1%+peptone0.5% gave the highest BS population of 13.39 logCFU/ml which was significantly different from Malt Yeast extract (MY) medium containing BS population of 13.14 logCFU/ml as a control medium whereas it had inhibition zone against RS at 0.72 cm which was significantly lesser than from MY having inhibition zone of 0.78 cm. MY medium was selected to produce BS inoculum for bioproduct development. Six bioproduct formulations were developed by mixing 8.25 logCFU/ml of BS inoculum obtained from MY medium with substrates and carries at 1:2 by volume : weight. After storage the products for 6 months at room temperature, F1 formulation contained BS+talcum+rice bran had the highest BS population of 1.88 logCFU/g and showed the highest inhibition zone of 0.9 cm against RS on NGA plate. Investigation on BWT control using tomato cv. Seeda Thip3 in commercial type greenhouse at Asian Institute of Technology, Pathumthani province by comparing the effectiveness of F1 formulation and silicon applications as solely or combination showed that F1+silicon as sodium silicate provided the highest tomato survival of 88% and yield at 240 g/plant which was significantly different from others and water control providing 11% tomato survival and 10 g/plant. This study is the first report on the successful application of bacterial antagonist as bioproduct formulation with silicon to control bacterial wilt of tomato caused by RS until harvesting period in the commercial type greenhouse.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นิพนธ์ ทวีชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จิระเดช แจ่มสว่างและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรรณิการ์ สัจจาพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. สุธฤดี ประเทืองวงศ์ ประธานในการสอบและดร. วันเพ็ญ ศรีทองชัย ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและข้อเสนอแนะ ช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสรวง สุธรรมมาและคุณแม่จันดี สุธรรมมา รวมทั้งพี่ๆ ทั้งสามคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันที่ได้ให้ความรู้ด้านต่างๆ ขอขอบคุณพี่เพื่อน น้อง เจ้าหน้าที่และบุคลากรภาควิชาโรคพืชทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในระหว่างการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดีตลอดมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยและสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติโครงการ ไทย-เยอรมัน (NRCT-DFG) ตลอดจนโครงการ Academic Frontier Research Project, Tokyo University of Agriculture ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการค้นคว้าวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์

ไก่อแก้ว สุธรรมมา

พฤษภาคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	31
อุปกรณ์และวิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	41
ผล	41
วิจารณ์	59
สรุปและข้อเสนอแนะ	68
สรุป	68
ข้อเสนอแนะ	70
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	71
ภาคผนวก	85
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	90

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	ความสามารถนำกลับคืนมา (recovery) ของเชื้อแบคทีเรีย <i>Ralstonia solanacearum</i> สายพันธุ์ To-Ud3 ^{Am} และ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} ที่ 2 ชั่วโมงหลังจากใส่เชื้อ	45
2	จำนวนประชากรและประสิทธิภาพสารกรอง (culture filtrate) ของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} ที่เลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆเป็นเวลา 72 ชั่วโมงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Ralstonia solanacearum</i> สายพันธุ์ To-Ud3 ^{Am} (RS) บนอาหาร Nutrient glucose agar ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	48
3	ประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} ในสูตรสำเร็จชนิดต่างๆและการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Ralstonia solanacearum</i> สายพันธุ์ To-Ud3 ^{Am} (RS) โดยใช้ผงเชื้อสูตรสำเร็จของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} (BS) ชนิดต่างๆบนอาหาร Nutrient glucose agar ที่อุณหภูมิห้อง	51
4	ประสิทธิภาพของผงเชื้อสูตรสำเร็จ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} (BS) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>Ralstonia solanacearum</i> สายพันธุ์ To-Ud3 ^{Am} (RS) ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 9 วัน	55
5	ปริมาณผลผลิตและเปอร์เซ็นต์การรอดตายของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และจำนวนประชากรของเชื้อ <i>Ralstonia solanacearum</i> สายพันธุ์ To-Ud3 ^{Am} (RS) และ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} (BS) ในดินบริเวณรากของมะเขือเทศหลังจากปลูกเชื้อได้ 8 สัปดาห์ที่สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย จังหวัดปทุมธานี	58

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	ผลิตภัณฑ์ซิลิกอนที่ใช้ในการทดลอง ก) ซาลิซิก แอซิด (salicylic acid) ผลิตโดยชมรมเกษตรปลอดสารพิษและ ข) โซเดียม ซิลิเกต (sodium silicate) ผลิตโดยบริษัท Fisher Scientific 40
2	แสดงบริเวณยับยั้ง (clear zone) โดยเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} ในการยับยั้งเชื้อ <i>Ralstonia solanacearum</i> สายพันธุ์ To-Ud3 ^{Am} บนอาหาร Nutrient glucose agar โดยมีน้ำเป็นชุดควบคุม (Control, C) เป็นเวลา 48 ชม. (ก) และลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} ที่ติดฉลากด้วยสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 100 ppm บนอาหาร Nutrient glucose agar อายุ 48 ชั่วโมง (ข) 43
3	สูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะของ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} (BS) โดย 1 = BS+ ทาลคัม+ ราข้าว, 2 = BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง, 3 = BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง+ ราข้าว, 4 = BS+สาकुดิบ, 5 = BS+สาकुดิบ+ ราข้าว และ 6 = BS+ปลายข้าว 52
4	ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} หลังจากเก็บรักษา 6 เดือน ในการยับยั้งเชื้อ <i>Ralstonia solanacearum</i> สายพันธุ์ To-Ud3 ^{Am} โดยวิธี paper disc method บนอาหาร Nutrient glucose agar โดย A = สูตรที่ 1 BS+ ทาลคัม+ ราข้าว, B= สูตรที่ 2 BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง, C= สูตรที่ 3 BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง+ ราข้าว, D= สูตรที่ 4 BS+สาकुดิบ, E= สูตรที่ 5 BS+สาकुดิบ+ ราข้าว, F= สูตรที่ 6 BS+ปลายข้าว และ W= น้ำ เป็นชุดควบคุม (Control) 53
5	ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทาลคัม+ราข้าว (ช่อทิพย์, 2538) ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศสีดาทิพย์ 3 หลังการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ในโรงเรือนที่สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย จังหวัดปทุมธานี โดยกรรมวิธีควบคุม (ก) ต้นมะเขือเทศแสดงอาการเหี่ยวและต้นมะเขือเทศปกติที่ใช้ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทาลคัม+ ราข้าว (ข) 59

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

กก.	=	กิโลกรัม
ชม	=	ชั่วโมง
เปปโตน	=	Peptone
มม.	=	มิลลิเมตร
cm	=	เซนติเมตร (ชม)
g	=	กรัม
ml	=	มิลลิลิตร (มล.)
ppm	=	อัตราส่วน 1: 1,000,000
μm	=	ไมโครเมตร
CFU/ml	=	Colony Forming Unit/ml
MY	=	Malt Yeast extract
NGA	=	Nutrient Glucose Agar
O.D.	=	Optical at Density ที่ 600 นาโนเมตร

การพัฒนาชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรครเหี่ยวของมะเขือเทศ

Bioproduct Development of Antagonistic Bacteria for Controlling *Ralstonia solanacearum* Caused Bacterial Wilt of Tomato

คำนำ

ปัจจุบันเกษตรกรในประเทศไทยมีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นจำนวนมาก รวมถึงการกำจัดโรคพืชด้วย เนื่องจากใช้งานง่ายและออกฤทธิ์เร็ว แต่ปัญหาที่ตามมาคือเรื่องสุขภาพของผู้บริโภค ผู้ผลิต และการตกค้างของสารเคมีในสภาพแวดล้อม ในปัจจุบันกระแสของการรณรงค์ให้ลดการใช้สารเคมีมีมากขึ้น เนื่องจากผู้บริโภคและภาครัฐได้ตระหนักถึงพิษภัยของสารเคมีที่ตกค้างในผลผลิต และสิ่งแวดล้อม ในขณะที่เดียวกันการส่งออกผลผลิตทางเกษตรหลายชนิดไปยังประเทศต่าง ๆ มีการกำหนดปริมาณสารตกค้างในผลผลิต โดยเฉพาะในประเทศที่เจริญและพัฒนาแล้วจะให้ความสำคัญต่อเรื่องสุขภาพและสิ่งแวดล้อมมาก ดังนั้นผลผลิตที่จะส่งไปขายประเทศเหล่านั้นได้ ต้องเป็นผลผลิตที่มีคุณภาพปราศจากสารเคมีตกค้าง ด้วยเหตุนี้การควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพหรือชีววิธี (biological control หรือ biocontrol) จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่นักโรคพืชให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาใช้ทดแทนสารเคมี เนื่องจากสามารถลดปริมาณประชากรของเชื้อโรคให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดผลเสียหายกับพืชและไม่เป็นอันตรายต่อผู้ผลิต ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีการคิดค้นวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพควบคุมโรคพืชได้ด้วยเทคโนโลยีทันสมัยมีการจดสิทธิบัตรจุลินทรีย์และขั้นตอนการผลิต นอกจากนี้ยังมีการจำหน่ายเชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัฏษ์ในลักษณะชีวภัณฑ์สำเร็จรูป (bioproduct) หลายชนิดในต่างประเทศและในประเทศไทย

โรคของมะเขือเทศนับเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการปลูกมะเขือเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย มะเขือเทศมีเชื้อโรคพืชที่เข้าทำลายมากถึง 60 ชนิด และมีประมาณ 15 ชนิด ที่ถือว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคมะเขือเทศที่มีความสำคัญในเขตอบอุ่นและเขตร้อนชื้น (Dhital, 1998) เชื้อสาเหตุโรคมะเขือเทศประกอบไปด้วย เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และไส้เดือนฝอย โรคเหี่ยวมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นโรคที่มีความสำคัญและระบาดอย่างรุนแรงทำความเสียหายอย่างมากในเขตอบอุ่นและเขตร้อน (Jones *et al.*, 1993) ในประเทศไทยโรคเหี่ยวของ

มะเขือเทศที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* นั้นพบโรคกระจายอยู่ทั่วไปในพื้นที่ที่ปลูกมะเขือเทศและพืชชนิดต่างๆ มีความหลากหลายของพันธุ์กรรม (ปิยะรัตน์, 2540) เป็นโรคที่มีความสำคัญมากที่สุดเพราะเป็นโรคที่ทำความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมมะเขือเทศทำให้ผลผลิตลดลง ในปัจจุบันถือว่าปัญหาโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกมะเขือเทศเพื่ออุตสาหกรรม และการผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ (Leksomboon, 1994) และการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในพื้นที่ปลูกมะเขือเทศมีปัญหาค่อนข้างมากเนื่องจากในดินที่ปลูกมะเขือเทศมีปริมาณเชื้อสาเหตุโรคปนอยู่เป็นจำนวนมาก ทั้งยังเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีพืชอาศัยกว้าง และเชื้อสาเหตุโรคสามารถดำรงชีวิตรอดอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน ตลอดจนเชื้อสาเหตุโรคมีความผันแปรของลักษณะทางชีววิทยาและพันธุกรรม ดังนั้นในการควบคุมโรคด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่จะไปมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อจำนวนประชากรของเชื้อสาเหตุโรคพืชให้มีปริมาณลดลง และเกิดโรคน้อยลงจึงเป็นทางเลือกวิธีหนึ่ง

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่โดยปกติอาศัยอยู่ในดินไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชมีความเหมาะสมในการใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สามารถควบคุมเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิดโดยมีการทดลองในห้องปฏิบัติการ *Bacillus* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะหลายชนิดและแย่งสารอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ ในสภาวะแวดล้อมที่ขาดแคลน สามารถปรับตัวและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่แปรเปลี่ยนโดยการสร้างสปอร์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 ชนิดต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะที่มีต้นทุนการผลิตต่ำสำหรับการผลิตชีวภัณฑ์ในรูปสูตรสำเร็จชนิดผง โดยการคัดเลือกสารพาที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สูตรสำเร็จที่สะดวกต่อการนำไปใช้ สามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้เป็นระยะเวลานานโดยยังคงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ ตลอดจนการนำไปใช้ควบคุมโรคร่วมกับวิธีการอื่นให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์และประสิทธิภาพการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

2. ศึกษาการอยู่รอดและประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในวัสดุผสมสูตรต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

3. ศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จชีวภัณฑ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ร่วมกับการใช้สารซิลิโคนในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในสภาพโรงเรือนแบบการค้า

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะโดยทั่วไปของโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ (bacterial wilt) ที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* เป็นโรคที่ทำความเสียหายอย่างรุนแรงต่อมะเขือเทศที่ปลูกในเขตอบอุ่น เขตกึ่งร้อน และเขตร้อน โรคนี้บางครั้งเรียกว่า โรคเหี่ยวแบคทีเรียทางตอนใต้ (southern bacterial wilt) โรคเหี่ยวของพืชพวกพริก (solanaceous wilt) โรค southern bacterial blight และมีชื่อเรียกอื่นๆที่แตกต่างกันไปตามประเทศที่เกิดโรค (Jones *et al.*, 1993) ส่วนในประเทศไทยนั้นเป็นที่รู้จักกันดี คือโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียโรคเหี่ยวเหี่ยวของมะเขือเทศ (ศุกลักษณ์, 2536) โรคนี้ถือว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดอีกโรคหนึ่ง มีการเกิดโรคกระจายทั่วไปในพื้นที่ที่มีการปลูกมะเขือเทศ ทำให้ต้นมะเขือเทศตายเป็นจำนวนมาก (Buddenhagen and Kelman, 1962) โรคเหี่ยวของมะเขือเทศพบได้ง่ายในพื้นที่ที่มีการปลูกมะเขือเทศเป็นเวลาหลายปีติดต่อกัน โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่มีการปลูกมะเขือเทศเป็นจำนวนมาก และปลูกมาเป็นเวลานาน นับเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการจำกัดพื้นที่การปลูกมะเขือเทศในจังหวัดต่าง ๆ ในภาคนี้เป็นอย่างมาก (ศุกลักษณ์, 2536) ในต้นมะเขือเทศที่เป็นโรค การเหี่ยวจะแสดงอาการเกิดขึ้นที่ใบอ่อนก่อน ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคอาการจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจนเหี่ยวทั้งต้นในระยะเวลา 2-3 วันหลังจากแสดงอาการโรค เมื่อพืชแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้นแล้ว บริเวณท่อน้ำท่ออาหารจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ถ้าตัดส่วนของลำต้นแช่น้ำจะมีน้ำสีขาวขุ่น หรือสีขาวอมเหลือง มีลักษณะเหนียวเป็นยางข้นเหมือนน้ำมัน (ooze) ไหลออกมาจากส่วนของท่อน้ำท่ออาหาร (Jones *et al.*, 1993)

มีรายงานเชื้อ *R. solanacearum* มีพืชอาศัยมากมาย กระจายในพืชอาศัยมากกว่า 50 วงศ์ ส่วนใหญ่เป็นพืชที่มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจ ได้แก่ มันฝรั่ง มะเขือเทศ ยาสูบ พริกไทย มะเขือ ถั่วลิสง และกล้วย (Hayward, 1995) นอกจากนี้ยังพบในไม้ประดับบางชนิด และวัชพืชอีกหลายชนิดตามที่มีรายงานในหลายๆประเทศ ในประเทศญี่ปุ่นโรคเหี่ยวแบคทีเรียที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ซึ่งพบในพืชวงศ์พริกและมะเขือ ส่วนใหญ่จะพบว่าเป็นโรคกับต้นมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) ยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) มะเขือยาว (*S. melongena* L.) และพริกหยวก (*Capsicum annuum* L.) ในประเทศญี่ปุ่นเชื้อสาเหตุ

โรคมียี่งออศัยมากกว่า 34 จากพืช 18 วงศ์ (Horita and Tsuchiya, 2001) เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* จะเข้าทำลายส่วนของพืชที่อยู่ในดินได้ดีในขณะที่มีอุณหภูมิต่ำประมาณ 13 องศาเซลเซียส แต่อัตราการพัฒนารองโรคจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อดินมีอุณหภูมิสูงขึ้นจาก 26.7 องศาเซลเซียส เป็น 37.8 องศาเซลเซียส และในดินที่มีความชื้นสูงขึ้นอาการของโรคจะเกิดได้เร็วขึ้นด้วยเช่นกัน (Gallegly and Walker, 1949) Yang (1979) ได้รายงานว่าโรคจะพัฒนาอย่างช้าๆ ในสภาพที่มีอากาศอบอุ่น ซึ่งจะอยู่ในช่วงระหว่าง 30- 35 องศาเซลเซียส แต่ในสภาพที่ดินมีความชื้นสูงถือเป็นสภาพที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อ และการพัฒนาอาการของโรคจะเร็วขึ้น เชื้อ *R. solanacearum* นี้จะมีความรุนแรงน้อยในดินที่มีการระบายน้ำดี การแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* จะขึ้นอยู่กับกรการกระจายตัวของพืชอาศัย ที่มีการกระจายตัวตามลักษณะทางภูมิศาสตร์ ความสามารถในการเกิดโรค สภาพแวดล้อมในการการระบาด ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องและขึ้นอยู่กับสภาพทางสรีรวิทยาของเชื้อ *R. solanacearum*

Horita and Tsuchiya (2001) รายงานว่าเชื้อ *R. solanacearum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวนั้นมีความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมมาก จากการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคและการศึกษาลำดับเบสจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (fingerprint method) ด้วยวิธี repetitive sequence based polymerase chain reaction (rep-PCR) ลำดับเบสที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA) พบไบโอวาร์ (biovar) 2 แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มที่ชัดเจน โดยกลุ่มที่ 1 จะเป็นกลุ่มที่แยกเชื้อได้จากมันฝรั่ง จัดเป็น race 3 และกลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่แยกได้จากมะเขือเทศ พริก และยาสูบจัด เป็น race 1 ในไบโอวาร์ 3 จะพบว่าเชื้อในแต่ละสายพันธุ์มีค่าเฉลี่ยของค่าความเหมือนกันต่ำ และสามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม จากความแตกต่างกันของพืชอาศัย และความสามารถในการเกิดโรคในไบโอวาร์ 4 จะพบเพียงกลุ่มเดียวมีค่าความเหมือนกันมากกว่า 80%

R. solanacearum เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนกลม เซลล์หัวท้ายมน มีขนาด $0.5-0.7 \times 1.5-2.0$ ไมครอน เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา (flagella) ที่ติดอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ซึ่งมีจำนวน 1-4 เส้น เป็นแบบ polar flagella โดยทั่วไปในเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ที่ใช้หางในการเคลื่อนที่จะไม่ทำให้เกิดโรค (avirulent strain) ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่มีแฟลกเจลลาจะเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ (virulent strain) (Kelman, 1953) *R. solanacearum* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีแคปซูลห่อหุ้ม บางสายพันธุ์สร้างเม็ดสีสีน้ำตาลที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือในพืช และสร้างเม็ดสีดำบน potato slant ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยไขมัน สร้างยูเรียส ใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนได้ สามารถสร้างเอนไซม์อะคาเลส การสร้างเอนไซม์ออก

ซิคอส สามารถเปลี่ยนในเตรทให้เป็นไนโตรทได้ ไม่มีปฏิกิริยากับการทดสอบ levan ไม่สามารถย่อยแป้ง ไม่สามารถสร้างอินโดล (indole) ไม่เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไม่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 2 % ขึ้นไป มีคุณสมบัติเด่นในการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน คือ จะเกิดกรดเล็กน้อยในอาหาร glucose D(-)fructose sucrose และ trehalose แต่จะเกิดกรดมากในอาหาร D-mannitol, dulcitol, D-soritol, D(-)galactose และ glycerol ไม่เกิดกรดและยังทำให้อาหารเป็นด่างใน lactose L(-)arabinose xylose, D(+)mannose, adonitol, raffinose, cellobiose, L-rhamnose, salicin, insulin และ maltose (สุริยญา, 2527; Denny and Hayward, 2001)

การจัดจำแนกเชื้อ *R. solanacearum* Hayward (1964) ได้มีการจัดจำแนกชนิดของเชื้อตามความสามารถในการใช้น้ำตาลของเชื้อ 6 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลมอลโทส (maltose) แลคโทส (lactose) เซลโลไบโอส (cellobiose) แมนนิทอล (mannitol) ซอร์บิทอล (sorbitol) และดูลซิทอล (dulcitol) สามารถแบ่งออกได้ 5 ไบโอวาร คือ

ไบโอวาร 1 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ใช้น้ำตาลทั้ง 6 ชนิด เป็นสายพันธุ์ที่แยกเชื้อจากพืชหลายวงศ์ โดยเฉพาะพืชในวงศ์ Solanaceae เป็นพืชที่อ่อนแอต่อเชื้อมาก

ไบโอวาร 2 เป็นสายพันธุ์ที่ใช้น้ำตาล มอลโทส แลคโทส และเซลโลไบโอสเป็นสายพันธุ์แยกเชื้อจากพืชพวกกล้วย และไม้ประดับพวกเฮลิโกลเนีย

ไบโอวาร 3 เป็นสายพันธุ์ที่ใช้น้ำตาลทั้ง 6 ชนิด เป็นสายพันธุ์ที่แยกเชื้อจากพืชหลายวงศ์ โดยเฉพาะพืชในวงศ์ Solanaceae เป็นพืชที่อ่อนแอต่อเชื้อมาก

ไบโอวาร 4 เป็นสายพันธุ์ที่ใช้น้ำตาล แมนนิทอล ซอร์บิทอล และดูลซิทอลเป็นสายพันธุ์จากเชื้อพืชวงศ์ขิง ข่า

ไบโอวาร 5 เป็นสายพันธุ์ที่ใช้น้ำตาล มอลโทส แลคโทส และเซลโลไบโอส และ แมนนิทอล เป็นสายพันธุ์เชื้อจากหม่อนจากประเทศจีน

Horita and Tsuchiya (2001) รายงานว่า เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จัดเป็นกลุ่มที่มีความซับซ้อน แต่เมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายนั้นสามารถแบ่งแยกออกเป็นกลุ่มสายพันธุ์ (strain) พาโทวาร (pathovars), ไบโอวาร (biovar) และ race การจำแนกเชื้อเป็นไบโอวาร และ race นั้นนิยมใช้กันโดยทั่วไป และการจัดโดยอาศัยความสามารถในการเข้าทำลายพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 race ได้แก่

race 1 ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับพืชในวงศ์ Solanaceae และพืชวงศ์อื่นๆ

race 2 ก่อให้เกิดเหี่ยวกับพืชในวงศ์ Musaceae

race 3 ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวกับมะเขือเทศ มันฝรั่ง แต่ไม่เกิดโรครุนแรงกับพืชในวงศ์ Solanaceae

race 4 ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวกับพืชในวงศ์ Zingiberaceae

race 5 ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวกับหม่อน (mulberry)

สำหรับในประเทศไทยเชื้อ *R. solanacearum* ที่พบจัดจำแนกอยู่ใน race 1 ไปโอวาร์ 3 และไปโอวาร์ 4 โดยพบไปโอวาร์ 3 ในอัตราส่วนที่มากกว่าไปโอวาร์ 4 (ศุทธนา, 2543) จากการรายงานของ ญัฎฐิมา (2541) พบว่า เชื้อไปโอวาร์ 4 มีการระบาดค่อนข้างน้อย มีการเข้าทำลายพืชในวงศ์ Zingiberaceae เช่น จิงและปทุมมา และพืชในวงศ์ Solanaceae มีระบาดทั้งภายในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียอื่นๆด้วย Boonsuebsakul (1994) รายงานพบ race 3 ไปโอวาร์ 2 ในมันฝรั่งที่ปลูกในที่สูง

R. solanacearum เป็นเชื้อสาเหตุที่เจริญได้ดีในดิน สามารถมีชีวิตอยู่รอดในดินได้เป็นเวลานาน โดยอาศัยอยู่กับเศษซากพืชที่เป็นพืชอาศัย หรืออยู่บริเวณรากพืช จำนวนประชากรของเชื้อในดินจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณการเพิ่มจำนวนประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* ในพืชอาศัย การลดจำนวนประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* ในดินให้น้อยลงจะเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่จะเกิดความต้านทานต่อการเกิดโรคในสภาพธรรมชาติ (Horita and Tsuchiya, 1998) เชื้อ *R. solanacearum* สามารถอยู่ในซากพืชที่อยู่ในดินได้นานถึง 7 เดือน (Devi et al., 1981) นอกจากนี้เชื้อ *R. solanacearum* สามารถแพร่กระจายอยู่ตามพื้นดินต่าง ๆ ในระดับความลึก 30 เซนติเมตร และในระดับความลึก 60-75 เซนติเมตรจะมีปริมาณลดน้อยลง แต่จะไม่พบเชื้อในระดับความลึก 15 เซนติเมตร เนื่องจากเป็นระดับที่มีความชื้นในดินต่ำ การแพร่กระจายของเชื้อในดินภายใต้สภาพธรรมชาติ มีการกระจายตัวที่ไม่แน่นอนและไม่สามารถที่จะคาดคะเนได้ เชื้อสามารถอยู่รอดในดินบางชนิดได้เป็นเวลานาน แต่ในดินบางชนิดกลับมีปริมาณประชากรลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งยังเป็นดินที่มีการปลูกพืชอาศัยที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลาย (Kelman, 1953) และจากรายงานของ McCarter (1976) รายงานว่าเชื้อ *R. solanacearum* สามารถอยู่ในดินเป็นระยะเวลานานถึง 4 ปี และเชื้อสามารถอยู่ข้ามฤดูในดินได้โดยปราศจากพืชอาศัย โดยอยู่ในสภาพ saprophyte เมื่อมีพืชอาศัยจะปรับตัวเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชเข้าทำลายพืชทำให้พืชเป็นโรคได้ Kelman (1953) ได้เสนอว่าความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* ความชื้นในดินจะทำให้เชื้อที่อาศัยอยู่ในดินมีชีวิตอยู่รอดได้มากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้มีความสามารถ

เข้าทำลายพืช และการพัฒนาอาการของโรคได้ดีขึ้น ทั้งมีความสามารถที่จะแพร่กระจายจากพืชอาศัยลงสู่ดิน แต่การทำให้ดินแห้งเป็นระยะๆจะสามารถทำให้การเกิดโรคลดลงได้ และทำให้เชื้อที่อยู่ในดินมีชีวิตรอดน้อยลง จะส่งผลทำให้การเพิ่มจำนวนประชากรของเชื้อในดินลดลง จากรายงานของ Quinon (1963) พบว่าเมื่อดินมีอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงจาก 30 องศาเซลเซียส เป็น 35 องศาเซลเซียส ในขณะที่ทำการปลูกเชื้อ เชื้อจะสามารถเข้าทำลาย และทำให้พืชเกิดโรคอย่างรวดเร็วและในสภาพที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 19 องศาเซลเซียส พืชจะไม่แสดงอาการเป็นโรค นอกจากนี้ความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศที่สูงอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อ *R. solanacearum* ในท่อลำเลียงของพืชมากขึ้น และพืชจะมีอัตราการเกิดโรคเพิ่มขึ้น (Grive, 1943) Walker (1952) รายงานว่าจากการทดลองในอินโดนีเซียพบว่าเมื่อดินมีซุเปอร์ฟอสเฟตสูงและมีไนโตรเจนต่ำ เชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนประชากรมากขึ้น ทำให้โรคมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น การเพิ่มไนโตรเจนให้กับดิน อาการโรคจะลดลงและถ้าดินขาดโพแทสเซียมอาการของโรคจะรุนแรงมากขึ้น นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของเชื้อในดินที่มีค่าความเป็น pH 6.8 ประชากรของเชื้อเพิ่มมากขึ้น และโรคมีอาการรุนแรงมากขึ้น แต่ความรุนแรงของโรคจะลดลงเมื่อดินมีสภาพเป็นกรดเพิ่มขึ้น หรือมีค่าความเป็น pH เท่ากับ 4.3

2. การควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพ

Lucas (1998) รายงานว่าในสภาพปัจจุบันที่ประชาชนเพิ่มความตระหนักในเรื่องของสิ่งแวดล้อมมากขึ้น การนำสารเคมีมาใช้ในการควบคุมศัตรูพืช เชื้อสาเหตุโรคพืชและวัชพืชนั้นส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก ดังนั้นการควบคุมโรคพืชโดยวิธีการทางชีวภาพจึงเป็นวิธีการกว้างๆ ที่เกิดจากการนำเอาสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ มาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช จากคำนิยามนี้จะรวมถึงความต้านทานของพืชอาศัยตามธรรมชาติ การควบคุมโรคโดยวิธีทางชีวภาพจึงมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมในการลดประชากรของเชื้อสาเหตุโรคพืชให้น้อยลง รวมทั้งการใช้เชื้อปฏิปักษ์หรือการจัดการต่างๆ เพื่อให้ประชากรของเชื้อสาเหตุโรคพืชลดลง ดังนั้นการควบคุมโรคโดยวิธีชีวภาพมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้จุลินทรีย์ในธรรมชาติที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมมาใช้ในการควบคุมโรคพืช (Elad and Chet, 1995) Cook and Baker (1983) รายงานการควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ โดยจัดแบ่งได้ 3 ลักษณะ คือ การควบคุมปริมาณประชากรของเชื้อสาเหตุโรคพืช การป้องกันพื้นที่ผิวของพืชโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะใช้ส่วนของพืชเป็นส่วนร่วมในการป้องกันควบคุมโรคพืช และการควบคุมส่วนของเนื้อเยื่อพืชบริเวณที่แสดงการเกิดโรคของพืช ซึ่งวิธีการควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพจะใช้วิธีการควบคุมมากกว่าหนึ่งลักษณะ

ปริญญ (2532) ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 และ CH6 ที่แยกจากดิน พบว่าสายพันธุ์ CH6 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเกิดโรคเน่าและของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (ECC) ได้ 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ในกรรมวิธีการจุ่มขึ้นตามันฝรั่งและการราดสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงในดินตามลำดับ ในกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 และ CH6 ต่อการเติบโตของเชื้อ Soft Rot Erwinias (SRE) ทำให้เกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาของอุไรจันทา (2534) ได้ศึกษาการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4, *Serratia marcescens* สายพันธุ์ NA25 และ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ NA1, NA37 PH9 และ SU1 สามารถควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* โดยการใช้การราดลงดิน และการจุ่มรากในสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนย้ายลงปลูกในดินที่ผสมเชื้อ *R. solanacearum* ถ้าใช้ร่วมกับพันธุ์ที่มีความต้านทานสูงจะมีผลทำให้ระดับประชากรของเชื้อในดินลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน และพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ NA1 และสายพันธุ์ NA25 ให้ผลดีที่สุดในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ และมีความสามารถเจริญบริเวณรากของมะเขือเทศได้ดี การควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศโดยใช้แบคทีเรียแอนทาโกนิสต์ *P. fluorescens* สายพันธุ์ NA1 จะให้ผลดีกว่าการใช้สารเคมี Dexan ในมะเขือเทศพันธุ์ L390 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีอ่อนแอ แต่ในพันธุ์ที่มีความต้านทาน (L 285) จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากการทดสอบเชื้อ *P. fluorescens* สายพันธุ์ NA1 กับเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ SR21 ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี paper disc diffusion จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแตกต่างกันตามความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ประชากรของเชื้อสายพันธุ์ NA1 ในดินผสมทางการค้า (นนทรี 6) และดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจะมีปริมาณประชากรสูงกว่าดินที่ผสมเกลบและไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากที่ได้เชื้อลงสู่ดินเป็นเวลา 60 วัน (สุภกิจ, 2536) และจากการศึกษาของ ช่อทิพย์ (2538) ได้ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ 40 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH6 และเชื้อ fluorescent pseudomonads สายพันธุ์ F2 นำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อ ECC 11 สายพันธุ์ เชื้อ *E. chrysanthemi* 5 สายพันธุ์ และเชื้อ *E. c.* subsp. *atroseptica* สายพันธุ์ P6 โดยวิธี paper disc diffusion พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ NK-T03 และ CH6 และเชื้อ *P. fluorescens* สายพันธุ์ F2 มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อโรคได้ดีที่สุด

ประจวบ (2548) ได้ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ NA1, SU1, CH4 และ CH6 ในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ได้ดีที่สุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสสูงสุดคือ 9.72 มิลลิเมตร และในการทดสอบการส่ง

เสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่เจริญจากเมล็ดที่คลุกด้วยเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH6 มีน้ำหนักรากแห้งสูงสุด 5.35 กรัม จากนั้นก็ได้มีการนำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 มาศึกษาถึงกลไกการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* พบมีการสร้างโปรตีนสูงถึง 1.866 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ เมื่อวิเคราะห์แยกสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี TLC bioassay บนแผ่น silica gel 60 โดยใช้สารละลายคลอโรฟอร์ม: เมทานอล (9:1) โดยปริมาตรเป็นตัวพาและทดสอบการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* พบบริเวณสีในการยับยั้ง R_f เท่ากับ 0.03 และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบกรดอะมิโน 15 ชนิดเมื่อนำมาย่อยด้วย proteinase K พบเสียคุณสมบัติในการยับยั้งจึงคาดว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 สร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* อยู่ในกลุ่ม lipopeptide สอดคล้องกับปริญญา (2532) ที่รายงานว่าสารเมตาโบไลต์มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโรคพืช

3. กลไกของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพ

Baker and Cook (1983) เสนอความคิดที่เกี่ยวกับกลไกการควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพนั้นมีกลไกที่ชัดเจนหลายกลไก คือ การแข่งขันในเรื่องของสารอาหารระหว่างเชื้อสาเหตุโรคกับเชื้อปฏิชีวนะและการสร้างสารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ปฏิชีวนะในการป้องกันหรือยับยั้งเชื้อสาเหตุของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียบางชนิด Weller (1988) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีศักยภาพสูงในการใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพมีหลายสกุล ได้แก่ *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Amorphosphorangium*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Pasturia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces*, และ *Xanthomonas*

Paul and Clark (1996) รายงานว่ากลไกที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยทางชีวภาพนั้นมีรูปแบบที่หลากหลายไม่สามารถกำหนดขอบเขตที่ชัดเจนได้ และที่พบโดยทั่วไปจะมีทั้งที่เป็นผลโดยตรงในการยับยั้งโดยทั่วไป และเป็นวิธีการเฉพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุโรคพืช กลไกทั้งสามที่มักพบโดยทั่วไป คือ กลไกแรกนั้นจะเป็นการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายโดยการสร้างสารปฏิชีวนะ เอนไซม์หรือสาร biocide ออกมาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช กลไกที่สองจะไปยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยไปจำกัดปัจจัยที่ใช้ในการดำรงชีวิตให้สามารถใช้ได้น้อยลงหรือไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ และกลไกสุดท้ายคือการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยตรงในรูปแบบปรสิตหรือภาวะผู้ล่าต่อศัตรูพืช หรือปรสิตของพืชนั้น ๆ โดยตรง Lam and Gaffney (1993) ได้สรุป

เกี่ยวกับกลไกของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ประสบผลสำเร็จในการควบคุมโรคพืชนั้นจะใช้ความสามารถในการเข้าครอบครองส่วนของพืชอาศัยที่เหมาะสมและมีการสร้างสารที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น สารปฏิชีวนะ, สารไซเดอโรฟอรัส (siderophores), แอมโมเนีย ไซยาไนต์ และเอนไซม์ hydrolytic แบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นจุลินทรีย์ที่แสดงความสามารถดังที่กล่าวมาแล้วได้ดีในสภาพแวดล้อมของแปลงปลูกได้ดี คือ *Pseudomonas* และ *Bacillus* (Van Driesche and Bellow, 1996) De'fago and Haas (1990) ได้รายงานว่แบคทีเรียพวก Pseudomonads จะสร้างสารเมตาโบไลต์ ออกมานอกเซลล์ที่มีความสำคัญในการยับยั้งการเกิดโรคพืช สาร phenazine เป็นสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย fluorescent pseudomonads เพื่อที่จะยับยั้งการเจริญของโรค take-all disease ของข้าวสาลีที่เกิดจากเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* โดยใช้ *P. fluorescens* สายพันธุ์ 2-79 ยับยั้งการเจริญของเชื้อในแปลงปลูกได้โดยการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อ *P. fluorescens* ก่อนที่จะนำเมล็ดไปปลูกในแปลง (Weller, 1988) เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* สายพันธุ์ CHAO จะยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค *Thielaviopsis basicola* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าดำของยาสูบ (black root rot of tobacco) และ *G. graminis* var. *tritici* เป็นเชื้อสาเหตุของโรค take-all disease ของข้าวสาลี ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* สายพันธุ์ CHAO จะมีการสร้าง 2,4 diacetylphloro-glucinol ซึ่งเป็นสารเมตาโบไลต์ที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา สารต่อต้านแบคทีเรียและ phytotoxic activity (Keel *et al.*, 1992 ; Cook *et al.*, 1995) สาร phloroglucinol เป็นสารประกอบ phenolic ในแบคทีเรียและในพืชซึ่งบางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารต่อต้านไวรัสหรือเป็นสารต่อต้านแบคทีเรีย หรือเป็นสารต่อต้านเชื้อรา หรือเป็นสารต่อต้านพยาธิตัวดีและมีคุณสมบัติเป็น phytotoxic (Thomashow and Weller, 1996) Handelsman and Stabb (1996) รายงานว่าสาร phenazine-1-carboxylate นั้นสามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด

Thomashow *et al.* (1990) รายงานว่าแบคทีเรีย *P. fluorescens* สายพันธุ์ CHAO ที่บริเวณ rhizosphere ของข้าวสาลีในระยะที่มีใบ 3 ใบ จะผลิตสารปฏิชีวนะ phenazine ได้ 55-80 มก.ต่อพื้นที่ 1 เฮกตาร์ Leisinger and Margraff (1979) ได้รายงานว่สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Pseudomonas* ได้แก่ phenazine, pyrrolnitrin-type antibiotic, pyo compound และ indole derivatives (Thomashow and Weller, 1980) แบคทีเรีย *Pseudomonas* และ *Streptomyces* จะสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ phenazine ซึ่งเป็นสารที่มีส่วนประกอบของ heterocyclic ของไนโตรเจนเป็นอนุพันธ์ของ chorimic acid เป็นสารหลักในการเมตาบอลิซึมของ shikimic acid pathway สาร phenazine เป็นสารที่ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราแบบ broad-spectrum toxicity การศึกษาส่วนใหญ่จะเน้นถึงความสัมพันธ์ของ phenazine-1-carboxylic acid (PCA) จาก *P.*

fluorescens 2-79 และ *P.chlororaphis* 30-84 กับการยับยั้งโรค take-all ส่วนในแบคทีเรีย *P. fluorescens* Hv37 จะผลิต oomycin A ใช้ในการควบคุม *Pythium ultimum* การสร้าง oomycin A นั้นสามารถชักนำได้โดยการใช้ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลชนิดอื่น ๆ บางชนิดและยับยั้งการรวมตัวของกรดอะมิโน (Thomashow and Weller, 1996) Broadbent *et al.* (1977) รายงานว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากการทดสอบในพืชชนิดต่าง ๆ ในความสามารถในการควบคุมโรคพืช เป็นแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่มีลักษณะโดดเด่นในความสามารถในการควบคุมโรค เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์จึงสามารถทนทานต่อความร้อนและความแห้งแล้งได้ดี แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ A13 สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด และมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชให้ดีขึ้นในหลายพืชทั้งในดินที่หนึ่งมาเชื้อและในดินธรรมชาติ แบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ L324-92 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืชของข้าวสาลี (Kim *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่พบในบริเวณ rhizosphere นั้นมีแนวโน้มที่จะสร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคที่เกิดโรคในระบบรากพืชได้ดีกว่าแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonads (Baker and Cook, 1983) Glick and Bashan (1997) เสนอว่ากิจกรรมที่เกิดจากการควบคุมทางชีวภาพที่เกิดขึ้น โดยตรงนั้นจะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะของแบคทีเรีย การปรับปรุงการสร้างสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถทำได้ด้วยวิธีพันธุวิศวกรรมโดยการใช้ เทคโนโลยี recombinant DNA โดยการเพิ่มยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะเพียงยีนเดียวเข้าไปการควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพของเชื้อสาเหตุโรคที่เจริญเติบโตในดินจะมีรูปแบบที่ซับซ้อน เพราะเมื่อมีโรคเกิดขึ้นจะเกิดความผันแปรของสภาพแวดล้อมที่บริเวณ rhizosphere ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ปฏิกริยาของจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้น และมีจำนวนประชากรเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณอื่นที่นอกเหนือจากบริเวณ rhizosphere ซึ่งในบริเวณนี้มีกลไกการต่อต้านการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช (antibiosis) กับแบคทีเรียปฏิปักษ์เกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย pseudomonads เป็นส่วนใหญ่ในปัจจุบันได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับการสร้างสารปฏิชีวนะในบริเวณ rhizosphere แบคทีเรีย fluorescent pseudomonads เป็นแบคทีเรียพวกแรกที่พบว่ามีการสร้างสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพ *P. fluorescens* สายพันธุ์ CHAO จะสร้างสารอนุพันธ์ของ phenazine hydrogen cyanide 2,4-diacetylphloroglucinol และ pyoluteorin (Handelman and Stabb, 1996) สารเมตาโบไลต์ที่แบคทีเรีย pseudomonads สร้างขึ้นมีความสำคัญในการยับยั้งการเกิดโรคและบางชนิดยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งจะมีหลักในการทำงาน 3 อย่างหลัก ๆ ที่จะอธิบายถึงลักษณะกลไกการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชของแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ กลไกที่ 1 เป็นการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคโดยการ

แข่งขันการใช้ธาตุเหล็ก (Fe^{3+}) กลไกที่ 2 เป็นการยับยั้งเชื้อโรคโดยการแพร่หรือการสร้างสารไอระเหย (volatile) ซึ่งเป็นสารยับยั้งหรือขัดขวางสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (antibiosis) กลไกที่ 3 เชื้อปฏิปักษ์จะชักนำให้พืชมีความต้านทานต่อโรค สำหรับสารหลักที่แบคทีเรีย fluorescent pseudomonads สร้างขึ้นจะเป็นสารไซเคโอโรฟอร, สาร pyoverdine (pseudobactin), สาร dihydroxy-quinoline chromophore และเส้นสายเปปไทด์ นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้าง hydrogen cyanide (HCN) ในระยะท้ายของการเจริญเติบโต สำหรับสารเมตาโบไลต์จาก pseudomonads จะยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชและเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (De'fago and Haas, 1990) สารเมตาโบไลต์ที่เป็นสารประกอบทั่วไปที่ไม่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตที่ร่างกายสิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น (Buck, 1961) สารปฏิชีวนะเป็นคำที่มีความหมายกว้าง ๆ หมายถึงสารที่ร่างกายสร้างขึ้นมาในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งแล้วไปมีผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่น สารปฏิชีวนะที่รู้จักกันนั้นมีจำนวนมากและมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ในปัจจุบันมีประมาณ 4,000 หรือ 5,000 ชนิด แบคทีเรีย *B. subtilis* มีการสร้างสารปฏิชีวนะ iturinA ที่เป็นสารหลักที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพ สารควบคุมโดยวิธีชีวภาพที่นำมาใช้ในการคลุกเมล็ดพืชก่อนนำไปปลูกภายใต้ชื่อการค้า Quantum-4000 (Baker and Paulitz, 1996) สารปฏิชีวนะที่สร้างโดย *B. subtilis*

Weller and Thomashow (1993) ได้สรุปบทบาทของสารเมตาโบไลต์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพต้องมีลักษณะ 4 ประการ คือประการแรกสิ่งที่ใช้ในการควบคุมโดยวิธีชีวภาพนั้นต้องสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ ประการที่สอง สิ่งนั้นต้องมีความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างสารปฏิชีวนะและความสามารถในการควบคุมโรคประการที่สามสารปฏิชีวนะที่ทำให้บริสุทธิ์หรือสารที่แยกออกจากเซลล์หรือสารที่สกัดจากสิ่งนั้นๆทั้งตัวประการสุดท้าย ในสิ่งมีชีวิตที่กลายพันธุ์ทั้งโดยวิธีการใช้สารเคมีหรือชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจะยับยั้งโรคได้ลดลง

Ohno *et al.* (1996) รายงานว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ NB22 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างปฏิชีวนะในกลุ่ม lipopeptide ที่ยับยั้งเชื้อราเป็นสาร iturin A เป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคหลายชนิดในสภาพ *in vitro* ทั้งยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในต้นกล้ามะเขือเทศและแตงในการทดสอบในแปลง iturin A เป็น cyclic heptapeptide ของ α -amino acid ซึ่งเชื่อมต่อเป็นเส้นสายยาวของ β -amino acid เป็นชนิด homologous Besson *et al.* (1976) รายงานว่า iturin A เป็นสารต่อต้านเชื้อรา (antifungal) ที่มีลักษณะเป็น lipopeptide เป็น β -amino acid เป็นชนิด homologous ที่มีส่วนประกอบที่เป็นสารออกฤทธิ์พวก bacillomycin B, bacillomycin R และ eumycin เมื่อนำมาแยกด้วย

เทคนิค thin-layer chromatography แยกได้กรดอะมิโนชนิดที่ละลายในไขมัน (liposoluble) และเป็นพวกรูป peptide จากการศึกษาทั้งรูปของ crude และสารที่แยกสารอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* และทำให้บริสุทธิ์ขึ้นจะมีผลในการต่อต้านเชื้อราอย่างรุนแรง และมีผลน้อยหรือไม่มีผลต่อการต่อต้านแบคทีเรีย

Nakayama *et al.* (1997) พบว่า recombinant ของ *B. subtilis* M113 (pC115) สามารถผลิต surfactin และ iturin A ซึ่งสาร surfactin เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น biodegradation biosurfactant ที่มีโครงสร้างเป็นวงปิดของ iso-C15hydroxy carboxylic acid และ กรดอะมิโน 7 ตัว คือ L-Glu(1) – L-Leu(2) – (3) L-Val(4) – L-Asp(5) – D-Leu(6) L-Leu(7) มี *B. subtilis* หลายสายพันธุ์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะในกลุ่ม cyclic lipopeptide ในกลุ่มของ iturin จะมีโครงสร้างหลักที่มี iturin ring ที่มีลำดับของ β -hydroxy fatty acid - L-Asp- D-Tyr- D-Asn และลำดับกรดอะมิโนอีก 4 ตัวที่เหลือจะแตกต่างกันไป ส่วนใน surfactin จะเป็น β -hydroxy fatty acid (โดยปกติจะเป็น β -hydroxydecanoic acid) ที่จับกับกลูตามาตด้วย amide bond และจับต่อกับ D-Leu ด้วย ester linkage (Zuber *et al.*, 1993)

Sharga (1998) พบว่าในการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ BS 107 สามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะในช่วงแรกของการเจริญเติบโตและจะสร้างสารปฏิชีวนะสูง สุดเมื่ออาหารใกล้หมดสารปฏิชีวนะที่ *B. subtilis* สายพันธุ์ BS107 สร้างขึ้นมีฤทธิ์ต้านทานปฏิกิริยาของเอนไซม์นิวคลีเอส (Nuclease), โปรติเอส (Protease) และไลเปส (Lipase) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* และ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* เมื่อใช้ *B. subtilis* สายพันธุ์ BS107 หรือสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นนำไปใช้บริเวณรอยตัดมันฝรั่งจะช่วยป้องกันและลดอาการโรคได้ เมื่อสกัดสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นนี้ออกมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บไว้ได้นานมากกว่า 1 ปี

ปริญญ (2532) ได้รายงานว่าการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH6 และสายพันธุ์ CH4 ต่อการเจริญของเชื้อ SRE เกิดจากการผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีองค์ประกอบส่วนที่ออกฤทธิ์มีคุณสมบัติโปรตีน เนื่องจากการเสื่อมคุณสมบัติการยับยั้งเมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลายของเอนไซม์ proteinase K protease type I และ type XIV ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 2.2 และ 4.0 เมื่อนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที อรุจกทา (2534) ได้ทำการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง (antagonistic activity) โดยการนำเชื้อแบคทีเรีย

ปฏิปักษ์ 6 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas fluorescens* 2 สายพันธุ์ คือ NA1 และ SU1 *B. subtilis* 1 สายพันธุ์ คือ CH4, *B.licheniformis* 2 สายพันธุ์ คือ NA37 และ PH9 และเชื้อ *Serratia macrescens* 1 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ NA25 โดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เลี้ยงในอาหารเหลว นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต นำมาทดสอบคุณสมบัติการยับยั้ง พบว่าตะกอนโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ CH4, NA1 และ SU1 ให้ผลยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ได้เมื่อนำสารละลายตะกอนโปรตีนไปไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ proteinase K จะสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* เมื่อนำสารละลายตะกอนโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel filtration chromatography (Bio-GelRP100) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก 3 สายพันธุ์ มีน้ำหนักโมเลกุล 2.3, 3.1 และ 2.9 กิโลดาลตัน

อุไรจนา (2534) และอุไรจนาและคณะ (2535) ได้รายงานการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวจากเชื้อ *R. solanacearum* ในสภาพห้องปฏิบัติการและโรงเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่าเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 นี้เมื่อใช้ร่วมกับมะเชื้อเทศพันธุ์ต้านทานโรคจึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายสูงขึ้นถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *P. fluorescens* NA1 มีการรอดตายของมะเชื้อเทศถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และสารเมตาโบไลต์ที่เชื้อปฏิปักษ์ผลิตมาควบคุมเชื้อโรคเป็นโปรตีน

พัชรินทร์ (2540) ได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4, CH6 และ *P. fluorescens* NA1 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเชื้อเทศจากเชื้อ *R. solanacearum* ในโรงเรือน พบว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน การใช้ในรูปผงเชื้อดีกว่าในรูปสารละลายและการใส่ผงเชื้อ 2 ครั้งดีกว่าการใส่ครั้งเดียว เมื่อทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวในแปลงทดลองพบว่ามิโรคเกิด 44 เปอร์เซ็นต์ซึ่งดีกว่าไม่ใส่เชื้อปฏิปักษ์ที่เกิดโรค 67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวิจิตรา (2541) การควบคุมเชื้อราของข้าวโดยชีววิธีด้วยจุลินทรีย์จำพวก *Bacillus* spp. พบว่า *Bacillus* spp. หลายสายพันธุ์มีศักยภาพและกลไกการออกฤทธิ์โดยโครงสร้างสารออกฤทธิ์ที่ผลิตและปล่อยออกมาในรูปสารปฏิชีวนะ, สารระเหยและเอนไซม์ β 1-3 กลูโคเนส เป็นต้น เป็นสารจำพวก iturin A และสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสามารถทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราและสปอร์ราโดยผ่านกลไกการเกิดรูพรุนทำให้เซลล์เสียหายและแตกในที่สุด เมื่อศึกษาโดยวิธีทางจุลชีววิทยาพบว่าสารสกัดหยาบที่สามารถแยกได้มีค่าการยับยั้งต่อเชื้อราโรคไหม้ (blast) และโรคกาบใบแห้ง (sheath blight) ของข้าว

ปิยะรัตน์และคณะ (2540) ศึกษาการควบคุมโรคเหี่ยวจากเชื้อ *R. solanacearum* ของปทุมมาพบว่าการใช้เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH6 ร่วมกับการจัดการดินโดยใช้ยูเรียอัตรา 68.5 กก./ไร่ และปุ๋ยขาว (800 กก./ไร่) อดดินก่อนปลูกพืช 3 สัปดาห์ สามารถควบคุมโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และตรวจไม่พบเชื้อโรคโดยมีประสิทธิภาพเท่ากับการใช้สารเคมี Dazomet อัตรา 80 กก./ไร่ อดดินเมื่อใช้ดินร่วนปนทรายการควบคุมสารเคมี Dazomet จะให้ผลดีที่สุด (100%) และยังพบว่าวิธีนี้ดีกว่าการใช้ยูเรีย ปุ๋ยขาวหรือเชื้อปฏิปักษ์อย่างเดียว

สุพจน์ (2545) ได้ศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้จากใบและดินบริเวณรากถั่วเหลือง เพื่อควบคุมโรคใบจุดบนของถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* โดยพบว่า *B. firmus* สายพันธุ์ KPS44 ควบคุมโรคได้ดีที่สุดในห้องปฏิบัติการ แต่เชื้อ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ SW01/4 จะให้ผลควบคุมโรคได้ดีที่สุดในเรือนทดลองและมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้สารเคมี copper hydroxide และ streptomycin นอกจากนี้เมื่อทดสอบในสภาพไร่เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ SW01/4 ก็ยังคงให้ผลดีที่สุด คือเกิดโรคเพียง 38 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลเฉลี่ย 273 กก./ไร่ ในขณะที่ใช้เชื้อปฏิปักษ์เกิดโรค 78 เปอร์เซ็นต์และให้ผลผลิตเพียง 228 กก./ไร่ และยังให้ผลดีกว่าการใช้สารเคมี streptomycin และ copper hydroxide เหมือนกับการทดลองในโรงเรือน

สุจินต์ (2545) ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากแหล่งต่างๆ จากใบ เมล็ด และดินบริเวณรากข้าว พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. และเชื้อ *Pseudomonas* sp. สามารถควบคุมการเกิดโรคของใบแห้งของข้าวที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในเรือนปลูกพืชทดลองโดยการจุ่มรากและฉีดพ่นทางใบโดยเกิดโรคเพียง 27-34 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่ใช้เชื้อปฏิปักษ์จะเกิดโรค 69 เปอร์เซ็นต์

4. ลักษณะของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus* spp.

ลักษณะของจุลินทรีย์ *Bacillus* spp. ที่จำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2 ได้จัดให้อยู่ในวงศ์ Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างสปอร์แบบภายในเซลล์ เรียกว่า เอนโดสปอร์ (endospore) เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนและบางครั้งเจริญในที่ไม่มีอากาศได้ (บุญยัติ, 2534) พบได้ทั่วไปในดินและพืช ชอบอุณหภูมิปานกลาง ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นท่อน มีบ้างที่เป็นทรงกลมลักษณะโคโลนีกลมหรือบางครั้งรูปร่างไม่แน่นอน ทึบแสง สีครีมน้ำตาล ถ้าเคลื่อนที่จะใช้แฟลกเจลลารอบตัว (flagella) มีขนาด 0.6–250 ไมครอน *Bacillus* spp. สามารถทน

ต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี และเจริญได้ในอาหารหลายชนิดแม้มีสารอาหาร เพียงเล็กน้อยก็สามารถเจริญได้ (สายใจ, 2541) *Bacillus* spp. เจริญได้ที่ pH 5.0–8.0 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25–75 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถทนต่อความร้อนสูงถึง 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทนต่ออุณหภูมิต่ำสุด –5 ถึง –45 องศาเซลเซียส ผนังเซลล์ของ *Bacillus* spp. ประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก คือ เปปติโดไกลแคนและแอนไอออนิกพอลิเมอร์มากกว่า 1 ชนิด ตัวเซลล์จะถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อเซลล์ที่ประกอบด้วยไซโตพลาสติกเมมเบรน ผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังมีชั้นอื่นๆ อีก เช่น แคปซูล เมือก และ แฟลกเจลลา เป็นต้น และไม่มีชั้นผนังเซลล์ชั้นนอก

Bacillus spp. สร้างสปอร์แบบภายใน มีขนาดยาว 1.2–1.8 ไมครอน เริ่มสร้างสปอร์หลังจากสิ้นสุดระยะการเจริญแบบทวีคูณหรือเป็นระยะ 6–8 ชั่วโมง ลักษณะสำคัญของสปอร์ที่สร้างคือ ทนทานต่อความร้อน รังสี สารเคมี และความแห้งแล้งได้ดี ความคงทนดังกล่าวแตกต่างกันในแต่ละช่วงของการสร้างสปอร์และจะหมดไปเมื่อสปอร์งอก จากการศึกษานี้ของ Abraham (1993) พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ GB03 เจริญในดินรอบรากพืชสามารถสร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม ค่า pH ของดิน รวมทั้งสารเคมีที่ใช้คลุมเมล็ดพืช ทนทานต่อการทำกรรมได้มีการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ในระดับใหญ่สามารถเก็บได้เป็นเวลานานโดยนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโรคที่เกิดกับเมล็ดฝ้าย พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ GB03 สามารถลดการเกิดโรคและเจริญครอบครองพื้นที่บริเวณผิวยางได้ดี

5. ส่วนผสมของแบคทีเรียปฏิปักษ์

Lumsden *et al.* (1995) รายงานว่าความสำเร็จของการควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับการผลิตสูตรส่วนผสมและระบบการนำเข้าสู่เซลล์ในสิ่งมีชีวิต (เชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีต) ที่เกี่ยวกับการควบคุมโรคพืช นอกจากนี้ยังต้องสามารถสอดคล้องกับการอุตสาหกรรมและการค้า การพัฒนาการวิธีการและการใช้ในไร่นา Powell (1992) ได้เสนอความเห็นว่าการประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคโดยวิธีชีวภาพไม่ได้ขึ้นอยู่กับหาเชื้อที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเท่านั้น แต่ต้องคำนึงถึงต้นทุนที่จะเพิ่มขึ้นแก่เกษตรกร ในทางเศรษฐกิจเกี่ยวกับการเจริญเติบโต การเก็บเกี่ยว การทำให้แห้ง การทำสูตรส่วนผสมและการบรรจุภัณฑ์ สูตรผสมที่ใช้ทางการเกษตรมีความต้องการในหลายรูปแบบโดยมีความคงตัวในระหว่างการขนส่งและการเก็บรักษาที่สามารถรักษาสวนขยายพันธุ์ของเชื้อปฏิปักษ์ได้ดี มีช่วงชีวิตยืนยาวยั่งยืน มีประสิทธิภาพและต้นทุนที่ยอมรับได้ (Lumsden *et al.*, 1995)

Lucas (1998) ได้เสนอแนะความแตกต่างที่สำคัญระหว่างการใช้สารเคมีและสารควบคุมทางชีวภาพ (Biological control agent; BCA) ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตและปกติจะต้องการสารเมตาโบไลต์ที่จะมีผลในการทำปฏิกิริยา สิ่งหนึ่งที่ถือว่าเป็นเรื่องที่ยากที่สุดในวงการค้าสาร BCA นั่นคือ การผลิตการบรรจุหีบห่อและใส่ลงไปในพืชที่มีปริมาณเพียงพอและในรูปแบบที่เสถียรภาพ สาร BCA ต้องการการมีอายุยืนยาวที่สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานาน โดยไม่สูญเสียความสามารถในการทำงานสามารถที่จะนำไปใช้กับพืชหรือใส่ลงไปในดิน หรือมีรูปแบบการใช้อย่างอื่นที่แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถที่จะเติบโตได้และคงอยู่ในสภาพแวดล้อมอย่างเพียงพอในช่วงเวลาที่ใช้ในการควบคุมซึ่งมีหลายวิธีใช้ที่แตกต่างกันตามชนิดของปัญหาที่จะนำมาใช้ อาทิเช่น การแช่แข็งแล้วทำให้อาหารที่เลี้ยงจุลินทรีย์แห้ง การผสมเซลล์ลงในสารตัวพา เช่น ดินเหนียว หรือ ผงแป้ง การเปลี่ยนแปลงชีวมวลหรือการหุ้มด้วยสาร alginate polymer การเพิ่มแหล่งอาหารลงไปจะไม่มีผลเฉพาะสารตัวพาเท่านั้นแต่จะไปปลดปล่อยสารอาหารที่จะไปส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่นำมาใช้ด้วย Burges and Jones (1998) ได้ให้ความหมายของสูตรส่วนผสมใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการถนอมรักษาสสิ่งมีชีวิตที่จะใส่ลงไปที่บริเวณเป้าหมายเพื่อปรับปรุงกิจกรรมให้ดีขึ้น ความเข้มข้นของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในส่วนผสมหรือผลิตภัณฑ์ที่จะเก็บรักษาหรือจะใช้เพื่อการค้า นอกจากนั้นแล้วยังเพื่อความเหมาะสมที่จะนำไปใช้กับพืช การเสริมสารเติมแต่งในช่วงกว้างๆเป็นการปรับปรุงประสิทธิภาพและการอยู่รอดในระหว่างการการเก็บรักษาและการนำไปใช้ บริษัทผู้ผลิตต่างๆได้พยายามพัฒนาการใช้แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria , PGPR) เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์ในการควบคุมโดยวิธีชีวภาพด้วยวิธีการครอบครองรากของแบคทีเรีย การใช้ประโยชน์จากสารที่หลั่งออกจากรากเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อาศัยอยู่ในดิน การสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ การแข่งขันในการใช้ปัจจัยจำกัดในการดำรงชีวิต หรือโดยการชักนำให้พืชอาศัยมีความต้านทาน PGPR ที่รู้จักกันคือ 'Dagger G' จะมี *P. fluorescens* เป็น active ingredient (Becker and Schwinn, 1993) สูตรส่วนผสมของแบคทีเรียที่ใช้ทางการค้าที่ได้จดทะเบียนกับ Environmental Protection Agency (EPA) เป็นรูปแบบของเมล็ดของพืชที่มีส่วนของแบคทีเรีย *P. fluorescens* ไม่น้อยกว่า 10^5 CFU/กรัม ส่วนผสมในรูปของผงแป้งเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อาศัยอยู่ในดินก็มีรายงานในการใช้การพัฒนาผลิตภัณฑ์นั้นไม่ยากด้วยคุณสมบัติของสาร adjuvant และรูปเปียก หรือสารแขวนลอย วัตถุดิบเหล่านี้จะใช้ในเซลล์พืช เซลล์สัตว์ และเอนไซม์ alginase จะมีการนำไปใช้ค่อนข้างมากได้ผลดีในห้องปฏิบัติการสารควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ (Biological Control of Plant Diseases Laboratory)(BPD) ในสหรัฐอเมริกาเป็นการเตรียมเพื่อนำไปใช้ในการควบคุมแบคทีเรียและเชื้อรา (Lewis,1991) Walter and Paau (1993) ได้อธิบายเพิ่มเติม

ในการใช้สารควบคุมโดยวิธีชีวภาพที่ประสบผลสำเร็จในทางการค้าอันดับแรกต้องผลิตเป็นจำนวนมาก ต้นทุนต่ำ มีความสม่ำเสมอ และอยู่ในสภาพพร้อมที่จะใช้ได้ทันที สูตรอาหารที่ดีจะป้องกันสภาพทางชีวภาพและสภาพทางฟิสิกส์ของจุลินทรีย์ที่จะประสบผลสำเร็จในการป้องกันคุณสมบัติดังที่กล่าวนั้นสูตรส่วนผสมต้องสามารถชักนำให้มีกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องนั้นต่ำลง (Elad and Chet, 1995) การปรับปรุงจุดนี้จะได้โดยการลดความชื้นลงโดยการทำให้แห้งหรือใส่ร่วมกับน้ำมันในลักษณะ microaerophilic สารลดแรงตึงผิว สารยึดติด สารอิมัลซิไฟเออร์และสารที่ทำให้แพร่กระจายเหล่านี้ลงไปในสูตรเพื่อปรับปรุงวิธีใช้ที่จะนำสู่เป้าหมายในอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต หรือการคลุกเมล็ด การใช้เพื่อยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชในดินนั้นสามารถใช้ทั้งก่อนรวมในตัวกลางในการเติบโต หรือสำหรับการคลุกเมล็ดที่จะมีหรือไม่มีอาหารเป็นส่วนผสม (Elad and Chet, 1995)

Vidhyasekaran and Muthamilan (1995) กล่าวว่าการผลิตสูตรสำเร็จนั้นจะต้องง่ายแก่การเก็บรักษา ใช้ได้ง่ายและสามารถใช้ร่วมกับเครื่องมือได้ดี อีกทั้งสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็ยังคงเป็นเกณฑ์ที่นำมาใช้ในการทำส่วนผสม ส่วนผสมอาจจะอยู่ในรูปแขวนลอยอยู่ในสารตัวพาซึ่งจะเติมเข้าไปเข้าไปสูงที่สุดที่จะอยู่รอดได้ในการเก็บ มีความเหมาะสมที่จะกับเป้าหมายและจะป้องกันเชื้อปฏิปักษ์หลังจากการใช้ในความแตกต่างของสารเคมีออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนประกอบและการมีชีวิตหรือเป็นโปรตีนในธรรมชาติที่จะมีความไวต่อสภาพการเก็บรักษาและสิ่งแวดล้อม (Burge and Jones, 1998) Jones and Burges (1998) ได้สรุปหน้าที่พื้นฐานของสูตรส่วนผสมไว้ 4 หน้าที่หลัก หน้าที่แรกคือ ทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นเสถียรภาพในระหว่างการผลิตและการเก็บรักษา ส่วนหน้าที่ที่สองง่ายแก่การปฏิบัติเพื่อกระจายสู่เป้าหมายได้ในปริมาณมากและมีความเหมาะสมมากที่สุด หน้าที่สามเป็นรูปแบบที่ป้องกันอันตรายจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมในตำแหน่งเป้าหมายแต่ต้องมีความคงทน หน้าที่สุดท้ายจะเพิ่มปฏิริยาของสิ่งมีชีวิตที่เป็นเป้าหมายเพิ่มปฏิริยา การสืบพันธุ์ การสัมผัสและปฏิสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย หรือเชื้อสาเหตุโรคพืชประสิทธิภาพของสารตัวพาในความทนทานของประชากรของ *P. fluorescens* ในการประเมินจากการเก็บรักษาในส่วนผสมรูปผงแห้ง และฟิทมอส แบคทีเรียจะสามารถอยู่รอดได้เกิน 240 วันของการเก็บรักษาประชากรจะลดลงหลังจาก 30 วัน เมื่อคลุกเมล็ดด้วยส่วนผสมรูปผงแห้งในถั่ว chickpea โดย *P. fluorescens* จะมีชีวิตอยู่รอดอย่างน้อย 180 วัน

Vidhyasekaran et al. (1997) ได้พัฒนาส่วนผสมผงแห้งที่จะใช้กับเมล็ดข้าวเพื่อให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ป้องกันการเข้าทำลายใบจากโรคไหม้ของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

และเมื่อฉีดพ่นบนใบพืช แบคทีเรียจะสามารถอยู่รอดบนใบได้ สารแต่งเติมที่จะใส่ลงไปในการผลิต
 ภัณฑ์ เพื่อให้ง่ายแก่การปฏิบัติและการใช้สารแขวนลอยที่เพิ่มความหนา หรือเพิ่มการแขวนลอยจะ
 ช่วยให้มีการแพร่กระจายของสิ่งมีชีวิตในสารตัวพา ป้องกันจับกลุ่มกันของสิ่งมีชีวิตและสามารถ
 นำมาเป็นสารแขวนลอยได้อีกหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน รูปแบบผงแห้งหรือผงละลายน้ำ
 จะมีส่วนประกอบของสารเติมแต่งใส่เข้าไปเพื่อป้องกันการรวมกันของสิ่งมีชีวิตและการแตกของ
 สารตัวพาเป็นสารเฉื่อย ที่ไม่มีส่วนในการป้องกันโรคซึ่งสารตัวพาจะมีผลต่ออายุ และประสิทธิภาพ
 ของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ใน
 แบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. ในสารตัวพาที่เป็นแร่ธาตุที่มีขนาดโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก เช่น
 montmorillonite, zeolite and vermiculite จะอยู่รอดได้ดีกว่าสารตัวพาที่มีขนาดใหญ่กว่า เช่น
 pyrophyllite talc และ kaolinite นอกจากนี้ น้ำตาล lactose จะช่วยทำให้การอยู่รอดของแบคทีเรียใน
 แร่ธาตุที่มีขนาดใหญ่ได้ดีขึ้น ฟิทมอสโดยทั่วไปจะใช้เป็นสารตัวพาของ *Rhizobium* spp และใช้
 ในการหุ้มเมล็ดและใส่ในดินเพื่อเป็นสารควบคุมโดยวิธีชีวภาพ ฟิทมอสที่มีเนื้อละเอียดที่ผสม
 methylcellulose เป็นสารยึดติดที่ใช้กับแบคทีเรียในเมล็ดข้าวสาลีในการควบคุมโรค take-all ที่เกิด
 จากเชื้อสาเหตุ *Gaeumannomyces graminis* (Fravel et al., 1998) แบคทีเรียปฏิปักษ์จะสามารถทำ
 ให้เข้มข้นได้ทั้งในรูปผงแห้ง หรือผงละลายน้ำเพื่อให้ง่ายในการเก็บรักษา การขนส่งและการนำไป
 ใช้จะขึ้นอยู่กับส่วนประกอบที่เป็นสารออกฤทธิ์ ผงเหล่านี้จะสามารถใส่ลงไปในดินได้โดยตรง
 หรือโดยวิธีอื่นๆ หรือใช้เป็นสารแขวนลอยในน้ำ สารตัวพาในรูปอื่น ๆ ที่จะใช้ฉีดพ่นหรือเป็นผง
 บนเมล็ด สารตัวพาโดยส่วนใหญ่จะเป็นของเหลวที่เป็นสารเฉื่อย เจลหรือของแข็ง สารตัวพาใน
 กลุ่มสารอนินทรีย์ เช่น น้ำ, vermiculite, ดินเหนียว, calcium sulphate (ที่มีส่วนประกอบของน้ำ
 ต่างๆกัน), ดินแร่ธาตุ, หิน หรืออาจเป็นสารตัวพาในกลุ่มสารอินทรีย์ อาทิเช่น น้ำมันผัก, ปุ๋ยหมัก,
 ผงละเอียด, ฟิทมอส, ไร, ข้าวสาลี, ผงถั่วข้าวโพด และโพลีเมอร์สังเคราะห์จากธรรมชาติ เช่น
 alginate, K-carrageenan และ polyacrylamide (Fravel et al., 1998) ผงเชื้อที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 5 % ที่
 อยู่ในสารเฉื่อย หรือสารตัวพาที่มีขนาดอนุภาคระหว่าง 5-20 มม. โดยทั่วไปจะมีความสามารถในการ
 การดูดซับต่ำ อนุภาคที่ต่ำกว่า 10 มม. จะมีความคมและเมื่อมีการสูดเข้าไปจะเป็นอันตราย แต่
 อนุภาคเล็กจะเกาะติดได้ดีกว่าดินเหนียว โดยทั่วไปจะได้รับการเลือกใช้เป็นอันดับแรกเป็นตัวทำ
 การเจือจาง สัดส่วนจะต่างกันไปตามความหนาแน่นที่ต้องการ สัดส่วนของส่วนประกอบจะขึ้นอยู่กับ
 ลักษณะของการไหลความเป็นพิษของผงจะทำให้ไม่ติดกับเครื่องจักรกล การแยกตัวออกของ
 สิ่งมีชีวิตออกจากทำเจือจางในระหว่างการขนส่ง การเก็บรักษาและการนำไปใช้ การแยกตัวจะ
 เกิดขึ้นเมื่อสารเจือจางอนุภาคมากกว่า 10 มิลลิเมตร ของสิ่งมีชีวิตและส่วนของสิ่งมีชีวิตมีความ
 หนาแน่นน้อย ความหนาแน่นควรอยู่ในช่วงระหว่าง 320-800 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร อนุภาคของ

ผงสารตัวพาจากอากาศจะแขวนผ่านเข้าสู่พืชได้โดยตรงในอนุภาคที่มีขนาดเล็ก สารเกาะติด เช่น นมผง, sodium sulfate ใส่เพิ่มลงไปเพื่อป้องกันการตกเป็นชั้นๆ เล็ก ๆ (Joned and Burges, 1998)

6. สูตรสำเร็จจากจุลินทรีย์ปฏิบัติ

รูปแบบการเก็บรักษาสูตรสำเร็จสามารถสรุปได้ 2 แบบ ดังต่อไปนี้

6.1 สูตรน้ำ (Liquid formulation)

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัติที่อยู่ในรูปเซลล์แขวนลอยในตัวทำละลายที่เป็นน้ำหรืออาจอยู่ในตัวทำละลายที่ไม่ละลาย ความทนทานต่ออุณหภูมิและสารเคมีต่ำ อายุสั้นและต้องการการเก็บรักษาในภาชนะบรรจุที่พิเศษ ต้องมีระบบการแลกเปลี่ยนก๊าซและความชื้นที่เหมาะสม แต่มีข้อดีคือสามารถนำจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการกระตุ้นให้เจริญเติบโต (reactivation) ในการผลิตสูตรสำเร็จอาจมีการเติมพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) หรืออนุพันธ์ของพอลิแอลกอฮอล์ (polyalcohol) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการป้องกันเชื้อโรคพืช สมคิด (2538) ได้รายงานการทดลองใช้ *B. subtilis* ในรูปเชื้อเข้มข้นทาบริเวณแผลของต้นทุเรียนที่เป็นโรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. พบว่าทำให้แผลเน่าแห้งไม่เกิดยางไหล นอกจากนี้การเก็บจุลินทรีย์ในสภาพของเหลวสามารถทำได้โดยเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยเฉพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญจนถึงระยะที่จุลินทรีย์มีการเจริญสูงสุดและคงที่ (stationary phase) จากนั้นนำไปผสมกับสารช่วยป้องกันเซลล์ถูกทำลายในขณะแช่แข็ง เช่น กลีเซอรอล (glycerol) แล้วบรรจุลงในแอมพูลปิดให้สนิท นำไปแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียสต่อ 1 นาที เมื่ออุณหภูมิลดลงถึง -20 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในถังบรรจุไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิ -150 ถึง -196 องศาเซลเซียส การสูญเสียเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษาโดยวิธีนี้จะเกิดขึ้นได้น้อยมากแต่อาจมีเซลล์บางส่วนตายไปได้บ้าง การเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำมากๆ โดยวิธีนี้จะใช้เก็บจุลินทรีย์ได้เกือบทุกชนิดและเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานาน เนื่องจากทำให้เมแทบอลิซึมของเซลล์ลดลงอย่างมากแต่วิธีนี้มีข้อเสียคือค่าบำรุงรักษาแพง (สมใจ, 2537)

6.2 สูตรแห้ง (Dry formulation)

Paau (1988) รายงานว่าการผลิตสูตรสำเร็จในรูปสูตรแห้งนิยมใช้จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสปอร์ และในการผลิตจะต้องมีการเติมสารป้องกันเซลล์จากความร้อนในระหว่างกระบวนการทำแห้ง เช่น หางนมและเจลาติน เป็นต้น ซึ่งสารที่เติมลงไปบางชนิดช่วยเพิ่มผลได้ของเซลล์และช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษาจากรายงานของสมคิด (2538) พบว่าการผลิตผงเชื้อ *Trichoderma* spp. ในรูปผงแห้ง โดยมีส่วนผสมเชื้อต่อสารพาไคอะตอมไมท์ อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^{10} หน่วยโคโลนี (CFU) ต่อกรัม สามารถเก็บรักษาได้นานกว่า 7 เดือนที่อุณหภูมิห้อง โดยมีปริมาณเชื้อเหลือ 10^7 หน่วยโคโลนีต่อผงเชื้อ 1 กรัม และจากผลการทดลองของจิระเดช (2543) พบว่า ผงเชื้อ *T. harzianum* ที่ใช้เชื้อต่อสารพาไคอะตอมไมท์ อัตราส่วน 1:3 โดยน้ำหนัก เมื่อเก็บรักษาผงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 334 วัน ปริมาณเชื้อลดลง 1.1×10^4 จาก 4.7×10^6 หน่วยโคโลนีต่อกรัมต่อผงเชื้อ 1 กรัม นอกจากนี้ Van (2000) พบว่าสารพา Insch sandy loam soil ซึ่งมีแหล่งคาร์บอน 2.13 เปอร์เซ็นต์และแหล่งไนโตรเจน 0.19 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ เมื่อผสมกับเชื้อ *P. fluorescens* สายพันธุ์ MON787 มีปริมาณเชื้อหลังการทำแห้ง 9 logCFU/g เมื่อนำไปเก็บในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เชื้อมีปริมาณลดลง 2 log CFU/g และลดลง 4 log CFU/g เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 1-2 เดือน

Vidhyasekaran and Muthamilan (1995) พบว่าในการผลิตสูตรสำเร็จเชื้อ *P. fluorescens* โดยใช้ talc เป็นสารพาผสมกับคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose, CMC) 1 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH เท่ากับ 7.0 เมื่อเก็บสูตรสำเร็จที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 240 วัน ปริมาณเชื้อลดลงจากเริ่มต้น 3.75×10^8 เป็น 1.3×10^8 หน่วยโคโลนีต่อกรัม ต่อมาในปี 1999 ได้ศึกษาการเก็บรักษาสูตรสำเร็จชนิดนี้ในถุงพลาสติกปิดสนิท พบว่าเชื้อสามารถรอดชีวิตได้ดีและนานกว่า 30 วัน ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ จากเชื้อเริ่มต้น 9×10^8 หน่วยโคโลนีต่อกรัม

จากรายงานการทดลองของ Lewis (1995) พบว่า การผลิตสูตรสำเร็จในรูปเม็ดเชื้อ *Gliocladium virens* G1-3 และ G1-21 และ *T. hamatum* TRI-4 โดยใช้แป้งข้าวโพดเจลาตินไนซ์เป็นส่วนประกอบเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน เชื้อมีปริมาณการรอดชีวิตลดลง โดย G1-3, G1-21 และ TRI-4 ลดลงจาก 1.8×10^7 , 6.4×10^6 และ 1.2×10^6 เป็น 1.3×10^7 , 2.6×10^6 และ 3.7×10^4 หน่วยโคโลนีต่อกรัมตามลำดับ

Kloepper and Schroth (1981) ศึกษาการผลิตสูตรสำเร็จชนิดผงเชื้อ *Pseudomonas* spp. โดยมี talc และแซนแทนกัม 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนผสม พบว่าหลังการทำแห้งเชื้อมีปริมาณลดลงจาก 10^9 เป็น 8.2×10^7 หน่วยโคโลนีต่อกรัม ในทำนองเดียวกันผลการทดลองของ Walker and Connick (1983) พบว่าการผลิตสูตรสำเร็จในรูปเม็ดจากเชื้อ *Phyllosticta* sp. ซึ่งประกอบด้วย clay 10-20 เปอร์เซ็นต์และโซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate) 1.33 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5×10^9 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร หลังผ่านการทำแห้งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 สัปดาห์ เชื้อที่รอดชีวิตเท่ากับ 1.8×10^7 หน่วยโคโลนีต่อกรัม นอกจากอุณหภูมิการเก็บรักษาจะเป็นปัจจัยที่สำคัญแล้วภาชนะบรรจุที่เหมาะสมก็เป็นปัจจัยที่สำคัญเช่นกัน ภาชนะบรรจุทำหน้าที่ควบคุมการถ่ายเทอากาศและความชื้น ซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราและทำให้เชื้อไม่อยู่ในสภาวะคงที่ในรูปผงแห้ง (Alan, 1988)

ช่อทิพย์ (2538) ศึกษาการผลิตสูตรสำเร็จโดยใช้รำข้าวผสมกับผงทัลคัมในการผลิตเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ KK-TO3 และ CH6 โดยใช้โคอะคอมไมท์เป็นสารพา พบว่า *Bacillus* spp. สายพันธุ์ KK-TO3 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.8×10^8 และสายพันธุ์ CH6 7.1×10^8 หน่วยโคโลนีต่อกรัม หลังการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 180 วัน ปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 10^4 - 10^6 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เท่ากับ 8.8×10^7 และ 6.4×10^7 โคโลนีต่อผงเชื้อ 1 กรัม ตามลำดับ

7. ส่วนประกอบของสูตรสำเร็จ

7.1 สารพา (carrier)

สารพาสามารถแบ่งเป็นสารอนินทรีย์ เช่น vermiculite, clay, calcium sulphate และ mineral soil และสารอินทรีย์ เช่น น้ำมันพืช ขี้เลื่อย รำข้าวสาลี เป็นต้น โดยทั่วไปสารพามีลักษณะเป็นสารเลื่อย และทำหน้าที่เป็นตัวพาเชื้อจุลินทรีย์ให้กระจายตัวอย่างทั่วถึงเมื่อนำสูตรสำเร็จไปใช้งาน สารพาที่เป็นสารอนินทรีย์จะมีปริมาณลิกนินเป็นส่วนประกอบอยู่สูงซึ่งช่วยยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิด และยังใช้เป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ จากการทดลองของ Fravel *et al.* (1995) พบว่าสารพาอินทรีย์ เช่น ชังข้าวโพด กากถั่วเหลือง รำข้าวสาลี จะมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน เท่ากับ 96.6, 25.4 และ 21.1 ตามลำดับ ซึ่งมีผลต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อหลัง

การทำแห้งและพบว่าในการผลิตสูตรสำเร็จเชื้อ *Talaromyces flavus* เมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นสารพาปริมาณเชื้อรอดชีวิตสูงกว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลืองหรือรำข้าวสาลี

Lomer *et al.* (1993) พบว่า kerosene, neem-oil และซิลิกาเจลในสูตรสำเร็จจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาสูตรสำเร็จปริมาณเชื้อ *Metarhizium flavoviride* จำนวน 5×10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร และปริมาณสปอร์เท่ากับ 4×10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพิ่มขึ้นจากเดิม 3-4 วัน Douro-kpindou *et. al* (1995) พบว่า kerosene ต่อ peanut oil อัตราส่วน 1:1 เติมนในสูตรสำเร็จเชื้อ *Metarhizium flavoviride* ที่มีปริมาณเชื้อ 2×10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Zonocerus variegates*

Mark *et al.* (1996) พบว่า ผสมสารพา diatomaceous earth ในสูตรสำเร็จเชื้อ *Colletotrichum truncatum* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2×10^6 หน่วยโคโลนีต่อลิตร นำไปผ่านการทำแห้งโดยวิธี air dried เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 เดือน เชื้อมีชีวิต 93 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การเติมแป้งเจลาตินไนซ์ (gelatinize) ลงในสูตรสำเร็จพบว่าที่ระยะเวลา 18 เดือนเชื้อมีชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์

7.2 สารป้องกันการปนเปื้อน (contaminant suppressants)

สารป้องกันการปนเปื้อนช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นนิยมใช้สารปฏิชีวนะจากรายงานการทดลองของ Douglas *et al.* (1996) ได้เติมสารปฏิชีวนะ penicillin G และ streptomycin ปริมาณ 0.04 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในอาหาร PDA ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Beauveria bassiana* เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรียอื่น นอกจากนี้การเติมสารปฏิชีวนะ เช่น cycloheximide ปริมาณ 75-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วยยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อราในอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียได้ในการผลิตสูตรสำเร็จจุลินทรีย์จะถูกทำให้อยู่ในสภาวะคงตัวหรือจะเจริญเมื่อถูกกระตุ้นโดยสารต่างๆ เช่น การผลิตสูตรสำเร็จสูตรน้ำจะเติม sorbic acid และเกลือเพื่อกระตุ้นการงอกของสปอร์เชื้อรา

7.3 สารเชื่อม (binder)

สารเชื่อมช่วยในการจับตัวของสารพาและจะถูกเติมลงไปในช่วงกระบวนการผลิตสูตรสำเร็จในรูปเม็ด นอกจากนี้ยังมีสมบัติเป็นสารป้องกันเซลล์ สารเชื่อมโดยทั่วไปมีสมบัติละลายน้ำและมีความหนืดต่ำ ตัวอย่างสารเชื่อมที่นิยมใช้ได้แก่ แป้ง แขนแทนกัม (xantangum) กลูโคส (glucose) เด็กซ์แทรน (dextran) เจลลาติน (gelatin) กากน้ำตาล (mollasses) เมทิลเซลลูโลส (methycellulose) โซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (sodiumcarboxy methylcellulose) เซลลูโลสอซิเตท (cellulose acetate) เป็นต้น จากผลการทดลองของ Taylor (1991) พบว่าในการผลิตสูตรสำเร็จจากเชื้อ *T.harziznum* มีการเติมสารเชื่อมได้แก่ pelgel และ polyox ปริมาตร 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากรายงานการทดลองของ Davis (1992) พบว่าเซลลูโลส (cellulose) เป็นสารพอลิเมอร์ที่มีลักษณะคล้ายไคตินไม่ละลายน้ำซึ่งจำเพาะกับจุลินทรีย์บางชนิดที่มีเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase enzyme) จึงสามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ในการผลิตสูตรสำเร็จในรูปน้ำได้มีการเติมเซลลูโลสผสมกับเชื้อ *C. globosum* เพื่อยับยั้งโรค fly speck ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Zygomphiala jamaicensis*

7.4 สารป้องกันเซลล์ (protectant)

Takeuchi *et al.* (2000) ศึกษาการเติมสารป้องกันเซลล์ในกระบวนการทำแห้งสูตรสำเร็จพบว่าสารป้องกันเซลล์ได้แก่สารอัลจินต-ไคโตซาน (alginate-chitosan) สารละลายแลคโตส โซเดียมอัลจินต (lactose-sodium alginate) และสารละลายกรดอะซิติก-ไคโตซาน (acetic acid solution-chitosan) สารเหล่านี้มีส่วนช่วยสูตรสำเร็จสามารถเก็บได้นานขึ้น นอกจากนี้ยังมีสารป้องกันเซลล์เช่น แลคโตส (lactose) กลูโคส (glucose) ฟรุคโตส (fructose) หรือซูโครส (sucrose) ปริมาตร 5, 10 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเติมในสูตรสำเร็จทำให้เซลล์ยีสต์เพิ่มการมีชีวิตรอดจากเดิม 20 เป็น 30-40 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานของ Abadias (2001) ศึกษาการเติมหางนม 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นสารป้องกันเซลล์ในกระบวนการทำแห้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อยีสต์ *Candida sake* โดยช่วยให้เชื้อมีชีวิตรอด 28.9 เปอร์เซ็นต์

ในกระบวนการทำแห้งมีการเติมสารป้องกันเซลล์เพื่อป้องกันปฏิกิริยาของโปรตีนและเซลล์ที่มีชีวิต เช่นการใช้ alpha, alpha-trehalose-borate เพื่อป้องกัน *Lactobacillus acidophilus* ในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็งโดย trehalose มีประสิทธิภาพเป็นสารป้องกันเซลล์ที่ดี นิยมใช้ในอุตสาหกรรม นอกจากนี้ borate ช่วยป้องกันเอนไซม์จากการถูกทำลายและเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่ trehalose วิธีการนี้นิยมใช้กับเซลล์โปรคาริโอต (รุ่งนภา, 2535)

7.5 กระบวนการทำแห้งสูตรสำเร็จ

Tsvetkov (1983) ได้นำ *Micrococcus varians* สายพันธุ์ M95 และ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ L4 ทำแห้งเชื้อแบบพ่นฝอยโดยใช้สารป้องกันเซลล์ 5 ชนิด ได้แก่ ซูโครส แลคโตส โซเดียมกลูตาเมต เปปโตน(peptone) และนมผงขาดมันเนยทำการเติมเจลาติน กรดกลูตามิก (glutamic acid) และ โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) ช่วยให้เชื้อมีจำนวนการรอดชีวิตสูงขึ้น หลังผ่านการทำแห้ง สามารถเก็บเชื้อได้นาน 3 เดือนที่อุณหภูมิห้อง

Graham (1998) ศึกษาการทำแห้งแบบใช้อากาศพบว่าการทำแห้งโดยใช้ลมร้อนเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Arthrotrichum dactyloides* สายพันธุ์ A4 บนอาหาร GCS ที่ประกอบด้วย กลูโคส และน้ำแช่เชื้อข้าวโพด นำน้ำหมักไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นำเซลล์ที่เหวี่ยงแยกได้เติมกับสารบิโคมในเครื่องปั่นเป็นเวลา 10 วินาที เติม vermiculite และ kaolin เป็นสารพา จากนั้นนำผ่านเครื่อง electrically powered pasta maker จะได้เม็ดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร นำไปทำแห้งในตู้อบลมร้อนให้เหลือความชื้น 4-5 เปอร์เซ็นต์ ถ้าความชื้นมากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ จะมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆจะได้ขนาดเม็ดยาว 0.5–2.5 มิลลิเมตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 18 เดือน นำเม็ดเชื้อที่ได้ผสมกับดินพบว่า *A. dactyloides* สามารถเจริญแพร่พันธุ์สร้างไฮฟาลงสู่ดิน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไส้เดือนฝอย *Meloidogyne javanica* สามารถลดจำนวนไข่ การเกิด gall และลดจำนวนไส้เดือนฝอยได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ การทำแห้งโดยใช้ลมร้อน วิธีการนี้ทำโดยใช้ลมร้อนผ่านผลิตภัณฑ์ที่ต้องการทำแห้งเป็นวิธีที่สะดวก ราคาถูก วิธีนี้เป็นการทำแห้งอย่างช้า ๆ ทำให้จุลินทรีย์ที่ต้องการทำแห้งสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมในระหว่างการทำแห้งได้

Lam (2001) พบว่าการเติม poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) ลงในสูตรสำเร็จ recombinant human nerve growth factor (rhNGF) จะช่วยป้องกัน rhNGF ถูกทำลายในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอย วิธีนี้ได้เปรียบในเรื่องความสะดวกในการขนส่งและการเก็บรักษา แต่วิธีการนี้มีผลทำให้เชื้อมีประสิทธิภาพลดจำนวนลงค่อนข้างมากส่วนใหญ่เชื้อที่ผลิตในรูปแบบนี้ได้แก่ *Streptococcus* spp. ซึ่งโดยทั่วไปจะลดจำนวนลงถึง 50-80 เปอร์เซ็นต์ระหว่างการทำแห้ง นอกจากนั้นระหว่างเก็บรักษาเชื้อจะลดปริมาณลงอีกตามระยะเวลาที่เก็บอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ นับว่ามีผลทำให้เชื้ออยู่รอดได้ดียิ่งขึ้น เช่น การเติม yeast extract และวิตามินซีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ปริมาณ *Lactobacillus bulgaricus* อยู่รอดมากขึ้น นอกจากในขั้นตอนการ

เลี้ยงเชื้อแล้วยังสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเชื้อโดยเติมสารต่างๆ ขณะทำแห้ง เช่น เติมนิโนโซเดียมกลูตาเมต ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ หรือ แลคโตส 7 เปอร์เซ็นต์ ได้มีการเปรียบเทียบผลของการเติมนมผงพร่องมันเนย ยีสต์บรอท โมโนโซเดียมกลูตาเมต เดกสเตรนและซูโครส ต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อสเตรปโตคอคคัส พบว่านมผงพร่องมันเนยให้ผลดีที่สุด รองลงมาได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต เดกสเตรนและซูโครส ตามลำดับ การควบคุมความชื้นให้เหมาะสมนับว่าเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ทำให้ปริมาณการมีชีวิตรอดระหว่างการเก็บสูงขึ้น เช่น การทำแห้งแบบพ่นฝอยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* โดยใช้ความเย็นที่มีความชื้น 3.8-5.7 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณเชื้ออยู่รอดมากกว่าถ้าที่มีความชื้น 0.7-2.3 เปอร์เซ็นต์

การทำแห้งเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดความชื้นในผลิตภัณฑ์เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ อยู่ในรูปที่สามารถจัดการได้ง่าย เช่น การเก็บรักษาและการขนส่ง ผลิตภัณฑ์ชีวภาพส่วนมากมีความไวต่อความร้อนสูง ดังนั้นการเลือกวิธีการทำแห้งควรคำนึงถึงความเสถียรของผลิตภัณฑ์โดยการเลือกใช้กระบวนการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำ หรือโดยการปรับปรุงสมบัติของผลิตภัณฑ์ให้ทนความร้อนได้ดีขึ้น การกำจัดน้ำในรูปของไอน้ำจำเป็นต้องให้พลังงานความร้อนซึ่งได้มาจากการทำสมดุลความร้อนระหว่างอัตราความร้อนที่ให้และความร้อนแฝงของการระเหย กลไกการถ่ายเทความร้อนได้แก่ การนำ การพา การแผ่รังสี หรือรวมกัน (เพ็ญแข, 2541) การเก็บรักษาสูตรสำเร็จในสภาพแห้ง อาศัยวิธีการทำแห้งแบบต่างๆ เช่น การทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยใช้ความร้อนและความเย็น การทำแห้งแบบใช้อากาศ เป็นต้น การทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยใช้การพาความร้อน การถ่ายเทความร้อน การเคลื่อนที่ของผลิตภัณฑ์และการกำจัดไอน้ำเกิดจากกระแสอากาศ วิธีนี้สามารถใช้งานแบบต่อเนื่องในปริมาณมาก ผลิตภัณฑ์ถูกป้อนเข้าเครื่องโดยหัวฉีดจะถ่ายเทความร้อนให้แก่ผลิตภัณฑ์ที่เคลื่อนที่ในทิศทางสวนทางกันซึ่งทำให้การระเหยเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในขณะที่อุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ยังคงมีค่าต่ำและไอน้ำถูกกำจัดออกไปกับกระแสของอากาศร้อน การทำแห้งแบบนี้สามารถใช้กับเอนไซม์ สารปฏิชีวนะและจุลินทรีย์ เป็นต้น โดยจุลินทรีย์ที่จะทำแห้งโดยวิธีนี้จะ ต้องทนความร้อนได้ดีพอสมควร อุณหภูมิที่ใช้โดยปกติจะอยู่ระหว่าง 63-68 องศาเซลเซียส ความร้อนที่ใช้จะทำให้เชื้อลดปริมาณลงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณจะลดลงอีกขณะเก็บ การเติมสารป้องกันเซลล์ได้แก่ ไวตามินซีและโมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate) มีผลทำให้เชื้อมีชีวิตรอดนานขึ้นเช่น การผลิต *Lactobacillus acidophilus* โดยไม่เติมสารดังกล่าวก่อนทำให้แห้งมีผลทำให้เชื้อลดจำนวนจาก 1.7×10^9 เซลล์ต่อกรัม เหลือ 10^6 เซลล์ต่อกรัม เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เพียง 1 เดือน ในขณะที่ถ้ามีการเติมสารเหล่านี้แล้ว

ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 6.1-6.5 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิเดียวกันเป็นเวลา 6 เดือน เชื้อจะลดลงจาก 5.7×10^9 โคโลนีต่อกรัม เหลือ 1.7×10^9 โคโลนีต่อกรัม (นภา, 2534)

8. ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์

อัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ภายหลังการทำแห้งขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิในระหว่างการทำให้แห้ง ชนิดของจุลินทรีย์ สภาพของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในช่วงที่ถูกความร้อนและสภาพแวดล้อมของเซลล์ในระหว่างการให้ความร้อน อย่างไรก็ตาม ความร้อนที่ใช้ อาจสามารถทำลายเซลล์ปกติทั้งเซลล์หรือส่วนใหญ่ของเซลล์ สปอร์หรือบางส่วนของสปอร์ ทั้งนี้ขึ้นกับลักษณะของความร้อนที่ใช้เป็นสำคัญ เซลล์และสปอร์ของจุลินทรีย์มีคุณสมบัติในการต้านทานอุณหภูมิสูงที่แตกต่างกัน ความต้านทานความร้อนของเซลล์แบคทีเรียมีความแตกต่างกันตามแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย เซลล์ของแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม สามารถต้านทานความร้อนได้สูงกว่าแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อน การเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูงจะทำให้แบคทีเรียนั้นมีความสามารถในการต้านทานต่อความร้อนที่สูงขึ้นไปด้วย แบคทีเรียที่จับกันเป็นกลุ่ม หรือสร้างแคปซูลถูกทำลายได้ยากกว่ากลุ่มที่ไม่มีการจับตัวหรือไม่สร้างแคปซูล เซลล์แบคทีเรียที่มีองค์ประกอบเป็นไขมันสูงจะถูกทำลายได้ยากกว่าเซลล์ปกติ สำหรับกรณีของสปอร์ต้องคำนึงถึงสภาพในระหว่างการสร้างสปอร์อีกด้วย โดยทั่วไปแล้วสปอร์ของแบคทีเรียที่อุณหภูมิสูงจะยังมีความสามารถในการต้านทานต่อความร้อนสูงกว่าสปอร์ของแบคทีเรียที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอยู่ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น สปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* สามารถต้านทานต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้นาน 15-20 นาที

8.1 สภาพของเซลล์ปกติหรือสปอร์ก่อนให้ความร้อน

ลักษณะของเซลล์ในระหว่างการเจริญเติบโตหรือในระหว่างการสร้างสปอร์ จะมีผลต่อการต้านทานความร้อนของเซลล์หรือสปอร์นั้น ทั้งนี้จะแบ่งออกเป็น

1) องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีความสำคัญอย่างมากต่อการต้านทานความร้อนของเซลล์หรือสปอร์ ตามปกติแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเซลล์หรือสปอร์ให้เจริญดีจะทำให้เซลล์หรือสปอร์นั้นมีความต้านทานต่อความร้อนได้ดี ทั้งนี้ขึ้นกับผลของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนประกอบของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อรวมถึงปริมาณของสารอาหารดังกล่าวเป็นสำคัญ ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อเพียงพอ มักทำให้เกิดเซลล์หรือสปอร์ที่

ต้านทานความร้อนได้ดี ในกรณีที่มือน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีในปริมาณที่ต่ำอาจช่วยเพิ่มความต้านทานต่อความร้อน แต่ในทางตรงข้ามถ้ามีในปริมาณที่สูง น้ำตาลกลูโคสอาจเปลี่ยนไปเป็นกรดซึ่งจะกลับไปลดความต้านทานต่อความร้อนลงมา นอกจากนี้แล้วเกลือก็ยังมีผลต่อความต้านทานความร้อน กล่าวคือ ประจุของเกลือฟอสเฟตและเกลือแมกนีเซียมจะมีผลในการลดความต้านทานต่อความร้อนของสปอร์แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือทั้งสองชนิดเป็นส่วนประกอบ

2) อุณหภูมิของการบ่ม อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ และสำหรับการสร้างสปอร์ จะมีผลต่อการต้านทานความร้อนของเซลล์และสปอร์ โดยทั่วไปแล้วความต้านทานความร้อนจะเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิที่ใช้บ่มถูกปรับให้สูงใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์นั้น เช่น *Escherichia coli* เลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส (ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของมัน) จะสามารถต้านทานต่อความร้อนได้ดีกว่าที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

3) ช่วงของการเจริญเติบโตหรืออายุของเชื้อ ความต้านทานต่อความร้อนของเซลล์หรือสปอร์ขึ้นกับช่วงของการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือช่วงของการสร้างสปอร์ทั้งนี้ขึ้นกับอายุของเซลล์และสปอร์ เซลล์แบคทีเรียจะมีความต้านทานความร้อนสูงสุดเมื่อเจริญในช่วงปลายของระยะที่แบคทีเรียกำลังปรับตัวหรืออยู่ในช่วงระยะการเจริญคงที่และช่วงที่เซลล์มีความต้านทานความร้อนต่ำสุดอยู่ในระหว่างการเจริญเติบโตในระยะการเจริญสูงสุด กรณีของสปอร์ที่อายุน้อยยังไม่เป็นสปอร์ที่สมบูรณ์จะมีความต้านทานต่อความร้อนได้ต่ำกว่าสปอร์ที่เจริญสมบูรณ์เต็มที่แล้ว

8.2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) ความเข้มข้นของประจุไฮโดรเจนและค่า pH โดยทั่วไปทั้งเซลล์หรือสปอร์จะมีความต้านทานต่อความร้อนได้ดีในสารที่มี pH ในช่วงเป็นกลางแต่ถ้า pH เปลี่ยนไปอยู่ในสภาพกรดหรือด่าง จะทำให้ความต้านทานต่อความร้อนของเซลล์หรือสปอร์ลดลงอย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลของกรดกับด่างที่มีต่อความต้านทานความร้อน พบว่าในการเปลี่ยนแปลงสภาพความเป็นกรดจะมีผลต่อความต้านทานความร้อนของเซลล์หรือสปอร์อย่างมากเมื่อเปรียบ เทียบกับการเปลี่ยนแปลงของสภาพความเป็นด่าง

2) ส่วนประกอบอื่นๆ ของสารอาหาร (substrate) เช่น เกลือ ถ้าใช้ในความเข้มข้นต่ำจะมีผลช่วยป้องกันสปอร์จากความร้อน น้ำตาลมีผลช่วยป้องกันเซลล์หรือสปอร์จากความร้อน โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์เป็นสำคัญ สาเหตุที่น้ำตาลมีผลต่อการป้องกันเซลล์หรือสปอร์จากความร้อนอาจเนื่องมาจากน้ำตาลจะมีผลในการลดค่า water activity (a_w) ซึ่งการลดค่า a_w ทำให้เซลล์หรือสปอร์มีความสามารถในการต้านทานความร้อนสูงขึ้น (วรารุณี, 2538)

ธาตุซิลิคอน (Silicon)

ซิลิคอนเป็นธาตุที่มีมากที่สุดในชั้นผิวโลก แต่ปริมาณการละลายได้และอยู่ในสารละลายดินมีเพียงเล็กน้อย ซึ่งอยู่ในรูปของ กรดโมโนซิลิซิก (monosilicic acid, $\text{Si}(\text{OH})_4$) สภาพละลายได้ของกรดดังกล่าวในน้ำ (ที่ 25 องศาเซลเซียส) ประมาณ 2 มิลลิโมล หรือ 56 มิลลิกรัม Si ต่อลิตร (Marschner, 1955) Balasta *et al.* (1989) ซิลิคอนจะเคลื่อนย้ายจากรากสู่ส่วนเหนือดินทางไซเลม (xylem) จะสะสมอยู่ในผนังของไซเลมเวสเซลล์ค่อนข้างมาก ทำให้ไซเลมแข็งแรงและไม่ยุบตัวขณะที่พืชมีอัตราการคายน้ำสูง Marschner (1955) ซิลิคอนช่วยป้องกันการล่งตัวของเชื้อโรคเข้าไปในรากและใบ ความแข็งแรงของเซลล์ผิวนอกที่มีซิลิคอนสูงช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดล่งตัวเข้าไปในเซลล์และแมลงก็กัดกินใบน้อยลง Fawe *et al.* (1998) ศึกษาผลของซิลิคอนที่ช่วยในการสะสมสาร flavanoid phytoalexin ในแดง ซึ่งสารนี้ช่วยเพิ่มความต้านทานต่อโรคน้ำค้างของแดงได้ Fawe *et al.*, (2001) รายงานว่าธาตุซิลิคอนสามารถส่งเสริมให้พืชต้านทานต่อเชื้อรา *Pythium* และ *Sphaerotheca* ในแดง และต้านทานต่อโรคใบไหม้ (blast) และกาบใบแห้ง (sheath blight) ในข้าว (Datnoff *et al.*, 2001) ผลจากธาตุซิลิคอนสามารถเพิ่มความต้านทานแก่พืชได้โดยมีรายงานไว้ในหลายๆ พืชว่าสามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อราได้ เช่น ในแดง ข้าวโอ๊ต ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ และอ้อย และมีการสะสมธาตุซิลิคอนไว้ในเซลล์พืช (Rodrigues *et al.*, 2003) เช่นเดียวกับ Dannon and Wydra (2004) รายงานว่าธาตุซิลิคอนสามารถช่วยลดการเกิดโรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของมะเขือเทศได้ทั้งในพันธุ์ที่อ่อนแอและพันธุ์ที่ค่อนข้างต้านทานเมื่อทดลองในแปลงปลูกพืชแบบไม่ใช้ดิน และตรวจสอบภายในต้นมะเขือเทศไม่พบว่าธาตุซิลิคอนสะสมอยู่พบเพียงเชื้อแบคทีเรียเท่านั้นที่สะสมในต้นมะเขือเทศ Diogo and Wydra (2007) ใช้ซิลิคอนชักนำมะเขือเทศให้ต้านทานต่อเชื้อ *R. solanacearum* พบว่าซิลิคอนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ pectic cell wall ของมะเขือเทศ ช่วยลดการเกิดโรค 38.1 % ในพันธุ์ Kingkong (พันธุ์ค่อนข้างต้านทาน) และ 100% ในพันธุ์ Hawaii 7998 (พันธุ์ต้านทาน) นอกจากนี้ยังพบว่าซิลิคอนไม่มีผลต่อปริมาณประชากรของเชื้อ *R. solanacearum*

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

1.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am}

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 ที่มีในห้องปฏิบัติการภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน มาใช้ทดสอบ โดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Malt Yeast extract (MY) (ช่อทิพย์, 2538) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงต่อใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว MY 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง centrifuge (Sorvall, RC-5) ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (ปรับความขุ่นของสารละลายเชื้อโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601) ให้ได้ 0.2 O.D. ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ซึ่งจะมีปริมาณของเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 10^8 CFU/ml) นำสารแขวนลอยมาตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยวิธี disc diffusion method (อุไรจนา, 2534) โดยผสมสารละลายเชื้อ *R. solanacearum* (0.2 O.D. ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ซึ่งจะมีปริมาณของเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 10^8 CFU/ml) 0.5 มิลลิลิตร ในอาหาร NGA 10 มิลลิลิตร เทอาหารที่ผสมเชื้อแล้วลงในจานเลี้ยงเชื้อ ปล่อยให้อาหารแข็งประมาณ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำ paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ทำจากกระดาษกรอง (whatman #1) ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ววางบนจานเลี้ยงเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อ แล้วใช้ micropipette หยดสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ CH4 (โดยปรับค่าความขุ่นให้มีค่า 0.2 O.D. ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร) แผ่นละ 10 ไมโครลิตร ทิ้งไว้จนหมดแล้วใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อคีบเอา paper disc วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเชื้อ *R. solanacearum* โดยวาง paper disc ที่หยดน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้วแผ่นละ

10 ไมโครลิตร เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ (control) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการวัดความกว้างของบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของเชื้อถึงขอบบริเวณใส

การทำเครื่องหมาย (marker) บนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 มาติดเครื่องหมายเพื่อใช้ในการติดตาม โดยใช้สารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 100 ppm โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในอาหารเลี้ยง NGB นาน 24-48 ชั่วโมง นำมาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยและกระจายบนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ ampicillin 50 ppm บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บโคโลนีเดี่ยวที่เจริญมา cross streak บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ ampicillin 50 ppm อีกครั้งและเก็บโคโลนีเดี่ยวที่เจริญมาเลี้ยงในอาหาร NGB นาน 24-48 ชั่วโมง นำมาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยและกระจายบนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 ppm บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงและเก็บโคโลนีเดี่ยวที่เจริญมา cross streak บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 ppm อีกครั้ง จากนั้นทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีเครื่องหมายแล้วในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่มีเครื่องหมายแล้วด้วยวิธี disc diffusion method (อุไรจนา, 2534) และทำเช่นเดียวกับข้อ 1.1 แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ติดเครื่องหมายแล้วจะใช้สัญลักษณ์คือ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am}

1.2 การทดสอบหาปริมาณการแยกเชื้อกลับคืนมา (recovery) ของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} จากดินและน้ำในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} และ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่ 0.2 O.D. ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร (8 logCFU/ml) เติมน้ำลงในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำปริมาตร 9 มิลลิลิตรและในหลอดทดลองที่บรรจุดิน 1 กรัม ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที และเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตรในหลอดที่บรรจุดินแล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็น 2 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 น้ำ

กรรมวิธีที่ 2 ดิน

บันทึกผลการทดลองโดยการตรวจหาจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียโดย นำแต่ละหลอดมาทำ dilution plate count เพื่อบันทึกปริมาณประชากรของเชื้อ โดยนำ 0.1 มิลลิลิตร ของ suspension เชื้อแบคทีเรียแต่ละหลอดมากระจาย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} กระจายบนอาหาร TZC ส่วนเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} กระจายบนอาหาร NGA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงและทำการนับจำนวนประชากร

1.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 สูตร ประกอบด้วย

1. Malt Yeast extract (MY)
2. กากน้ำตาล 1%
3. น้ำมะพร้าว 1%
4. น้ำแป้งข้าวเจ้า 1%
5. กากน้ำตาล 1% + น้ำมะพร้าว 1%
6. กากน้ำตาล 1% + น้ำแป้งข้าวเจ้า 1%
7. กากน้ำตาล 1% + เปปโตน 0.5%
8. น้ำมะพร้าว 1% + น้ำแป้งข้าวเจ้า 1%
9. น้ำมะพร้าว 1% + เปปโตน 0.5%
10. น้ำแป้งข้าวเจ้า 1% + เปปโตน 0.5%

บรรจุลงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบกับอาหาร MY (สูตรที่ 1) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (ช่อทิพย์, 2538)

ย้ายเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณที่เจริญบนอาหาร NGA อายุ 24 ชั่วโมงจำนวน 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว NGB ปริมาตร 20 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ใน flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งเก็บส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์ และล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อและปรับความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ 0.2 O.D. ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ใช้ micropipette คูด suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณที่ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ใช้ micropipette ที่ปลอดเชื้อคูดตัวอย่าง suspension ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังบ่มเชื้อนาน 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และนำแต่ละไอโซเลตมาทำ Dilution plate count เพื่อนับปริมาณประชากรของเชื้อ จากนั้นนำ suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณที่แต่ละไอโซเลตบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด และเมื่อผ่านการบ่มเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (3 วัน) มาตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ โดยการนำ suspension มาปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสมาฆ่าเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform) 10% โดยปริมาตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์และคลอโรฟอร์มด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เก็บส่วนใสและทิ้งตะกอน จากนั้นนำส่วนในมา กรองเซลล์แบคทีเรียที่เหลืออยู่ด้วย sterile syringe filter ขนาด 0.02 μm นำสารกรอง (culture filtrates) ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยวิธี paper disc method คือ ด้วยวิธี disc diffusion method (อุไรจิตา, 2534) ดังอธิบายในข้อ 1.1 ทำเช่นเดียวกันกับข้อ 1.1

2. ศึกษาการอยู่รอดและประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณในวัสดุผสมสูตรต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

2.1 การพัฒนาสูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am}

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MY (พัชรินทร์, 2540) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงต่อใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลว MY 250

มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอน เซลล์ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (ปรับความขุ่นของสารละลาย เชื้อ โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ให้ได้ 0.2 O.D. ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ซึ่งจะมีปริมาณของเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 10^8 CFU/ml) แล้ว นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปผสมกับสารพลาสมิดต่างๆ คือ ทัลคัม, ราข้าว, สาเก, ข้าวฟ่าง และปลาย ข้าว (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) ในสภาพปลอดเชื้อและปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 โดยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตและบรรจุ ในกล่องพลาสติกนำไปทำให้แห้งในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 50 องศาเซลเซียส (โดย อัตรา ส่วนในการผสมระหว่างเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะและสารพา คือ 1: 2 โดย ปริมาตร : น้ำหนัก) นำสูตรสำเร็จที่แห้งแล้วมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นเบนด์ (blender) ด้วย ความเร็วต่ำเป็นเวลา 30 วินาที และบรรจุในถุงพลาสติก ปิดผนึกให้เรียบร้อย นำสูตรสำเร็จของเชื้อ แบคทีเรียปฏิชีวนะสูตรต่างๆ ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยวิธี paper disc method และนับปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยการทำ dilution plate count (ผงเชื้อสูตรสำเร็จ 1 กรัมค่อน้ำ 9 มิลลิลิตร) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลและทำการตรวจสอบ ปริมาณการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่อุณหภูมิห้องในสูตรสำเร็จทุก 1 เดือนเป็นเวลา 6 เดือนและคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am}

$$\text{การลดลงของประสิทธิภาพการยับยั้ง (\%)} = \frac{\text{ค่ายับยั้งเริ่มต้น} - \text{ค่ายับยั้งเดือนสุดท้าย}}{\text{ค่ายับยั้งเริ่มต้น}} \times 100$$

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อสูตรสำเร็จของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในห้องปฏิบัติการ

2.2.1 การเตรียมเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

นำเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} (RS) ที่มีความสามารถในการเกิดโรครุนแรงมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) (Schaad, 1988) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงต่อใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลว TTC 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่

ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของสารละลาย เชื้อโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ให้ได้ 0.2 O.D. ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตรและนับปริมาณของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am}

2.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อสูตรสำเร็จในห้องปฏิบัติการ

นำดินที่ใช้ในการปลูกพืชทดสอบมา 1 กก. ผสมเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} (RS) ที่ได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งใส่ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 กรัมต่อขวดและเติมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} (CH4) สูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทลคัม+รำข้าว ลงไปโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 8 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 เปรียบเทียบ 1 (ไม่ใส่เชื้อ CH4 และเชื้อ RS)

กรรมวิธีที่ 2 เปรียบเทียบ 2 (ใส่เชื้อ RS อย่างเดียว)

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ CH4 1 กรัม (ไม่ผสมเชื้อ RS)

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ CH4 2 กรัม (ไม่ผสมเชื้อ RS)

กรรมวิธีที่ 5 ใส่ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ CH4 3 กรัม (ไม่ผสมเชื้อ RS)

กรรมวิธีที่ 6 ใส่ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ CH4 1 กรัม + เชื้อ RS

กรรมวิธีที่ 7 ใส่ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ CH4 2 กรัม + เชื้อ RS

กรรมวิธีที่ 8 ใส่ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ CH4 3 กรัม + เชื้อ RS

บันทึกผลการทดลองที่ 0, 5 และ 9 วัน โดยวิธีการ dilution plate count (ดิน 1 กรัมต่อน้ำ 9 มิลลิลิตร) เขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมากระจายบนอาหาร NGA บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงและนับจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} และเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am}

3. การทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} และธาตุซิลิคอนในสภาพโรงเรือน

3.1 การเตรียมเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

นำเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ที่มีความสามารถในการเกิดโรครุนแรงมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว TTC ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อเป็นกล้าเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำกล้าเชื้อไปเลี้ยงต่อใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลว TTC 250 มิลลิลิตรบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง centrifuge (Sorvall, RC-5) ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นนำมาเชื้อ ปรับความขุ่นของสารละลายเชื้อโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601) ให้ได้ 0.2 O.D. ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร และนับปริมาณของเชื้อ *R. solanacearum* ได้ 8 logCFU/ml

3.2 การวางแผนการทดลองและการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* ในมะเขือเทศ

วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) โดยเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} มาใช้ในการปลูกเชื้อโดยวิธีราดลงดินที่ปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 อายุประมาณ 30-40 วัน จำนวน 300 มิลลิลิตร/กระถางและใช้ผงเชื้อสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ ทดคัม+รำข้าว และแบ่งการทดลองนี้เป็น 6 กรรมวิธี ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ต้น ซึ่งประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 (T1) = เปรียบเทียบ (น้ำ)

กรรมวิธีที่ 2 (T2) = ราดสารละลายซาลิซิก แอซิด (salicylic acid) ความเข้มข้น 9 mM (หรือมีเนื้อสารซาลิโคน 2.66 กรัม) ลงดินปลูกมะเขือเทศ ครั้งละ 100 มิลลิลิตรต่อกระถางที่ 1 วัน ก่อนปลูกเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} และหลังจากปลูกเชื้อทุกๆ 7 วัน จำนวน 8 ครั้ง (ซาลิซิก แอซิด)

กรรมวิธีที่ 3 (T3) = ฟอสฟอรัสซิลิเกต (sodium silicate) ความเข้มข้น 9 mM (หรือมีเนื้อสารซิลิโคน 0.25 กรัม) ลงดินปลูกมะเขือเทศ ครั้งละ 100 มิลลิลิตรต่อกระถางที่ 1 วัน ก่อนปลูกเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} และหลังจากปลูกเชื้อทุกๆ 7 วัน จำนวน 8 ครั้ง (โซเดียม ซิลิเกต)

กรรมวิธีที่ 4 (T4) = คลุกผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ลงดินปลูกมะเขือเทศ ครั้งละ 30 กรัมต่อกระถางที่ 1 วันก่อนปลูกเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} และหลังจากปลูกเชื้อทุกๆ 7 วัน จำนวน 8 ครั้ง (ผงเชื้อ BS)

กรรมวิธีที่ 5 (T5) = คลุกผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ลงดินปลูกมะเขือเทศ ครั้งละ 30 กรัมต่อกระถาง ร่วมกับการราดสารละลายซาลิซิก แอซิด ครั้งละ 100

มิลลิลิตรต่อกระถาง ที่ 1 วันก่อนปลูกเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} และหลังจากปลูกเชื้อทุกๆ 7 วัน จำนวน 8 ครั้ง (ผงเชื้อ BS+ซาลีซิล แอซิด)

กรรมวิธีที่ 6 (T6) =คลุกผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ลงดินปลูกมะเขือเทศ ครั้งละ 30 กรัม ต่อกระถางร่วมกับพ่นสาร โซเดียม ซิลิเกต ครั้งละ 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง ที่ 1 วันก่อนปลูกเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} และหลังจากปลูกเชื้อทุกๆ 7 วัน จำนวน 8 ครั้ง (ผงเชื้อ BS + โซเดียม ซิลิเกต)

บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนต้นที่แสดงอาการเหี่ยวทุกสัปดาห์และตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *R. solanacearum* ภายในต้นมะเขือเทศเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดตายและเก็บตัวอย่างดินมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิชีวนะในดินปลูกมะเขือเทศและผลผลิตของมะเขือเทศเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 8 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อและวิเคราะห์ทางสถิติ



ภาพที่ 1 ผลิตภัณฑ์ซิลิกอนที่ใช้ในการทดลอง ก) ซาลิซิก แอซิด (salicylic acid) ผลิตโดยชมรมเกษตรปลอดสารพิษและ ข) โซเดียม ซิลิเกต (sodium silicate) ผลิตโดยบริษัท Fisher Scientific

3.3 การตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อภายในต้นมะเขือเทศ

นำส่วนของต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการโรคเหี่ยวมาตรวจสอบตามวิธีของ Winsted and Kelman (1952) โดยใช้มีดผ่าเชื้อตัดตามขวางแล้วนำไปใส่หลอดของน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ ชักครู่ตรวจดูของเหลวสีขาวขุ่นคล้ายน้ำมัน (ooze หรือ bacterial exudate) ไหลซึมออกมาจากรอยตัดเป็นสาย นำลูปที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะ suspension ของแบคทีเรียในหลอดทดลอง ทำ cross streak บนอาหารแข็ง Triphenyl Tetrazolium Chloride medium (TZC) (Kelman, 1954) บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.4 การศึกษาจำนวนประชากรของเชื้อ *R. solonacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศและประชากรของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคมารับการแยกเชื้อ นำดินมาผึ่งลมให้แห้งพอหมาด ทำ soil suspension โดยใช้ดิน 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 45 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที นำมาแยกเชื้อโดยการทำ dilution plating method จากนั้นนำสารละลายดินความเข้มข้นที่ต้องการอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร มากระจายให้ทั่วอาหาร mSM-1 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ ampicilin 100 ppm. (ปิยะรัตน์, 2541) บ่มไว้ประมาณ 24-48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบโคโลนีของเชื้อ *R. solonacearum* ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทำวิธีเดียวกันแต่ใช้อาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ ampicilin 100 ppm

6. สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ ฯ.
2. โรงเรือนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ ฯ.
3. โรงเรือนสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (Asian Institute of Technology; AIT) ปทุมธานี

7. ระยะเวลาในการทำวิจัย

มิถุนายน 2549 – มีนาคม 2552

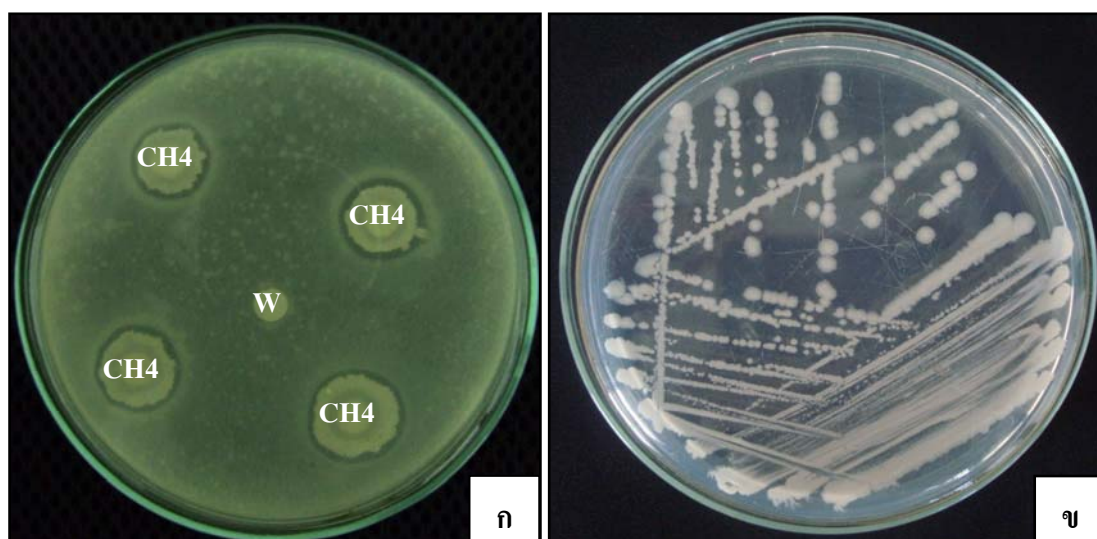
ผลและวิจารณ์

ผล

1. การศึกษาการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

1.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am}

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc diffusion บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ทั้งก่อนติดฉลากและหลังติดฉลาก (ภาพที่ 2 ก) เหมือนปกติ และการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA มีลักษณะโคโลนีเหมือนกันทั้งก่อนและหลังติดฉลาก (ภาพที่ 2 ข)



ภาพที่ 2 แสดงบริเวณยับยั้ง (clear zone) โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} บนอาหาร Nutrient glucose agar โดยมีน้ำเป็นชุดควบคุม (Control, C) เป็นเวลา 48 ชม. (ก) และลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ที่ติดฉลากด้วยสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 100 ppm บนอาหาร Nutrient glucose agar อายุ 48 ชั่วโมง (ข)

1.2 การหาปริมาณเชื้อที่แยกได้กลับคืนมา (recovery) ของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} จากดินและน้ำในห้องปฏิบัติการ

การหาเปอร์เซ็นต์การนำกลับคืนมา (% recovery) ของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} จากปริมาณเชื้อเริ่มต้นคือ 8.74 logCFU/ml เมื่อใส่เชื้อลงไปในน้ำและดินทั้งสองกรรมวิธี พบว่าเปอร์เซ็นต์การนำกลับคืนมาในน้ำคิดเป็น 75.64% และในดินคิดเป็น 75.17% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการตรวจหาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ที่นำกลับคืนมา (recovery) พบว่าในน้ำ (กรรมวิธีที่ 1) มีปริมาณเชื้อ 6.61 logCFU/ml ส่วนในดิน (กรรมวิธีที่ 2) มีปริมาณเชื้อ 6.57 logCFU/g (ตารางที่ 1)

การหาเปอร์เซ็นต์การนำกลับคืนมาของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} จากปริมาณเชื้อเริ่มต้นคือ 8.90 logCFU/ml เมื่อเติมลงไปยังสองกรรมวิธีแล้วพบว่าในน้ำได้เชื้อกลับคืนมา 60.45% และในดิน 55.17% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} พบว่าในน้ำ (กรรมวิธีที่ 1) มีปริมาณเชื้อ 5.38 logCFU/ml ส่วนในดิน (กรรมวิธีที่ 2) มีปริมาณเชื้อ 4.91 logCFU/g (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความสามารถนำกลับคืนมา (recovery) ของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ที่ 2 ชั่วโมงหลังจากใส่เชื้อ

กรรมวิธี ^{2/}	ปริมาณเชื้อ <i>R. solanacearum</i> สายพันธุ์ To-Ud3 ^{Am} (logCFU/ml) ^{1/}			ปริมาณเชื้อ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} (logCFU/ml) ^{1/}		
	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น	ปริมาณเชื้อ recovery	% การนำกลับคืนมา ^{3/}	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น	ปริมาณเชื้อ recovery	% การนำกลับคืนมา ^{3/}
1 น้ำ	8.74	6.61	75.64 ^{4/} a	8.90	5.38	60.45 ^{4/} a
2 ดิน	8.74	6.57	75.17 b	8.90	4.91	55.17 b

^{1/} ค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} และ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} จากการทำ 10 ซ้ำ โดยจากดินเป็น logCFU/g

^{2/} น้ำปริมาตร 9 มิลลิลิตรในหลอดทดลองเติมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ปริมาตร 1 มิลลิลิตรหรือเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} 1 มิลลิลิตร ดินจำนวน 1 กรัมใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำและเติมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ปริมาตร 1 มิลลิลิตรหรือเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} 1 มิลลิลิตร

^{3/} เปอร์เซ็นต์การนำกลับคืนมา = $100 - \frac{(\text{ปริมาณเชื้อที่ใส่} - \text{ปริมาณเชื้อที่นำกลับคืนมา} \times 100)}{\text{ปริมาณเชื้อที่ใส่}}$

^{4/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

1.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การเพิ่มประชากรของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในอาหารจำนวน 10 สูตร พบว่า อาหารสูตรน้ำมะพร้าว1%+เปปโตน0.5% มีการเพิ่มของจำนวนประชากรของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} มากที่สุดคือ 61.87% รองลงมาได้แก่ น้ำมะพร้าว1%, กากน้ำตาล1%+เปปโตน0.5%, กากน้ำตาล1%, Malt Yeast extract (MY), น้ำแป้งข้าวเจ้า1%+เปปโตน 0.5%, กากน้ำตาล1%+น้ำมะพร้าว1%, กากน้ำตาล1%+น้ำแป้งข้าวเจ้า1%, น้ำแป้งข้าวเจ้า1% และ น้ำมะพร้าว1%+น้ำแป้งข้าวเจ้า1% คือ 60.80%, 60.71%, 60.51%, 60.48%, 60.43%, 60.08%, 59.89%, 59.75% และ 59.41% ตามลำดับ ซึ่งทุกอาหารแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหาร MY (เปรียบเทียบ) ยกเว้นสูตรอาหารกากน้ำตาล 1% และน้ำแป้งข้าวเจ้า 1% + เปปโตน 0.5% ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 10 สูตรที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าอาหารสูตร MY เป็นสูตรที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพดี มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.2 O.D. ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร (8 logCFU/ml) ซึ่งใช้เป็นสูตรเปรียบเทียบ พบว่าอาหารสูตร กากน้ำตาล 1% + เปปโตน 0.5% มีปริมาณเชื้อมากที่สุดคือ 13.39 logCFU/ml รองลงมาได้แก่อาหารสูตรน้ำมะพร้าว 1% + เปปโตน 0.5%, น้ำแป้งข้าวเจ้า 1% + เปปโตน 0.5%, กากน้ำตาล 1%, MY, น้ำมะพร้าว 1% + น้ำแป้งข้าวเจ้า 1%, กากน้ำตาล 1% + น้ำแป้งข้าวเจ้า 1%, กากน้ำตาล 1% + น้ำมะพร้าว 1%, น้ำแป้งข้าวเจ้า 1% และ น้ำมะพร้าว 1% คือ 13.35, 13.27, 13.17, 13.16, 13.06, 13.04, 13.03, 13.02 และ 12.86 logCFU/ml ตามลำดับ ซึ่งทุกอาหารแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหาร MY ยกเว้นสูตรอาหารกากน้ำตาล 1% ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดต่างๆในการผลิตสารเมตาโบไลต์ หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ของแบคทีเรียออกและฆ่าเซลล์ที่เหลือด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วนำสารกรองมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} พบว่าในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว 1%+น้ำแป้งข้าวเจ้า 1%ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งมากที่สุดคือ 0.82 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่อาหารสูตรกากน้ำตาล1%, น้ำแป้งข้าวเจ้า1%+เปปโตน0.5%, MY , กากน้ำตาล1%+น้ำมะพร้าว1%, น้ำแป้งข้าวเจ้า1%, น้ำมะพร้าว1%, กากน้ำตาล1%+น้ำแป้งข้าวเจ้า1%, กากน้ำตาล1%+เปปโตน

0.5% และน้ำมะพร้าว 1%+เปปโติน 0.5% คือ 0.80, 0.79, 0.78, 0.77, 0.75, 0.75, 0.74, 0.72 และ 0.67 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสูตรอาหารที่ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งที่ดี 4 อันดับเมื่อเปรียบเทียบกับสูตร MY คือ สูตรน้ำมะพร้าว1%+น้ำแป้งข้าวเจ้า 1%, สูตรกากน้ำตาล1%, น้ำแป้งข้าวเจ้า1% + เปปโติน0.5% และกากน้ำตาล1% +น้ำมะพร้าว1%, ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนประชากรและประสิทธิภาพสารกรอง (culture filtrate) ของเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ที่เลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆเป็นเวลา 72 ชั่วโมงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} (RS)บนอาหาร Nutrient glucose agar ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนประชากรของเชื้อ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} (logCFU/ml)			ความกว้าง
				บริเวณยับยั้งการ
	0 ชม.	72 ชม.	% การเพิ่ม ประชากร ^{2/}	เจริญ(ซม) ^{1/}
1. Malt Yeast extract	5.20	13.16 d ^{3/}	60.48 c	0.78 a ^{3/}
2. กากน้ำตาล1%	5.20	13.17 d	60.51 c	0.80 a
3. น้ำมะพร้าว1%	5.04	12.86 f	60.80 b	0.75 b
4. น้ำแป้งข้าวเจ้า1%	5.24	13.02 ef	59.75 ef	0.75 b
5. กากน้ำตาล1%+น้ำมะพร้าว1%	5.07	13.03 e	60.08 d	0.77ab
6.กากน้ำตาล1%+น้ำแป้งข้าวเจ้า1%	5.23	13.04 e	59.89 e	0.74 b
7. กากน้ำตาล1%+เปปโตน0.5%	5.26	13.39 a	60.71 bc	0.72 c
8. น้ำมะพร้าว1%+น้ำแป้งข้าวเจ้า1%	5.30	13.06 e	59.41 f	0.82 a
9. น้ำมะพร้าว1%+เปปโตน0.5%	5.09	13.35 b	61.87 a	0.67 d
10. น้ำแป้งข้าวเจ้า1%+เปปโตน0.5%	5.25	13.27 c	60.43 cd	0.79 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ RS จำนวน 10 ซ้ำ

^{2/} เปอร์เซ็นต์การเพิ่มประชากร = $\frac{\text{ประชากรหลังเลี้ยง} - \text{ประชากรก่อนเลี้ยง}}{\text{ประชากรหลังเลี้ยง}} \times 100$

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวดังแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

2. ศึกษาการอยู่รอดและประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในวัสดุผสมสูตรต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

2.1 การพัฒนาสูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am}

จากการทดลองการหาเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในสูตรสำเร็จทั้ง 6 สูตร (ภาพที่ 3) หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าในสูตรสำเร็จ สูตร BS+ ทัลคัม+ รำข้าว (สูตรเปรียบเทียบ) มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของจำนวนประชากรน้อยที่สุด คือ 38.36% รองลงมาคือ สูตร BS+ปลายข้าว คือ 39.38% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสูตรที่เหลือสูตร BS+สาकुดิบ+ รำข้าว, BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง+ รำข้าว, BS+สาकुดิบ และ BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง คือ 42.15%, 42.43%, 44.15% และ 45.15% ตามลำดับซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

จากการทดลองการศึกษามีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในสูตรสำเร็จทั้ง 6 สูตร ซึ่งมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะเริ่มต้น คือ 8.25 logCFU/ml หลังจากเก็บรักษามาเป็นเวลา 6 เดือนโดยใช้สูตรสำเร็จ BS+ ทัลคัม+ รำข้าว (ช่อทิพย์, 2538) เป็นสูตรเปรียบเทียบ (1.88 log CFU/g) ซึ่งจากการทดลองพบว่าสูตรสำเร็จ BS+ปลายข้าว มีปริมาณการรอดชีวิตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตร BS+ ทัลคัม+ รำข้าว คือ 1.87 logCFU/g รองลงมาได้แก่สูตร BS+สาकुดิบ+ รำข้าว, BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง+ รำข้าว, BS+สาकुดิบ และ BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง คือ 1.77, 1.75, 1.67 และ 1.64 log CFU/g ตามลำดับซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

เปอร์เซ็นต์การลดลงของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในสูตรสำเร็จทั้ง 6 สูตร ในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสูตร BS+สาकुดิบ+ รำข้าว มี % การยับยั้งลดลงน้อยที่สุดคือ 30% รองลงมาได้แก่ สูตร BS+ปลายข้าว คือ 39% และ สูตร BS+ ทัลคัม+ รำข้าว คือ 40% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสูตรอื่นมีการยับยั้งตามลำดับ คือ 45%, 46% และ 52% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จทั้ง 6 สูตรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R.solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสูตรสำเร็จ BS+ ทัลคัม+ รำข้าว (สูตรเปรียบเทียบ) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีความกว้างของ บริเวณยับยั้ง (clear zone) เท่ากับ 0.90 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ สูตรสำเร็จ BS+ปลายข้าว มี บริเวณยับยั้ง 0.89 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสูตร BS+สาकुดิบ+ รำ ข้าว, BS+สาकुดิบ, BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง+ รำข้าว และ BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง ยับยั้งน้อยลงตามลำดับ คือ 0.80, 0.70, 0.60 และ 0.58 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรเปรียบเทียบ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 4)

ตารางที่ 3 ประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในสูตรสำเร็จชนิดต่างๆและการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} (RS) โดยใช้ผงเชื้อสูตรสำเร็จของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} (BS) ชนิดต่างๆบนอาหาร Nutrient glucose agar ที่อุณหภูมิห้อง

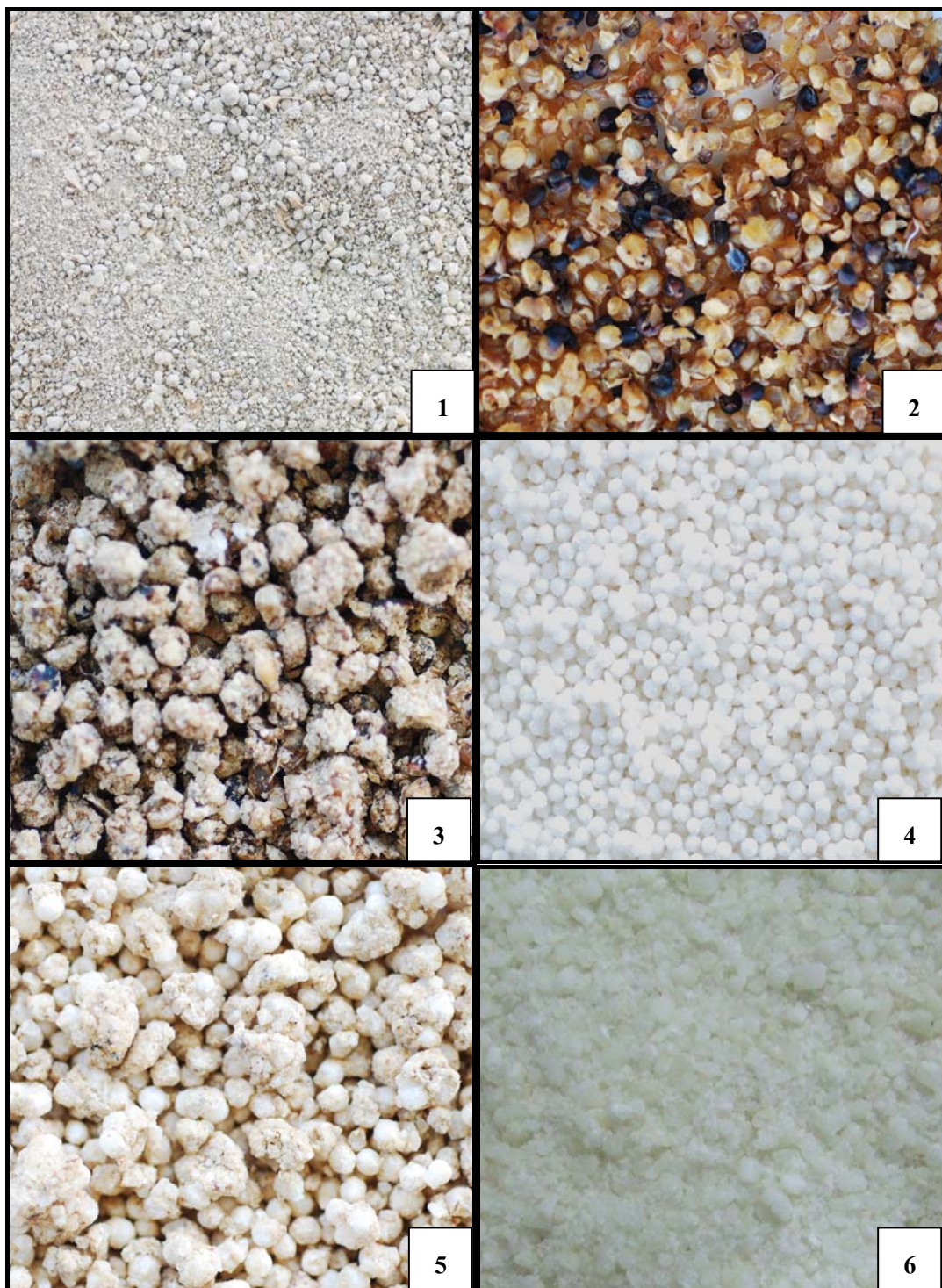
สูตรสำเร็จ	ประชากรเชื้อแบคทีเรีย		% การลดลงของประชากร ^{1/}	ความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญ (ซม.)		% การลดลงของการยับยั้ง ^{2/}
	ปฏิปักษ์ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am}					
	log(CFU/g)					
	เดือนที่ 1	เดือนที่ 6		เดือนที่ 1	เดือนที่ 6	
สูตรที่1 BS+ทลั้ม+รำข้าว ^{3/}	3.05 b ^{4/}	1.88 a	38.36 c	1.50a	0.90 a	40 c
สูตรที่2 BS+ข้าวฟ่างนึ่ง	2.99 c	1.64 c	45.15 a	1.21 b	0.58 e	52 a
สูตรที่3 BS+ข้าวฟ่างนึ่ง+รำข้าว	3.04 b	1.75 b	42.43 b	1.13 b	0.60 d	46 b
สูตรที่4 BS+สาकुดิบ	2.99 c	1.67 c	44.15 a	1.27 b	0.70 c	45 b
สูตรที่5 BS+สาकुดิบ+รำข้าว	3.06 b	1.77 b	42.15 b	1.15b	0.80 b	30 d
สูตรที่6 BS+ปลายข้าว	3.08 a	1.87 a	39.38 bc	1.45 a	0.89 a	39 c

^{1/} การลดลงของประชากร (%) = $\frac{\text{จำนวนประชากรเดือนที่ 1} - \text{จำนวนประชากรเดือนที่ 6}}{\text{จำนวนประชากรเดือนที่ 1}} \times 100$

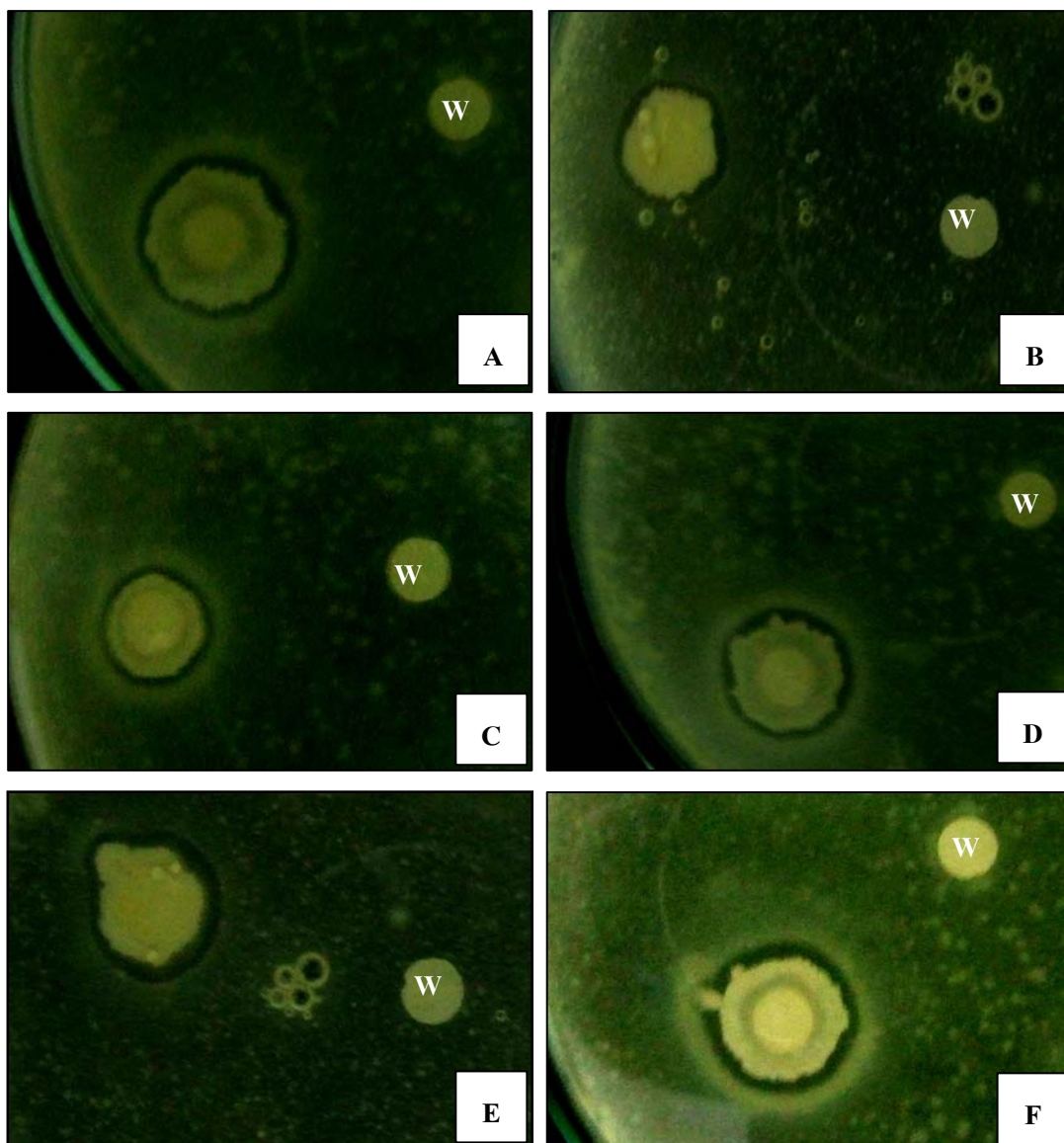
^{2/} การลดลงของประสิทธิภาพการยับยั้ง (%) = $\frac{\text{ค่ายับยั้งเริ่มต้น} - \text{ค่ายับยั้งเดือนสุดท้าย}}{\text{ค่ายับยั้งเริ่มต้น}} \times 100$

^{3/} ซ่อทิพย์ (2538) เป็นสูตรอาหารเปรียบเทียบ

^{4/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวดัง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test



ภาพที่ 3 สูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} (BS) โดย 1 = BS+ ทดกัม+ รำข้าว, 2 = BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง, 3 = BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง+ รำข้าว, 4 = BS+สาकुดิบ, 5 = BS+สาकुดิบ+ รำข้าว และ 6 = BS+ปลายข้าว



ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} หลังจากเก็บรักษา 6 เดือน ในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} โดยวิธี paper disc method บนอาหาร Nutrient glucose agar โดย A = สูตรที่ 1 BS+ ทดลัม+ รำข้าว, B= สูตรที่ 2 BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง, C= สูตรที่ 3 BS+ ข้าวฟ่างนึ่ง+ รำข้าว, D= สูตรที่ 4 BS+ สาอูดิบ, E= สูตรที่ 5 BS+ สาอูดิบ+ รำข้าว, F= สูตรที่ 6 BS+ ปลายข้าว และ W= น้ำ เป็นชุดควบคุม (Control)

2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จอัตราส่วนผสมต่างๆในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R.solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จในห้องปฏิบัติการ

นำผงเชื้อสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทลคัม+รำข้าว (ช่อทิพย์, 2538) ทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อสูตรสำเร็จในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 9 วัน พบว่าในกรรมวิธีที่ 7 ใส่ผงเชื้อ BS 3 กรัม+RS มีจำนวนประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} น้อยที่สุด คือ 6.01 logCFU/g รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ 6 ใส่ผงเชื้อ BS 2 กรัม+RS และกรรมวิธีที่ 5 ใส่ผงเชื้อ BS 1 กรัม+RS คือ 6.11 และ 6.63 logCFU/g ส่วนกรรมวิธีที่ 1 (ควบคุม) ใส่ RS อย่างเดียว มีเชื้อปริมาณมากที่สุด คือ 6.68 logCFU/g ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

ส่วนปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} กรรมวิธีที่มีประชากรของเชื้อมากที่สุดคือ กรรมวิธีที่ 7 ใส่ผงเชื้อ BS 3 กรัม+RS คือ 6.97 logCFU/g รองลงมาได้แก่ กรรมวิธี 6 ใส่ผงเชื้อ BS 2 กรัม+RS, กรรมวิธีที่ 4 ใส่ผงเชื้อ BS 3 กรัม, กรรมวิธีที่ 3 ใส่ผงเชื้อ BS 2 กรัม, กรรมวิธีที่ 2 ใส่ผงเชื้อ BS 1 กรัม และ กรรมวิธีที่ 5 ใส่ผงเชื้อ BS 1 กรัม+RS คือ 6.56, 6.52, 6.47, 6.43 และ 6.00 logCFU/g ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของผงเชื้อสูตรสำเร็จ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} (BS) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} (RS) ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 9 วัน

กรรมวิธี ^{1/}	ปริมาณเชื้อ <i>R. solanacearum</i> สายพันธุ์ To-Ud3 ^{Am} (logCFU/g)			ปริมาณเชื้อ <i>B. subtilis</i> สาย พันธุ์ CH4 ^{Am} (logCFU/g)		
	0 วัน	5 วัน	9 วัน	0 วัน	5 วัน	9 วัน
1. RS(control)	4.16 a ^{2/}	6.47 a	6.68 a	ND ^{3/}	ND	ND
2. ผงเชื้อ BS 1 กรัม	ND	ND	ND	4.20 d	5.93 cd	6.43 c
3. ผงเชื้อ BS 2 กรัม	ND	ND	ND	4.56 b	6.05 c	6.47 c
4. ผงเชื้อ BS 3 กรัม	ND	ND	ND	4.86 ab	6.10 c	6.52 b
5. ผงเชื้อ BS 1 กรัม+RS	4.09 a	6.30 b	6.63 a	4.33 c	5.65 d	6.00 d
6. ผงเชื้อ BS 2 กรัม+RS	3.98 b	6.16 c	6.11 b	4.60 b	6.33 b	6.56 b
7. ผงเชื้อ BS 3 กรัม+RS	3.65 c	6.15 c	6.01 c	4.89 a	6.92 a	6.97 a

^{1/} ผงเชื้อ BS = สูตรสำเร็จสูตรที่ 1 BS+ทัลคัม+รำข้าว (ช่อทิพย์, 2538)

^{2/} ค่าเฉลี่ยปริมาณประชากรของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} หรือเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

^{3/} ND = ไม่ได้ทำการประเมิน

3. การทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} และธาตุซิลิกอนในสภาพโรงเรือน

การควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} (RS) ในโรงเรือนปลูกพืชที่สัปดาห์ที่ 8 หลังการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ 6 ใส่ RS+BS ร่วมกับใส่ โซเดียม ซิลิเกต มะเขือเทศมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูงสุด 88% รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 2 และ 3 (ใส่ RS+ซาลิซิก แอซิก และ RS+โซเดียม ซิลิเกต อย่างเดียว) ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย 77% กรรมวิธีที่ 4 และ 5 (ใส่ RS+BS และ RS+BS+ โซเดียม ซิลิเกต) มีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย 66% ขณะที่กรรมวิธีเปรียบเทียบ (ใส่ RS + น้ำ) มีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย 11% (ตารางที่ 5) ส่วนปริมาณผลผลิตมะเขือเทศพบว่ากรรมวิธีที่ 6 (ใส่ RS+BS + โซเดียม ซิลิเกต) มีปริมาณผลผลิตมะเขือเทศสูงสุดคือ 240 กรัมต่อดัน รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 4 (ใส่ RS+BS) มีผลผลิต 200 กรัมต่อดัน กรรมวิธีที่ 5, 2 และ 3 มีปริมาณผลผลิต 180, 150 และ 110 กรัมต่อดันตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีเปรียบเทียบที่มีปริมาณ 10 กรัมต่อดัน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

การศึกษาจำนวนประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} จากดินบริเวณรากมะเขือเทศ โดยปลูกเชื้อมีความเข้มข้นเท่ากับ $8.87 \log \text{CFU/ml}$ ลงดิน เมื่อนำดินมาวิเคราะห์ปริมาณประชากรของเชื้อ RS โดยวิธี dilution plate method บนอาหาร mSM-1 ที่สัปดาห์ที่ 8 พบว่ากรรมวิธีที่ 1 RS+น้ำ มีปริมาณเชื้อมากที่สุด $2.75 \log \text{CFU/g}$ รองลงมา กรรมวิธี 2 (ใส่ RS+ซาลิซิก แอซิก) กรรมวิธีที่ 3 (ใส่ RS+โซเดียม ซิลิเกต) โดยทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 2.68 และ $2.67 \log \text{CFU/g}$ ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ 4 (ใส่ RS+BS) กรรมวิธีที่ 5 (ใส่ RS+ซาลิซิก แอซิก+BS) กรรมวิธีที่ 6 (RS+ใส่โซเดียม ซิลิเกต+BS) มีปริมาณเชื้อ RS ต่ำสุดคือ 2.39 , 2.37 และ $2.36 \log \text{CFU/g}$ ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

การศึกษาจำนวนประชากรของเชื้อ แบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} จากดินบริเวณรากมะเขือเทศ โดยปลูกเชื้อมีความเข้มข้นเท่ากับ $76.86 \log \text{CFU/ml}$ ลงดิน เมื่อนำดินมาวิเคราะห์ปริมาณประชากรของเชื้อ BS ในดินปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่สัปดาห์ที่ 8 โดยวิธี dilution plate method บนอาหาร NGA ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 ppm. พบว่ากรรมวิธีที่ 6 RS+ผงเชื้อ BS + โซเดียมซิลิเกต มีปริมาณเชื้อ BS มากที่สุด คือ $8.09 \log \text{CFU/g}$ รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 5 RS+ผงเชื้อ BS +ซาลิซิก แอซิกและกรรมวิธีที่ 4 RS+ผงเชื้อ BS คือ 8.06

และ 8.00 logCFU/g ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ 1 RS+น้ำ (เปรียบเทียบ), 2 .RS+ซาลิซิก แอซิก และ 3 RS+โซเดียม ซลิเคตนั้นไม่ได้ทำการประเมินเพราะไม่ได้ใส่เชื้อ BS (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ปริมาณผลผลิตและเปอร์เซ็นต์การรอดตายของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และจำนวนประชากรของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} (RS) และ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} (BS) ในมะเขือเทศและบริเวณรากของมะเขือเทศหลังจากปลูกเชื้อได้ 8 สัปดาห์ที่สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย จังหวัดปทุมธานี

กรรมวิธี ^{1/}	ประชากรเชื้อ <i>R.solanacearu</i> สายพันธุ์ To-Ud3 ^{Am}		ประชากรเชื้อ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CH4 ^{Am} (logCFU/g)		% รอดตาย มะเขือเทศ ^{2/}	ผลผลิต ^{3/} (กรัม/ต้น)
	(logCFU/g)					
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 8		
	ที่ 1	ที่ 8	ที่ 1	ที่ 8		
1.RS+น้ำ (เปรียบเทียบกับ)	5.83 ^{4/} a	2.75 a	ND ^{5/}	ND	11 d	10 d
2.RS+ซาลิซิก แอซิก	5.65 b	2.68 a	ND	ND	77 b	150 bc
3.RS+โซเดียม ซิลิเกต	5.68 b	2.67 a	ND	ND	77 b	110 c
4.RS+ผงเชื้อ BS	5.39 c	2.39 b	5.99 c	8.00 c	66 c	200 ab
5.RS+ผงเชื้อ BS+ซาลิซิก แอซิก	5.44 c	2.37 b	6.03 b	8.06 b	66 c	180 ab
6.RS+ผงเชื้อ BS+ โซเดียมซิลิเกต	5.43 c	2.36 b	6.05 a	8.09 a	88 a	240 a

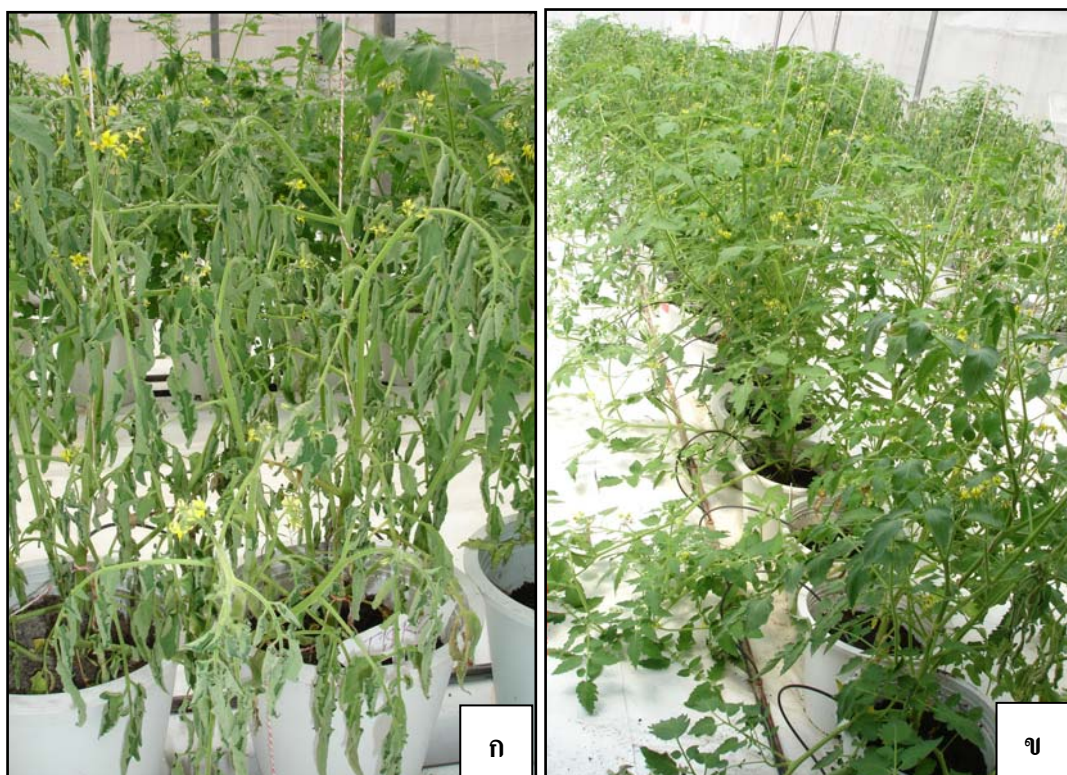
^{1/} ซาลิซิก แอซิก = ความเข้มข้น 9 mM หรือ 2.66 กรัม ปริมาตร 100 มล/ต้น, โซเดียมซิลิเกต = ความเข้มข้น 9 mM หรือ 0.26 กรัม ปริมาตร 100 มล/ต้น, BS = ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} สูตรที่ 1 BS+ทลคัม+รำข้าว (ช่อทิพย์, 2538) จำนวน 30 กรัม/ต้น, RS = เชื้อปริมาณเริ่มต้น 8 logCFU/ml ปริมาตร 300 มิลลิลิตร/ต้น

^{2/} เปอร์เซ็นต์การรอดตายของมะเขือเทศ = $\frac{\text{จำนวนต้นที่รอดตาย}}{\text{จำนวนต้นทดสอบทั้งหมด}} \times 100$

^{3/} ผลผลิตมะเขือเทศจากการเก็บเกี่ยวครั้งเดียวหลังจากปลูกเชื้อ 8 สัปดาห์, ต้นมะเขือเทศปกติให้ผลผลิต 120 กรัม/ต้น

^{4/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวดังแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

^{5/} ND = ไม่ได้นำมาทำการประเมิน



ภาพที่ 5 ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทาลคัม+รำข้าว (ช่อทิพย์, 2538) ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศสีดาทิพย์ 3 หลังการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ในโรงเรือนที่สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย จังหวัดปทุมธานี โดยกรรมวิธีควบคุม (ก) ต้นมะเขือเทศแสดงอาการเหี่ยวและต้นมะเขือเทศที่ใช้ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทาลคัม+ รำข้าว (ข)

วิจารณ์

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4 ที่มีในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ภาควิชาโรคพืช ในการยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} โดยวิธี paper disc diffusion บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} และจากนั้นก็นำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 มาติดฉลากด้วย ampicillin ความเข้มข้น 100 ppm หลังจากติดฉลากก็นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} อีกครั้งซึ่งพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะยังคงมีประสิทธิภาพเหมือนกับที่ยังไม่ติดฉลากและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่เจริญบนอาหาร NGA ก่อนและหลังติดฉลากยังมีลักษณะเหมือนเดิม (ไม่ได้แสดงข้อมูล) และหลังจากติดฉลากเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} เป็นเวลา 3 ปี ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} เหมือนเดิม (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

การตรวจหาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ที่นำกลับคืนมา (recovery) หลังจากใส่ในดินและน้ำ พบว่าจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นคือ 8.74 logCFU/ml เมื่อใส่เชื้อลงไปบนน้ำและดินที่อยู่ในหลอดทดลองขนาด 9 มิลลิลิตร พบว่าเชื้อมีปริมาณลดลงโดยในน้ำมีปริมาณเชื้อ 6.61 logCFU/ml ส่วนในดินมีปริมาณเชื้อ 6.57 logCFU/g ซึ่งในดินจะมีปริมาณการนำกลับคืนมาของเชื้อได้น้อยกว่าในน้ำ เช่นเดียวกับกับเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} พบว่าจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นคือ 8.90 logCFU/ml เมื่อเติมลงไปบนน้ำและดิน เชื้อมีปริมาณลดลงโดยในน้ำ มีปริมาณเชื้อ 5.38 logCFU/ml ส่วนในดิน มีปริมาณเชื้อ 4.91 logCFU/g แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียถูกดูดซับไว้ในดินได้มากกว่าในน้ำ สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* มีบางช่วงของการเจริญที่ไม่สามารถนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Viable But Nonculturable State, VBNC) ซึ่ง Brian and Steck (2001) พบว่าในเมล็ดมะเขือเทศที่มีเชื้อแบคทีเรียเข้าทำลายอยู่ แต่เมื่อนำมาเมล็ดมะเขือเทศไปปลูกในดินที่ปลอดเชื้อและนำมาตรวจสอบหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ซึ่งไม่พบการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นทำการทดลองในโรงเรือนปลูกพืชหรือในแปลงปลูกพืช เมื่อใส่เชื้อแบคทีเรียลงไปบนดินและนำกลับมามาตรวจนับหาจำนวนประชากรจะได้จำนวนประชากรเชื้อน้อยกว่าเดิมก็อาจเป็นไปได้ หรือเมื่อสุ่มตรวจแปลงปลูกก่อนการทดลองหรือแปลงของเกษตรกร ถ้าตรวจแล้วไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* เป็นไป

ได้ว่าอาจจะมีเชื้อ *R. solanacearum* อยู่ในแปลงแต่เชื้ออยู่ในระยะ VBNC ดังนั้นอาจจำเป็นต้องทำ bioassay โดยการปลูกพืชอาศัยของเชื้อลงไปในดินเพื่อทดสอบการเกิดโรคก่อนปลูกพืชจริงในดินแปลงนั้น

การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 10 สูตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.2 O.D. ที่ช่วงคลื่นแสง 600 นาโนเมตร (8 logCFU/ml) โดยใช้อาหาร MY ซึ่งเป็นอาหารสูตรที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพดีใช้เป็นสูตรเปรียบเทียบ (ช่อทิพย์, 2538) พบว่าอาหารสูตรกากน้ำตาล 1%+เปปโตน 0.5% มีปริมาณเชื้อมากที่สุดคือ 13.39 logCFU/ml รองลงมาได้แก่อาหารสูตรน้ำมะพร้าว 1%+เปปโตน 0.5% (13.35 logCFU/ml), น้ำแข็งข้าวเจ้า 1%+เปปโตน 0.5% (13.27 logCFU/ml), กากน้ำตาล 1% (13.17 logCFU/ml) และ MY (13.16 logCFU/ml) ตามลำดับ ซึ่งมีอาหารทั้งหมด 4 สูตรที่มีปริมาณประชากรมากกว่าอาหารเปรียบเทียบ (MY) อาจเนื่องมาจากในกากน้ำตาลและน้ำมะพร้าวมีธาตุอาหารสูงเพียงพอต่อความต้องการของแบคทีเรียในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน อีกทั้งเปปโตนเป็นสารอาหารสังเคราะห์ที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ทันที และ Dhampuse (2003) กล่าวว่าในกากน้ำตาลมีธาตุอาหารสูง เช่น แคลเซียม, เหล็ก และฟอสฟอรัส ส่วน Ohler (1999) พบว่า *B. subtilis* สามารถเจริญได้เร็วในอาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำมะพร้าว เพราะในน้ำมะพร้าวมีคาร์โบไฮเดรตและธาตุอาหารสูงซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Amaram (2006) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ที่มีน้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบมีจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียมากกว่าอาหารที่ไม่มีน้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบ โดยหลังเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวผสมกับแป้งข้าวโพด 1% มีจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เท่ากับ 50×10^7 CFU/ml และสูตรอาหารที่ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวผสมกับกากน้ำตาลมีจำนวนประชากร 45×10^7 CFU/ml แต่การทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อของช่อทิพย์ (2538) พบว่าอาหาร MY เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. เนื่องจากให้จำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ NK-T03 และ CH6 ในปริมาณสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร NGB เช่นเดียวกับสุพจน์ (2545) ที่พบว่าอาหาร LB ให้อัตราการเจริญของเชื้อ *B. firmus* สายพันธุ์ KPS 44 และ 46 ได้ดีกว่าอาหาร MY ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถึงแม้จะเป็นเชื้อแบคทีเรียสกุลเดียวกันแต่สายพันธุ์ต่างกัน ความสามารถในการเจริญในอาหารชนิดเดียวกันก็แตกต่างกันและในการศึกษารุ่นนี้ส่วนประกอบในอาหารที่ต้องการศึกษาแต่ละสูตรนั้นเป็นส่วนประกอบที่หาง่ายและเพื่อศึกษาสูตรอาหารที่สามารถทดแทนสูตรอาหารเดิมที่ใช้อยู่ (MY) เพื่อลดต้นทุนในการผลิตสูตร

สำเร็จเพื่อแจกให้เกษตรกร นอกจากนี้ในระดับห้องปฏิบัติการนี้มีอาหารให้เลือกใช้หลายชนิดที่สามารถนำมาทดแทนอาหาร MY ได้ เช่น อาหารสูตรกากน้ำตาล 1%+เปปโตน 0.5% , น้ำมะพร้าว 1%+เปปโตน 0.5%, น้ำแป้งข้าวเจ้า 1%+เปปโตน 0.5% และกากน้ำตาล 1% แต่ควรทำการศึกษาเปรียบเทียบกากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ น้ำมะพร้าวแต่ละพันธุ์หรือช่วงอายุของมะพร้าวว่ามีความแตกต่างกันต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์หรือไม่ ส่วนเกษตรกรหรือชาวบ้านทั่วไปนั้นสามารถนำสูตรกากน้ำตาล 1% ไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ โดยให้ปริมาณเชื้อไม่แตกต่างจากการใช้อาหาร MY หรือการใช้น้ำมะพร้าว 1%+น้ำแป้งข้าวเจ้า 1%, กากน้ำตาล 1%+น้ำแป้งข้าวเจ้า 1%, กากน้ำตาล 1%+น้ำมะพร้าว 1%, น้ำแป้งข้าวเจ้า 1% และน้ำมะพร้าว 1% ก็สามารถทดแทนได้ถึงแม้ว่าจำนวนประชากรน้อยกว่าอาหาร MY แต่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก็สามารถที่จะเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกัน แต่ในการทดลองครั้งนี้เลือกอาหาร MY ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ก็เพราะต้องการให้ได้มาตรฐาน อย่างไรก็ตามสำหรับผู้สนใจที่จะศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อ ควรมีการศึกษากากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ ศึกษาพันธุ์และอายุของมะพร้าวรวมทั้งแป้งข้าวเจ้าพันธุ์ต่างๆหรือจากบริษัทที่ผลิตต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบผลที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อโรคหรือไม่ต่อไป

เปอร์เซ็นต์การเพิ่มประชากรของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในอาหารที่ศึกษาจำนวน 10 สูตร พบว่า อาหารสูตรน้ำมะพร้าว 1%+เปปโตน 0.5% มีการเพิ่มของจำนวนประชากรของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} มากที่สุดคือ 61.87% รองลงมาได้แก่ น้ำมะพร้าว 1% (60.80%), กากน้ำตาล 1%+เปปโตน 0.5% (60.71%), กากน้ำตาล 1% (60.51%), MY (60.48%) ตามลำดับ ซึ่งอาหารที่มีจำนวนประชากรสูงสุดคือสูตรกากน้ำตาล 1% + เปปโตน 0.5% (13.39 logCFU/ml) แต่เปอร์เซ็นต์การเพิ่มประชากรไม่ได้สูงสุด ขณะที่อาหารสูตรน้ำมะพร้าว 1% ที่มีจำนวนประชากรต่ำ (12.86 logCFU/ml) แต่มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มประชากรสูง (60.80%) เป็นอันดับที่ 2 รองจากอาหารสูตรน้ำมะพร้าว 1%+เปปโตน 0.5% ส่วนอาหาร MY และกากน้ำตาล 1% ถึงแม้จะมีจำนวนประชากรมากกว่าอาหารสูตรน้ำมะพร้าว 1% แต่เปอร์เซ็นต์การเพิ่มประชากรต่ำกว่า ดังนั้นอาหารที่ให้เปอร์เซ็นต์การเพิ่มของประชากรสูงจึงน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อไป เช่น อาหารสูตรน้ำมะพร้าว 1%+เปปโตน 0.5% สำหรับระดับห้องปฏิบัติการ ควรศึกษาถึงอายุและพันธุ์ของมะพร้าวถึงผลที่มีต่อการเพิ่มจำนวนประชากรว่าแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร และอาหารสูตรน้ำมะพร้าว 1% เหมาะสำหรับเกษตรกรหรือประชาชนทั่วไปที่ต้องการลดต้นทุนในการผลิตแต่ยังคงประสิทธิภาพใกล้เคียงกับอาหาร MY ซึ่งมีราคาแพง

การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดต่างๆในการผลิตสารเมตาโบไลต์ หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นตกตะกอนเพื่อแยกเซลล์ของแบคทีเรียออกและฆ่าเซลล์ที่เหลือด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วนำสารกรองมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *R.solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} โดยวิธี paper disc diffusion พบว่าในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว1%+น้ำแป้งข้าวเจ้า 1%ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (clear zone) มากที่สุดคือ 0.82 ซม รองลงมาได้แก่ สูตรกากน้ำตาล1% (0.80 ซม), น้ำแป้งข้าวเจ้า 1%+เปปโตน0.5% (0.79), MY (0.78 ซม) และกากน้ำตาล1%+น้ำมะพร้าว1% (0.77 ซม) ในขณะที่สุพจน์ (2545) พบว่าอาหาร MY สามารถกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. firmus* สายพันธุ์ KPS 44 และ 46 สร้างสาร secondary metabolite ออกมาได้รวดเร็วและมีปริมาณที่สูงกว่าการเลี้ยงในอาหาร NGB ที่เวลา 96 ชั่วโมง และประจวบ (2548) พบว่าอาหาร NBG ที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ NA 1 และ SU1 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 และ CH6 นั้นในแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งเชื้อ *R.solanacearum* มากที่สุดที่เวลา 72 ชั่วโมง แต่การทดลองนี้พบว่ามีสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *R.solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ที่ดี 4 อันดับเมื่อเปรียบเทียบกับสูตร MY ดังนั้นจึงสามารถใช้อาหารทั้ง 4 สูตรทดแทนการใช้อาหาร MY ได้ แต่ถ้าคำนึงถึงจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์นั้นอาหารสูตรน้ำแป้งข้าวเจ้า1%+เปปโตน0.5% และกากน้ำตาล1% เป็นสูตรที่ให้จำนวนประชากรและประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีโดยเฉพาะกากน้ำตาล 1% ที่เกษตรกรหรือบุคคลทั่วไปหาซื้อได้ง่ายรวมทั้งมีราคาถูกกว่ามากเมื่อเทียบกับอาหาร MY ส่วนอาหารสูตรน้ำแป้งข้าวเจ้า1%+เปปโตน0.5% เป็นสูตรที่น่าสนใจในระดับห้องปฏิบัติการแต่ควรมีการศึกษาถึงแหล่งที่มาที่แตกต่างกันของแป้งข้าวเจ้าในเรื่องของพันธุ์ข้าวและบริษัทที่ผลิตว่ามีผลในการยับยั้งเชื้อ *R.solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} แตกต่างกันหรือไม่อย่างไร ดังนั้นการเลือกอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จะเปรียบเทียบในส่วนของปริมาณให้มากอย่างเดียวไม่ได้ต้องเปรียบเทียบทั้งการเจริญเติบโตของประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เปอร์เซ็นต์การเพิ่มของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชในอาหารแต่ละสูตร เพื่อคัดเลือกอาหารสูตรใหม่ที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับอาหารสูตรเดิม (MY)

จากการทดลองการศึกษาความมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในสูตรสำเร็จชนิดต่างๆ หลังจากเก็บรักษามาเป็นเวลา 6 เดือนโดยใช้สูตรสำเร็จที่ 1 BS+ ทัลคัม+รำข้าว (ช่อทิพย์, 2538) เป็นสูตรเปรียบเทียบมีปริมาณการรอดชีวิต 0.90 logCFU/g รองลงมาได้แก่สูตรสำเร็จที่ 6 BS+ปลายข้าว มีปริมาณการรอดชีวิต 0.89 logCFU/g ซึ่งผลการ

ทดลองสอดคล้องกับช่อทิพย์ (2538) ที่ศึกษาการผลิตส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียแอนทาโกนิสต์ในรูปผง พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ NK-TO3 และสายพันธุ์ CH6 สามารถปรับตัวได้ดีในส่วนผสมผงเชื้อที่ไคอะตอมไมท์เป็นสารพา ส่วนเชื้อ fluorescent pseudomonads สายพันธุ์ F2 ปรับตัวได้ดีที่สุดในส่วนผสมเชื้อที่ใช้ทลคัมเป็นสารพาและพบว่าเมื่อผสมรำข้าวเข้าไปจะช่วยส่งเสริมให้มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียแอนทาโกนิสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์เพิ่มขึ้นสูงสุดโดยอัตราส่วนในการผสมคือ เชื้อ:รำข้าว:สารพา เท่ากับ 1:2:2 (โดยน้ำหนัก) และสอดคล้องกับประจวบ (2548) ศึกษาประสิทธิภาพของสารตัวพาในส่วนผสมของผงเชื้อแบคทีเรียปฏิภัยจำนวน 22 ตัวพาในแบคทีเรียปฏิภัย 4 สายพันธุ์คือ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ NA 1 และ SU1 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 และ CH6 และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็น ซึ่งพบว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องจำนวนประชากรเชื้อแบคทีเรียลดลงอย่างรวดเร็ว หลังจากการเก็บผงเชื้อเป็นเวลา 1 ปี สารตัวพาที่มีลำดับการมีชีวิตรอดทั้งในสภาพการเก็บในอุณหภูมิห้องและในตู้เย็นสูงสุดคือ สารตัวพาทลคัม รองลงมาได้แก่ สารตัวพาไคอะตอมไมท์ ส่วน Julianio and Bechtel (1985) รายงานว่าในเมล็ดข้าวมีธาตุอาหารต่างๆมากมายซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี เช่น คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน, แคลเซียม, ธาตุเหล็ก, แมกนีเซียม, สังกะสี, ไทมีน บี1 (Thiamine, B1), ไรโบฟลาวิน บี 2 (Riboflavin, B2) และอะไมโลส (Amylose) เป็นต้น Amran (2006) พบว่าในสูตรสำเร็จของ *B. subtilis* ที่มีแป้งที่ทำมาจากข้าวมีจำนวนประชากรของเชื้อ *B. subtilis* มากกว่าใช้แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวโพดแต่น้อยกว่าที่ใช้ Talc แต่เนื่องจากในประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการปลูกข้าวเป็นพื้นที่มาก หลากหลายพันธุ์จึงควรศึกษาเปรียบเทียบพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์และเปรียบเทียบระหว่างการใช้แป้งที่ทำมาจากข้าว เช่น แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว เปรียบเทียบกับข้าวที่ยังไม่ผ่านการแปรรูป แต่เมื่อเปรียบเทียบทางด้านต้นทุนการผลิตของสูตรสำเร็จระหว่างสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทลคัม+รำข้าว และสูตรสำเร็จที่ 6 BS+ปลายข้าว ในสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทลคัม+รำข้าว มีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าซึ่ง ทลคัม ราคา กิโลกรัมละ 7.2 บาท (ร้านเรซินพลัส นนทบุรี) และรำข้าวราคา กิโลกรัมละ 9 บาท (กระทรวงพาณิชย์) ส่วนปลายข้าวราคา กิโลกรัมละ 25-30 บาท (ร้านอาลีในตลาดสดอมรพันธ์ บางเขน) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกันแล้วสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทลคัม+รำข้าว มีราคาถูกกว่าสูตรสำเร็จที่ 6 BS+ปลายข้าว ประมาณ 9-14 บาท จึงเลือกสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทลคัม+รำข้าว มาใช้ในทดลองในโรงเรือน ส่วนสูตรสำเร็จที่ 6 BS+ปลายข้าว เหมาะกับช่วงที่ข้าวในประเทศมีราคาตกต่ำเพื่อลดต้นทุนการผลิต

การหาเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียปฏิภัย *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในสูตรสำเร็จทั้ง 6 สูตร หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ ทลคัม+ รำข้าว มี

เปอร์เซ็นต์การลดลงของจำนวนประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์น้อยที่สุด คือ 38.36% รองลงมา ได้แก่สูตรสำเร็จที่ 6 BS+ปลายข้าว 39.38% ซึ่งสอดคล้องกับ ช่อทิพย์ (2538) ที่พบว่าการใช้รำข้าวเป็นส่วนประกอบของสูตรสำเร็จนั้นทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH6 อยู่รอดได้นานขึ้น และ Juliano and Bechtel (1985) รายงานว่าในเมล็ดข้าวมีธาตุอาหารต่างๆ มากมายซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี เช่น คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน, แคลเซียม, ธาตุเหล็ก, แมกนีเซียม, สังกะสี, ไทมีน บี1 (Thiamine, B1), ไรโบฟลาวิน บี 2 (Riboflavin, B2) และอะไมโลส (Amylose) เป็นต้น ซึ่งในสูตรสำเร็จ BS+ปลายข้าว เป็นสูตรที่น่าสนใจซึ่งต้องนำไปศึกษาเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวแต่ละชนิดถึงการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เพื่อศึกษาว่าข้าวพันธุ์ไหนที่จะให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่รอดได้นานขึ้นและยังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *R.solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} หรือสายพันธุ์อื่นๆ

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จทั้ง 6 สูตรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R.solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสูตรสำเร็จที่ 1 BS+พัลลัม+รำข้าว สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีความกว้างบริเวณยับยั้ง (clear zone) เท่ากับ 0.90 ซม รองลงมาได้แก่ สูตรสำเร็จที่ 6 BS+ปลายข้าว (0.89 ซม) และสูตรสำเร็จที่ 5 BS+สาकुดิบ+รำข้าว (0.80 ซม) ซึ่งสัมพันธ์กับการมีชีวิตรอดของเชื้อในสูตรสำเร็จที่ 1 BS+พัลลัม+รำข้าว โดยมีปริมาณประชากรของเชื้อรอดชีวิตมากที่สุดและมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของประชากรน้อยที่สุด เช่นเดียวกับสูตรสำเร็จที่ 6 BS+ปลายข้าว ที่มีความกว้างบริเวณยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การลดลงของจำนวนประชากรและยังมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของการยับยั้งไม่ต่างกัน ดังนั้นสูตรสำเร็จที่ 6 BS+ปลายข้าว จึงเป็นสูตรที่สามารถทดแทนสูตรสำเร็จที่ 1 BS+พัลลัม+รำข้าว ที่เป็นสูตรของช่อทิพย์ (2538) ที่พัฒนาขึ้นมา

เปอร์เซ็นต์การลดลงของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในสูตรสำเร็จทั้ง 6 สูตร ในการยับยั้งเชื้อ *R.solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสูตรสำเร็จที่ 5 BS+สาकुดิบ+รำข้าว มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลงน้อยที่สุดคือ 30% รองลงมาได้แก่ สูตรสำเร็จที่ 6 BS+ปลายข้าว (39%) และสูตรสำเร็จที่ 1 BS+พัลลัม+รำข้าว (40%) ถึงแม้สูตรสำเร็จที่ 5 BS+สาकुดิบ+รำข้าว มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียมากถึง 42.15% แต่มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของการยับยั้งน้อยที่สุดในขณะที่สูตรสำเร็จที่ 1 BS+พัลลัม+รำข้าว และสูตรสำเร็จที่ 6 BS+ปลายข้าว มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรียต่ำที่สุดแต่มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของการยับยั้งน้อยกว่าสูตรสำเร็จที่ 5 BS+สาकुดิบ+รำข้าว แต่ในสูตรสำเร็จที่

2 BS+ข้าวฟ่างหนึ่ง สูตรสำเร็จที่ 3 BS+ข้าวฟ่างหนึ่ง+รำข้าว และสูตรสำเร็จที่ 4 BS+สาธูป
 เปอร์เซ็นต์การลดลงของประชากรและเปอร์เซ็นต์การลดลงของการยับยั้งสัมพันธ์กัน โดยมี
 เปอร์เซ็นต์การลดลงของประชากรมาก เปอร์เซ็นต์การลดลงของการยับยั้งก็ลดลงมากเช่นกัน และ
 ในสูตรสำเร็จที่มีรำข้าวเป็นประกอบให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของการยับยั้งน้อยกว่าสูตรสำเร็จที่
 ไม่ได้ผสมรำข้าว เช่นเดียวกับการอยู่รอดของจำนวนประชากร สูตรสำเร็จที่ผสมรำข้าวนั้นมี
 เปอร์เซ็นต์การลดลงของประชากรน้อยกว่าที่ไม่ได้ผสม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของช่อทิพย์
 (2538) พบว่าการใช้รำข้าวเป็นส่วนประกอบของสูตรสำเร็จนั้นทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ *B.*
subtilis สายพันธุ์ CH6 อยู่รอดได้นานขึ้นดังนั้นควรจะมีการศึกษาสูตรสำเร็จที่ 6 BS+ปลายข้าว ที่
 ผสมรำข้าว ซึ่งอาจให้ประสิทธิภาพดีกว่าสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทลคัม+รำข้าว ก็อาจเป็นไปได้
 เนื่องจากว่าสูตรสำเร็จที่ 6 BS+ปลายข้าว ที่ยังไม่ได้ผสมรำข้าวมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกับสูตร
 สำเร็จที่ 1 BS+ทลคัม+รำข้าว ทั้งในส่วนของจำนวนประชากรที่อยู่รอด เปอร์เซ็นต์การลดลงของ
 จำนวนประชากร ความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญและเปอร์เซ็นต์การลดลงของการยับยั้ง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทลคัม+รำข้าว ของช่อทิพย์
 (2538) ซึ่งเป็นสูตรที่มีจำนวนประชากรที่อยู่รอดสูงสุดและความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญ
 สูงสุด และมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของจำนวนประชากร เปอร์เซ็นต์ลดลงของการยับยั้งนั้นมี
 ประสิทธิภาพดี มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรีย *R.*
solanacearum สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ห้างปฏิบัติการเป็นเวลา 9 วัน พบว่าในกรรมวิธีที่ 7 ใส่ผงเชื้อ
 BS 3 กรัม+RS มีจำนวนประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} น้อยที่สุด คือ 6.01
 logCFU/g รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ 6 ใส่ผงเชื้อ BS 2 กรัม+RS (6.11 logCFU/g) ซึ่งกรรมวิธีที่ 1
 (ควบคุม) ใส่ RS อย่างเดียว มีเชื้อปริมาณมากที่สุดคือ 6.68 logCFU/g แสดงว่าถ้ามีเชื้อ *R.*
solanacearum สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ในดินอย่างเดียวนั้นจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นและเมื่อเติมผงเชื้อ BS
 ลงไปเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} จะมีจำนวนลดลงและจะลดลงมากยิ่งขึ้นถ้ามีการ
 เติมเชื้อ BS เพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อต้องการควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ในดิน
 จำเป็นต้องหาอัตราส่วนทั้งในห้องปฏิบัติการและในแปลงเกษตรกร ซึ่งอัตราส่วนที่เหมาะสมใน
 ห้องปฏิบัติการคือ การใช้ผงเชื้อสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทลคัม+รำข้าว จำนวน 3 กรัม โดยเชื้อ *R.*
solanacearum สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 logCFU/ml ส่วนสูตรสำเร็จสูตรอื่น
 ไม่ได้ทำการทดลอง ควรจะมีการทดลองประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์
 To-Ud3^{Am} ในห้องปฏิบัติการก่อนที่จะนำไปทดสอบในระดับโรงเรือน โดยเฉพาะสูตรสำเร็จที่ 6
 BS+ปลายข้าว ที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสูตรสำเร็จที่ 1 BS+ทลคัม+รำข้าว

การศึกษาการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} พบว่าผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} เมื่อใช้ร่วมกับโซเดียมซิลิเกต โดยการฉีดพ่นทางใบของต้นมะเขือเทศ สามารถยับยั้งโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ดีและมีปริมาณผลผลิตสูง โดยทำให้มีปริมาณเชื้อสาเหตุโรค *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ในดินลดลงเหลือปริมาณน้อยที่สุด คือ 2.36 log CFU/g ในการใช้ซิลิกอนในรูปแบบต่างกัน คือ ในรูปของชาลิซิก แอซิก ให้ผลแตกต่างกัน อาจจะเป็น เพราะว่าการฉีดพ่นทางใบของต้นมะเขือเทศสามารถนำไปใช้ได้เร็วกว่าอีกทั้งชาลิซิก แอซิกเป็นผง เมื่อนำมาละลายน้ำก่อนใช้ มีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อยโดยจะค่อยๆละลายออกมา ดังนั้นการใช้ราดโคนต้นมะเขือเทศนั้น ชาลิซิก แอซิกจะใช้เวลานานในการละลายออกมา จึงอาจจะไม่เพียงพอต่อความต้องการของมะเขือเทศที่จะนำไปใช้ในการเพิ่มความแข็งแรงหรือกระตุ้นความต้านทานโรคได้ ทุกกรรมวิธีการทดลองที่มีการใส่ซิลิกอนทั้งในรูปของชาลิซิก แอซิกและโซเดียม ซิลิเกตหรือผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในครั้งนี้ให้ผลผลิตมะเขือเทศมากขึ้นเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (น้ำ) เพราะว่าซิลิกอนช่วยกระตุ้นให้มะเขือเทศต้านทานต่อเชื้อโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ซึ่งสอดคล้องกับ Dannon and Wydra (2004) รายงานว่าธาตุซิลิกอนสามารถกระตุ้นให้มะเขือเทศมีความต้านทานต่อเชื้อ *R. solanacearum* โดยทำให้เกิดโรคเหี่ยวช้าลงเป็นเวลา 13 วันหลังปลูกเชื้อ สำหรับการใส่ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} นั้นสามารถลดจำนวนเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} จากการศึกษาของ อรุณจก (2535) พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิดที่ทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA เช่น *Pseudomonas solanacearum* (*R. solanacearum*), *Agrobacterium tumefaciens* และ *Xanthomonas campestris* pv *campestris* เป็นต้น และประจวบ (2547) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ได้ โดยกลไกการสร้างสารปฏิชีวนะมายับยั้งเชื้อโรค การเจริญครอบครองรากพืชและส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อมะเขือเทศได้ นอกจากนี้ เสาวรส (2549) พบว่า การพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 ลงในวัสดุปลูกที่มีเชื้อโรคอัตรา 20 มิลลิลิตร/กระถาง หลังย้ายกล้าปลูก 3 วัน มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายถึง 68.75-81.25 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในกรรมวิธีที่ใส่ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตายและมีผลผลิตมากกว่ากรรมวิธีควบคุม (น้ำ) และเมื่อมีการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ร่วมกับซิลิกอน จะส่งเสริมให้ต้นมะเขือเทศต้านทานต่อเชื้อโรคเหี่ยวและลดจำนวนประชากรของเชื้อโรคเหี่ยวได้ ทำให้มะเขือเทศมีต้นรอดตายสูงและให้ผลผลิตต่อต้นมาก โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ใช้ซิลิกอนในรูปของโซเดียม ซิลิเกต ร่วมกับการใส่ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ วาสนา (2548) ที่มีการใช้ธาตุซิลิกอนร่วมกับการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินและโรครากเน่าของมะเขือเทศจากเชื้อรา *Pythium*

aphanidermatum พบว่าการใช้ซิลิคอนผสมในวัสดุปลูก 1 กรัม/วัสดุปลูก (พีท) 1 กิโลกรัม กรรมวิธีที่ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ร่วมกับซิลิคอนช่วยให้ต้นมะเขือเทศมีความสูงมากกว่ากรรมวิธีควบคุมและรากของมะเขือเทศมีความสมบูรณ์และมีรากจำนวนมากกว่ากรรมวิธีควบคุมแต่ไม่มีผลต่อการการเพิ่มหรือลดปริมาณเชื้อรา *P. aphanidermatum* และพบว่าที่ใช้เชื้อรา *T.harzianum*, *T. virens* หรือสารเคมีเมทาแลกซิล ช่วยให้มียอดตายสูงกว่ากรรมวิธีที่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* เมื่อใช้ร่วมกับซิลิคอนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการศึกษาของ Woolley (1957) เมื่อเติมซิลิคอนที่ความเข้มข้น 3 ไมโครโมลในรูปของ K_2SiO_3 ต่อลิตร ในสารละลายที่ใช้ปลูกมะเขือเทศ โดยไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของผลผลิต ซึ่งแตกต่างจากผลการวิจัยครั้งนี้ที่พบว่าการใช้ธาตุซิลิคอนในรูปของโซเดียมซิลิเคตรวมกับการใช้ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} นั้นมีผลต่อการเพิ่มผลผลิต, จำนวนต้นที่รอดตายของมะเขือเทศโดยตรงและการลดปริมาณประชากรของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ซึ่งการทดลองครั้งนี้พบว่าธาตุซิลิคอนไม่ได้ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} บนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่จะไปกระตุ้นให้มะเขือเทศเกิดความต้านทานโรค สอดคล้องกับ Fawe *et al.* (1998) ศึกษาผลของซิลิคอนที่ช่วยในการสะสมสาร flavanoid phytoalexin ในแดง ซึ่งสารนี้ช่วยเพิ่มความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างของแดงได้ และ Diogo and Wydra (2007) พบว่าซิลิคอนช่วยเพิ่มความต้านทานให้มะเขือเทศต่อเชื้อ *R. solanacearum* โดยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pectic polysaccharide ภายในท่อลำเลียงน้ำของต้นมะเขือเทศ และในต้นมะเขือเทศที่มีการใส่ซิลิคอนจะสามารถต้านทานต่อเชื้อเชื้อ *R. solanacearum* ได้ดีกว่าต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ใส่ซิลิคอน ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ร่วมกับการใช้ซิลิคอนในรูปโซเดียมซิลิเคต ช่วยให้มะเขือเทศรอดตายและมีผลผลิตสูงกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีผลผลิตสูงกว่ามะเขือเทศต้นปกติ (120 กรัม/ต้น) ถึง 1 เท่าตัว ซึ่งการศึกษานี้เป็นการประยุกต์ใช้วิธีผสมผสานในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศเป็นครั้งแรกของการปลูกมะเขือเทศในโรงเรือนแบบการคำนวณถึงการเก็บเกี่ยวผลผลิตและมีแนวโน้มจะสามารถนำไปปฏิบัติได้จริงในแปลงทดลอง ซึ่งต้องทำการศึกษาและทดลองถึงรูปแบบและอัตราการใช้ที่เหมาะสมต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4 ในห้องปฏิบัติการในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} ได้ทั้งก่อนติดผลและหลังติดผลด้วยสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 100 ppm แล้วนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ติดผลแล้วไปการหาปริมาณเชื้อที่ได้กลับคืนมาของเชื้อแบคทีเรียเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} พบว่าเมื่อใส่เชื้อลงในน้ำและดินที่อยู่ในหลอดทดลองพบว่า ในดินการนำเชื้อกลับคืนมาได้น้อยกว่าในน้ำ ซึ่งในน้ำมีปริมาณเชื้อ 6.61 logCFU/ml และมีเปอร์เซ็นต์การนำกลับคืนมาเท่ากับ 75.64 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในดินมีปริมาณเชื้อ 6.57 logCFU/g มีเปอร์เซ็นต์การนำกลับคืนมาเท่ากับ 75.17 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ก็เช่นเดียวกัน การนำกลับคืนมาของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในดินนำกลับคืนมาได้น้อยกว่าในน้ำ โดยในน้ำมีปริมาณเชื้อ 5.38 logCFU/ml และมีเปอร์เซ็นต์การนำกลับคืนมาเท่ากับ 60.45 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในดินมีปริมาณเชื้อ 3.30 logCFU/g และมีเปอร์เซ็นต์การนำกลับคืนมาเท่ากับ 55.17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 10 สูตร พบว่าในสูตรกากน้ำตาล 1%+เปปโตเน 0.5% มีปริมาณเชื้อมากที่สุดคือ 13.39 logCFU/ml รองลงมาได้แก่สูตรน้ำมะพร้าว 1%+เปปโตเน 0.5% และน้อยที่สุดคือสูตรน้ำมะพร้าว 1% คือ 12.86 logCFU/ml เมื่อนำเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารเหล่านี้ไปทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดต่างๆ หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าในสูตรน้ำมะพร้าว 1% + น้ำแป้งข้าวเจ้า 1% ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งมากที่สุดคือ 0.82 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่สูตรกากน้ำตาล 1% (0.80 เซนติเมตร) และใกล้เคียงกับอาหาร Malt Yeast extract ที่ใช้เปรียบเทียบ (0.78 เซนติเมตร) ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการทดลองการศึกษามีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ในสูตรสำเร็จชนิดต่างๆ ซึ่งปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะเริ่มต้น คือ 9.42 logCFU/ml หลังจากเก็บรักษามาเป็นเวลา 6 เดือนสูตรสำเร็จ BS+ ทัลคัม+ รำข้าว มีประชากร 1.88 logCFU/g

และสูตรสำเร็จ BS+ปลายข้าว มีประชากร $1.87 \log\text{CFU/g}$ ซึ่งมีปริมาณการรอดชีวิตมากที่สุด ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการหาเปอร์เซ็นต์การลดลงของจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะพบว่า สูตรสำเร็จ BS+ ทัลคัม+ รำข้าว มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของประชากรน้อยที่สุด คือ 38.36 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่สูตรสำเร็จ BS+ปลายข้าว 39.38 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สูตรสำเร็จ BS+ ทัลคัม+ รำข้าว สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด (0.90 เซนติเมตร) และรองลงมาคือ สูตรสำเร็จ BS+ปลายข้าว 0.89 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและพบว่า สูตรสำเร็จ BS+สาเกดิบ+รำข้าว มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลงน้อยที่สุด คือ 30 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่สูตรสำเร็จ BS+ปลายข้าว (39 เปอร์เซ็นต์) และสูตรสำเร็จ BS+ ทัลคัม+ รำข้าว (40 เปอร์เซ็นต์) ที่เป็นสูตรเปรียบเทียบ

การทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อสูตรสำเร็จในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 9 วัน พบว่าในกรรมวิธีที่ 7 ใส่ผงเชื้อ BS 3 กรัม+RS) มีจำนวนประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} น้อยที่สุด คือ $6.01 \log\text{CFU/g}$ ส่วนปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} มากที่สุดคือ $6.68 \log\text{CFU/g}$

การควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 จากแบคทีเรีย *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} (RS) ในโรงเรือนปลูกพืชแบบการค้าที่สัปดาห์ที่ 8 หลังการทดลองพบว่า กรรมวิธีที่ใส่ผงเชื้อ BS ร่วมกับใส่โซเดียมซิลิเกต มะเขือเทศมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูงสุด 88% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และมีจำนวนประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} น้อยที่สุด ส่วนการศึกษาจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} จากดินบริเวณรากมะเขือเทศ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากรรมวิธีที่ใส่ผงเชื้อ BS ร่วมกับใส่โซเดียมซิลิเกต มีปริมาณเชื้อ BS มากที่สุด คือ $8.09 \log\text{CFU/g}$ รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ใส่ผงเชื้อ BS ร่วมกับชาลิซิก แอซิก ($8.06 \log\text{CFU/g}$) และกรรมวิธีที่ใส่ผงเชื้อ BS อย่างเดียว ($8.0 \log\text{CFU/g}$) ตามลำดับและยังให้ผลผลิตมะเขือเทศ 240 กรัมต่อต้นดีกว่าที่ไม่ได้ใส่ผงเชื้อซึ่งมีผลผลิตเพียง 120 กรัมต่อต้น

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณธ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4^{Am} ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนของประชากรของเชื้อแบคทีเรียและการสร้างสารเมตาโบไลต์ ควรจะมีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณธ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CH6 หรือเชื้อ *Bacillus* sp. ซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบและวิเคราะห์สารเมตาโบไลต์ที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อว่าเป็นสารอะไรรวมทั้งตรวจวัดปริมาณสารเมตาโบไลต์ที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เพื่อจะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณธ์ในการสร้างสารเมตาโบไลต์ และนำไปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณธ์ด้วย และควรมีการศึกษาเปรียบเทียบสูตรสำเร็จต่างๆ ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ในโรงเรือนโดยเปรียบเทียบกับสูตรสำเร็จของช่อทิพย์ เพื่อคัดเลือกสูตรสำเร็จที่สามารถทดแทนของช่อทิพย์ได้ ส่วนการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สายพันธุ์ To-Ud3^{Am} โดยใช้ผงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณธ์ร่วมกับซิลิคอนนั้นจะต้องทำการศึกษาถึงกลไกของซิลิคอนที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณธ์ *B. subtilis* และโครงสร้างภายในของต้นมะเขือเทศ รวมทั้งศึกษาว่าซิลิคอนมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศอย่างไรตลอดจนควรมีการศึกษาทดลองในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกรที่มีปัญหาโรคเหี่ยว

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2543. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. เอกสารประกอบการสอนวิชาหลัก
การควบคุมโรคพืช ภาควิชาโรคพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ช่อทิพย์ ถนอมกลิ่น. 2538. การใช้แบคทีเรียแอนทาโกนิสต์เพื่อควบคุมเชื้อ *Erwinia* สาเหตุโรคเน่า
และในมันฝรั่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ณัฐจิมา โขมิตเจริญกุล. 2541. โรคหัวเน่าของปทุมมา ปัญหาของการส่งออก. กสิกร 71: 38-40.
- นภา โล่ห์ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. ฟันนี้ พับบลิชซิง, กรุงเทพฯ.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. จุลชีววิทยาทั่วไป. โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ.
- ประจวบ บุตรศาสตร์. 2547. กลไกและการใช้แบคทีเรียปฏิบัฏในการควบคุมโรคเหี่ยวของ
มะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปริญญา จันทศรี. 2532. การเปลี่ยนแปลงประชากรและการถูกเข้าทำลายของเชื้อ Soft Rot
Erwinias ที่ได้จากแปลงปลูกหัวมันฝรั่งในบริเวณคอยอ่างขาง จังหวัดเชียงใหม่.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2541. โรคเหี่ยวจากแบคทีเรียของปทุมมา (*Curcuma alismatifolia*
Gagnep.) และการป้องกันกำจัด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พัชรินทร์ คงเปลี่ยน. 2540. การควบคุมโรคเหี่ยวจากเชื้อแบคทีเรียของมะเขือเทศโดยการจัดการ
ดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เพ็ญแข ไชยชนวงศ์. 2541. เทคโนโลยีการแยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์. เอกสารประกอบการสอน
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และ วราวุฒิ ครุส่ง. 2532. วิศวกรรมแปรรูปอาหาร.

วาสนา ฤทธิไธสง, วรรณวิไล อินทนู, จิระเดช แจ่มสว่างและชวลิต สงประยูร. 2548. การควบคุมโรคเน่าระดับดินและโรครากเน่าของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ด้วยการใส่เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ร่วมกับธาตุแคลเซียมและซิลิกอน. วารสารกำแพงแสน 3:1 (8-17).

วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์. 2541. วิจัยการพัฒนาจุลินทรีย์ *Antagonist Bacillus subtilis* สำหรับการควบคุมโรคข้าว. สารมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 7(2):6-7.

วราวุฒิ ครุส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ.

ศุทธนา คล้ายมงคล. 2543. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในประเทศไทยจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Rep-PC วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุภลักษณ์ สอกะวัด. 2536. โรคผักตระกูลพริกและมะเขือ. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมคิด ดิสถาพร. 2538. เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัยและกรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพฯ. 250 น.

สายใจ แก้วอ่อน. 2541. สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิต *Bacillus* spp. เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคข้าว. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุจินต์ แก้วนิล. 2545. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคขอบใบแห้งของข้าวจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- สุชาดา กุชชัยสิทธิ์. 2535. การผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Bacillus subtilis*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุธัญญา ฉายาขวลิต. 2527. การศึกษาโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุพจน์ กาเข้ม. 2545. การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่แยกจากผิวใบและดินบริเวณรากกล้วยเหลืองที่สามารถควบคุมโรคใบจุดของกล้วยเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุภกิจ กิจกัญญา. 2536. การประเมินความเสียหายการเปลี่ยนแปลงประชากร และการป้องกันเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. ในแปลงทดสอบโรคเหี่ยวจากเชื้อแบคทีเรียของมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เสาวรส ธรรมเพียร. 2549. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01) และเชื้อ *Bacillus subtilis* (CH4) ร่วมกับวัสดุเพาะกล้าในการควบคุมโรคเน่าระดับดิน *Pythium aphanidermatum* และโรคเหี่ยว *Ralstonia solanacearum* ของมะเขือเทศ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุไรจันทา กลีกรรณไพบุลย์. 2534. ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียบริเวณรากและดินที่ปลูกมะเขือเทศในการควบคุมทางชีวภาพต่อเชื้อแบคทีเรียโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Abadias, M., A. Benabarre, and N. Texiid. 2001. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **Inter J. food micro.** 65 : 173-182.
- Abraham, L.S., A.H. James and L. Richard. 1993. *Bacillus subtilis* and other grampositive bacteria. American society for microbiology, Washington DC.

- Alan, S.P. 1988. Formulations useful in applying beneficial microorganisms to seeds. **Trends in Biotechnology** 6 : 276-279.
- Amran Muis. 2006. Biomass production and formulation of *Bacillus subtilis* for biological control. 51. **Indonesian J. Agricultural Sci.** 7(2) : 51-56. (Abstr.)
- Baker, R. and T.C. Paulitz. 1996. Theoretical basic for microbial interactions leading to biological control of soilborne plant pathogens. In R. Hall (ed.). **Principle and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens**. APS Press, Minnesota. 50-79.
- Baker, K.F. and R.J. Cook. 1983. **Biological Control of Plant Pathogens**. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Becker, J.O. and F.J. Schwinn. 1993. Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. **Pestic. Sci.** 37: 355-363.
- Besson, F., F. Peypoux, G. Michel and L. Delcambe. 1976. Characterization of iturin A in antibiotic from various strains of *Bacillus subtilis*. **J. Antibiotic**. 29: 1043-1049.
- Boonsuebsakul , W. 1994. Study on the biovar of *Pseudomonas solanacearum* causing bacterial wilt of potato in Thailand. **Ann. Rept. of Division of Phytopathology and Microbiology**, Dept. of Agri; Bangkok, Thailand. 162.
- Brian, E. G and T.R. Steck . 2001. The Viable But Nonculturable State of *Ralstonia solanacearum* May Be Involved in Long-Term Survival and Plant Infection. **Applied and Environmental Microbiology**, 67 : 3866-3872.
- Broadbent, P., K.F. Baker, N. Franks and J. Holland. 1977. Effect of *Bacillus* spp. On increased growth of seedlings in steamed and in nontreated soil. **Phytopathology** 67: 1027-1034.

- Buddenhagen, I. and A. Kelman. 1962. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annu. Rev. Phytopathol.** 2: 203-230.
- Bu'lock, J.D. 1961. Intermediary metabolism and antibiotic sythesis. **Adv. Appl. Microbiol.** 3: 293-342.
- Burges, H.D. and K.A. Jones. 1998. Introduction. *In* H. D. Burges (ed.). **Formulation of Microbial Biopesticides**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1-4.
- Colin, R.H. 1989. **Bacillus**. Division of plenum publishing coporation, New York. 331.
- Cook, R.J. and K.F. Baker. 1983. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. The American Phytopathological Society, Minnesota.
- Cook, R.J., L.S. Thomashow, D.M. Weller, D. Fujimoto, M. Mazzola, G. Banger and D. Kim. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA.** 92: 4197-4201.
- Dannon E, Wydra K. 2004. Interaction between silicon amendment, bacterial wilt development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes. **Physiol Mol Plant Pathol.** 64: 233-243.
- Datnoff, L.E., W. K. Seebold and J. F. V. Correa. 2001. The use of silicon for integrated disease management: reducing fungicide applications and enhancing host plant resistance. *In*: Datnoff L. E. , Snyder G.H., Korndorfer G.H., editors. **Silicon in Agriculture**. The Netherlands: Elsevier Science. 171–183.
- Davis, R.F, P.A. Backman, R. Rodriguez-Kabana and N. Kokalis-Burelle. 1992. **Biological control of apple fruit diseases by *Chaetomium globosum* formulations containing cellulose.** 2 : 118-123.

- Denny, T.P. and Hayward, A.C. 2001. Gram-negative bacteria: *Ralstonia*. In: **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd ed.** Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W., eds. APS Press, Minnesota. 151-174.
- De'fago, G. and D. Haas. 1990. Pseudomonads as antagonist of soilborne plant pathogens: Modes of action and genetic analysis. In R.C. Bollag and G. Stotzky (eds.). **Soil Biochemistry**. Marcel Dekker, Inc., New York. 249-291.
- Devi, L.R., M.R. Menon and R.S. Aiyer. 1981. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil. **Plant Soil**. 62: 169-182.
- Dhampur Specialty Sugars Ltd. 2003. **Natural brown sugar**. Available Source: <http://www.sugarindia.com> , May 18, 2008.
- Dhital, S.P. 1998. **Biological study and soil amendment for the control of bacterial wilt of potato**. M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok.
- Diogo, R.V.C. and K. Wydra. 2007. Silicon-induced basal resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polysaccharide structure. **Physiol. Mol. Plant Patho.** 70 : 120-129.
- Douglas, G.I., D.L. Johnson and M.S. Goettel. 1996. Effect of bait substrate and formulation on infection of grasshopper nymphs by *Beauveria bassiana*. **Biosci tech.** 6 : 35-50.
- Douro-kpindou, O.K., I. Godonou and A. Houssou. 1995. Control of *Zonocerus variegatus* by ultra-low volume application of an oil formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. **Biosci tech.** 5:131-139.

- Elad, Y. and I. Chet. 1995. Practical approaches for biocontrol implementation. *In* R. Reuveni (ed.). **Novel Approaches to Integrated Pest Management**. CRC Press, Boca Raton. 323-338.
- Fawe, A., Abou-Zaid, M., Menzies, J.G., and Belanger, R.R. 1998. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Phytopathology** 88 : 396-401.
- Fawe, A., J.G. Menzies, M. Cherif and R.R. Belanger. 2001. Silicon and disease resistance in dicotyledons. *In*: Datnoff LE, Snyder GH, Korndorfer GH, editors. *Silicon in Agriculture*. The Netherlands: **Elsevier Science**. P.159–69.
- Fravel, D.R., J.A. Lewis and J.L. Chittams. 1995. Alginate prill formulations of *Talaromyces flavus* with organic carriers for biocontrol of *Verticillium dahliae*. **Phytopathology** 85 : 165-168.
- Fravel, D.R., W.J. Connik, Jr and J.A. Lewis. 1998. Formulation of microorganisms to control plant diseases. *In* H.D. Burges (ed.). **Formulation of Microbial Biopesticides**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 187-202.
- Gallegly, M.E. and J.C. Walker. 1949. Relation of environment factors to bacterial wilt of tomato. **Phytopathology** 39: 936-946.
- Glick, B.R. and Y. Bashan. 1997. Genetics manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnol. Adv.** 15: 357-378.
- Graham, R.S., J.S. Linda, A.L. Kerrie and M.E. Lois. 1998. Control of root-knot nematode with formulation of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys dactyloides*. **Biocon.** 11 : 224-230.

Granada, G.A. and L. Sequeira. 1983. A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**. 67 : 1084-1088.

Grive, B.J. 1943. **Studies in the physiology of host parasite relation**. III. Factor affecting resistance to bacterial wilt of Solanaceae. Roy. Soc. Victoria Proc. N.S. 55: 13-40.

Grieve, B.J. 1993. **Studies in the physiology of host-parasite relation**. III factor affecting resistance to bacterial wilt of Solanaceae. Roy. Soc. Victoria. Prec., N.S. 55: 13-14.

Handelsman, J. and E.V. Stabb. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **Plant Cell** 8:1855-1869.

Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **J. Appl. Bacteriol.** 27: 265-277.

Hayward, A.C. 1995. *Pseudomonas solanacearum*. . In U. S. Singh, R. P. Singh and K. Kohmoto (eds.). **Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Genetic and Molecular basis. vol. I: Prokaryotes**. Pergamon, Great Britain. 139-151.

Horita, M. and K. Tsuchiya. 1998. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in tomato rhizosphere soil. In P. H., C. Allen and PH. Prior (eds.). **Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecology Aspect**. Springer-Verlag, Berlin. 74-81.

Horita, M. and K. Tsuchiya. 2001. Genetic diversity of Japan strain of *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology** 91: 399-407.

Jones, J.B., R E. Stall and T.A. Zitter. 1993. **Compendium of Tomato Diseases**. The American Phytopathological Society, Minnesota.

- Jones, K.A. and H.D. Burges. 1998. Technology of formulation and application. *In* H.D. Burges (ed.). **Formulation of Microbial Biopesticides**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 8-30.
- Jones and W. Chun.(eds). **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. APS Press, Minnesota. 151-174.
- Juliano, B.O. and D.B. Bechtel. 1985. The rice grain and its gross composition, pp. 17-57. *In* B.O. Juliano (Ed.). **Rice: Chemistry and Technology**. American Association of Cereal Chemists.
- Keel, C., U. Schnider, M. Maurhofer, C. Voisard, J. Laville, U. Burger, P. Wirthner, D. Haas and G. De'fago. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: importance of the bacterial secondary metabolite. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 5: 4-13.
- Kelman, A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*, p. 194. *Cited* A.C. Hayward. Bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in Asia and Australia: an overview, pp. 15-24. *In* G.J. Perley (ed). **Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific**. Proceedings of an International Workshop Held at PCARD, Los Banos, Philippines, 8-10 October 1985. ACIAR proceeding. No. 13. 145.
- Kim, D., D.M. Weller and R.J. Cook. 1994. Biocontrol activity of *Bacillus* sp. strain L324-92 to root pathogens of wheat. **Phytopathology** 84: 1090. (Abstr.)
- Kloepper, J.W. and M.N. Schroth. 1981. Development of a powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. **Phytopathology** 71 : 590-592.

- Lam, S.T. and T.D. Gaffney. 1993. Biological activities of bacteria used in plant pathogen control. *In* I. Chet. (ed.). **Biotechnology in Plant Disease Control**. Wiley-Liss, New York. 291-320.
- Lam, X.M., E.T. Duenas and J.L. Cleland. 2001. Encapsulation and stabilization of nerve growth factor into poly (lactic-co-glycolic) acid microspheres. **J. Pharmace Sci.** 90 : 1356-1365.
- Leisinger, T. and R. Margraff. 1979. Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads. **Microbiol. Rev.** 43: 422-442.
- Leksomboon, C. 1994. **Investigation on bacterial wilt resistance of tomato and molecular cloning of hypersensitive reaction and pathogenicity genes of *Pseudomonas solanacearum***. Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Kamphaengsaen, Thailand.
- Lewis, J.A. 1991. Formulation and delivery systems of biocontrol agents with emphasis on fungi. *In* D.L. Keister and P.B. Cregan (eds.). **The Rhizosphere and Plant Growth**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 279-287.
- Lewis, J.A. 1995. Application of biocontrol fungi in granular formulations of pregelatinized starch-flour to control damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani*. **Biocon.** 5 : 397-404.
- Lomer, C.J., R.P. Bateman and I. Godonou. 1993. Field infection of *Zonocerus variegatus* following application of an oil-based formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. **Biosci tech.** 3 : 337-346.
- Lucas, J.A. 1998. **Plant Pathology and Plant Pathogens**. Blackwell Science, London.

- Lumsden, R.D., J.A. Lewis and D.R. Fravel. 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. *In* F.R. Hall and J.W. Barry (eds.). **Biorational Pest Control Agents: Formulation and delivery**. American Chemical Society, Washington, D.C. 338-346.
- Mark, A.J., B.S. Shasha and D.A. Schisler. 1996. Formulation of *Collectotrichum truncatum* microsclerotia for improved biocontrol of the weed hemp sesbania (*Sesbania exaltata*). **Biocon.** 7 : 107-113.
- Marschner, H. 1955. **Mineral Nutrient of Higher Plants**. 2nd ed. Academic Press, New York. 405-435.
- McCarter, S.M. 1976. Persistence of *Pseudomonas solanacearum* in artificially infested soil. **Phytopathology** 66: 998-1000.
- Nakayama, S., S. Takahashi, M. Hirai and M. Shoda. 1997. Isolation of new variants of surfactin by a recombinant *Bacillus subtilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 80-82.
- Ohler, J.G. 1999. Modern coconut management; palm cultivation and products. FAO.
Available Source: <http://www.ecoport.org>, April 11, 2008.
- Ohno, A., T. Ano and M. Shoda. 1996. Use of soybean curd residue, okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. **Process Biochem.** 31: 801-806.
- Paau, S.A. 1988. Formulations useful in applying beneficial microorganisms to seeds. **Trends in Biotechnology**. 6 : 276-279.
- Paul, E.A. and F.E. Clark. 1996. **Soil Microbiology and Biochemistry**. Academic Press, San Diego.

- Powell, K.A. 1992. Biocontrol product fermentation, formulation and marketing. *Cited* Y. Elad and I. Chet. Practical approaches for biocontrol implementation. *In* R. Reuveni (ed.). 1995. **Novel Approaches to Integrated Pest Management**. CRC Press, Boca Raton. 323-338.
- Quinon, V.L. 1963. A comparison of pathogenicity, morphology and physiology of there strains of *Pseudomonas solanacearum* in Hawaii. *Cited* M. Aragaki and V.L. Quinon. Bacterial wilt of ornamental gingers caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Dis. Reprtr.** 49: 378-379.
- Rodrigues, F. A., F. X. R Vale, G. H. Korndörfer, A. S. Prabhu, L. E. Datnoff, A. M. A. Oliveira and L. Zambolin. 2003. Influence of silicon on sheath blight of rice in Brazil. **Crop Protection**. 22:23-29.
- Schaad, N.W. 1988. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 2d ed., American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 158 p.
- Sharga, B.M. and D.G. Lyon. 1998. *Bacillus subtilis* BS107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. **Can. J. Micro.** 44 : 777-783.
- Takeuchi, H., T. Yasuji, H. Yamamoto, and Y. Kawashima. 2000. Spray-dried lactose composite particles containing an ion complex of alginate-chitosan for designing a dry-coated tablet having a time-controlled releasing function. **Pharmace Research**. 17 : 4-99.
- Taylor, A.G. and G.E. Harman. 1990. Concepts and technologies of selected seed treatments. **Annu. Rev. Phytopathol.** 28 : 321-339.
- Taylor, A.G., T.G. Min and G. E. Harman. 1991. Liquid coating formulation for the application of biological seed treatments of *Trichoderma harzianum*. **Biocon.** 1: 16-22.

- Thomashow, L.S. and D.M. Weller. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **J. Bacteriol.** 170: 3499-3508.
- Thomashow, L.S., D.M. Weller, R.F. Bonsall and L.S. Pierson III. 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of the wheat. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 908-912.
- Thomashow, L.S. and D.M. Weller. 1996. Molecular basis of pathogen suppression by antibiosis in the rhizosphere. In R. Hall (ed.). **Principle and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens**. APS Press, Minnesota. 80-103.
- Tsvetkov, T. and R. Brankova. 1983. Viability of micrococci and lactobacilli upon freezing and freeze-drying in the presence of different cryoprotectants. **Trend Biotech.** 20 : 318-323.
- Van, M.I. and J.I. Prosser. 2000. Enhanced survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil following establishment of inoculum in a sterile soil carrier. **Soil Bio.** 32 : 1377-1382.
- Vidhyasekaran, P. and M. Muthamilan. 1995. Development of formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. **Plant Dis.** 79: 782-786.
- Vidhyasekaran, P., R. Rabindran, M. Muthamilan, K. Nayar, K. Rajappan, N. Subramanian and K. Vasumathi. 1997. Development of a powder *Pseudomonas fluorescens* for control of rice blast. **Plant Pathol.** 46: 291-297.
- Walker, J.C. 1952. **Disease of Vegetable Crops**. McGraw Hill Book Company, Inc., New York.

- Walker, H.L. and Connick, Jr.W.J. 1983. Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. **Weed science**. 31 : 333-338.
- Walter, J.F. and A.S. Paau. 1993. Microbial inoculant production and formulation. *In* F.B. Metting, Jr. (ed.). **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**. Marcel Dekker, Inc. New York. 579-594.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.** 26: 329-407.
- Weller, D.M. and L.S. Thomashow. 1993. Microbial metabolites with biological activity against plant pathogens. *In* R.D. Lumsden and J. L. Vaughn. **Pest Management: Biologically Based Technologies**. American Chemical Society, Beltsville. 173-180.
- Winstead, N.N. and A. Kelman. 1952. Inoculation technique for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**. 42 : 628-634.
- Woolley, J.T. 1957. Sodium and silicon as nutrient for the tomato plant. **Plant Physiol.** 32:317-321.
- Yang, C.Y. 1979. Bacterial and fungal diseases of tomato. *In* R. Cowell (ed.). **Proceedings of the First International Symposium on Tropical Tomato**. AVRDC. Shanhua, Taiwan. 111-123.
- Zuber P., M.M. Nakano and M.A. Marahiel. 1993. Peptide antibiotics. *In* A.L. Sonenshein, J.A. Hoch and R. Losick. **Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics**. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 897-916.

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

1. Nutrient agar (NA) (Schaad, 1988)

Bacto-peptone	5.0 กรัม
Beef extract	3.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

2. Nutrient glucose agar (NGA) (Schaad, 1988)

Bacto-peptone	5.0 กรัม
Beef extract	3.0 กรัม
Glucose	2.5 กรัม
Agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

3. Nutrient glucose broth (NGB) (Schaad, 1988)

Bacto-peptone	5.0 กรัม
Beef extract	3.0 กรัม
Glucose	2.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

4. Malt –yeast extract (MY) (สุชาติ, 2535)

Bacto-peptone	5.0 กรัม
Malt extract	3.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
Glucose	10.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

* อาหารแข็งเติม agar 15 กรัม

5. Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) (Kelman, 1954)

Bacto-peptone	10.0 กรัม
Glucose	5.0 กรัม
Casein hydrolysate	1.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม

6. Triphenyl Tetrazolium Chloride medium (TZC) (Kelman, 1954)

ส่วนที่ 1 (basal medium)

Bacto-peptone	10.0 กรัม
Glucose	5.0 กรัม
Casein hydrolysate	1.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม

ส่วนที่ 2 (aqueous solution tetrazolium)

2,3,5- Triphenyl tetrazolium chloride	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันนำไปฆ่าเชื้อโดยการกรอง และหลอมอาหารส่วนที่ 1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วเติมส่วนที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรก่อนเทลงจานเลี้ยงเชื้อ

7. SM-1 (Grannada, 1983)

ส่วนที่ 1 (basal medium) ใช้อาหาร TZC

ส่วนที่ 2 (aqueous solution) ของสารอาหารต่างๆ คือ

Crystal violet**	50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Thimerosal*	5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Polymycin B sulfate*	100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Tryothrycin*	20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Chloromycetin*	5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Cycloheximide*	50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือ
Chlorothalonil*	80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

* antibiotic และ fungicide ทำการฆ่าเชื้อโดยละลายใน 70% เอทานอล 1 มิลลิลิตร นาน 30 นาที แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

****** ฆ่าเชื้อโดยการกรอง หรือนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 21 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

สำหรับอาหาร mSM-1 ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ใช้อาหาร TZC เป็น basal medium เติม crystal violet 50 ppm และ Polymyxin B sulfate 50 ppm ผสมให้เข้ากันดีก่อนเทอาหารลงจานเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมสารโซเดียม ซิลิเกต (sodium silicate)

Na_2SiO_3 มีจำนวนโมล = 122 โมล

จากความหนาแน่นที่ให้มา $d = 1.5 \text{ g/ml}$ แสดงว่าใน 1 ml มีปริมาตรของโซเดียม ซิลิเกต 1.5 กรัม

$$\begin{aligned}\text{จากสูตร} \quad \text{Mol} &= \text{g} / \text{M} \\ &= 1500 / 122 \\ &= 12.3 \text{ Mlo}\end{aligned}$$

ดังนั้นใน 1 ลิตร มีซิลิคอน (Si) 12.3 โมล

*ต้องการทราบว่า ความเข้มข้น 9 mM ต้องใช้โซเดียมซิลิเกต ปริมาตรเท่าไรใน 1 ลิตร

$$\begin{aligned}\text{จากสูตร} \quad N1V1 &= N2V2 \\ 12.3 \times V1 &= 0.009 \times 1000 \\ V1 &= 0.731 \text{ ml}\end{aligned}$$

* เพราะฉะนั้นต้องใช้โซเดียม ซิลิเกต ปริมาตร 0.731 ml ต่อน้ำ 1 ลิตร จะได้ความเข้มข้น 9 mM

ต้องการทราบว่าปริมาตร 0.73 มีปริมาณเนื้อซิลิคอนกี่กรัม โดย

$$\begin{aligned}\text{จาก} \quad d &= 1.5 \text{ g/ml (เมื่อ g=Mol)} \\ \text{จะมีเนื้อสาร Si} &= 1.5 \times 28 / 122 \\ &= 0.344 \text{ g/ml}\end{aligned}$$

ดังนั้นความเข้มข้นของ 9 mM จะใช้โซเดียม ซิลิเกต ปริมาตร 0.73 ml/ลิตร

$$\begin{aligned}\text{เพราะฉะนั้นจะมีเนื้อสาร Si} &= 0.73 \times 0.344 \\ &= 0.25 \text{ กรัม}\end{aligned}$$

ดังนั้นความเข้มข้นของโซเดียม ซิลิเกตที่ใช้ 9 mM จะมีเนื้อสารซิลิคอน (Si) 0.25 กรัม

การเตรียมสารซาลิซิก แอซิก (salicic acid)

H_2SiO_4 มีมวลโมเลกุล (M) = 94

จากสูตร จำนวนโมล = จำนวนมวล/มวลโมเลกุล

$$94 \text{ Mol}/1000 = 9 \text{ mM}/X$$

$$X = 0.095 \text{ g}$$

เพราะฉะนั้นต้องชั่ง ซาลิซิก แอซิก จำนวน 0.095 กรัม จะได้ความเข้มข้น 9 mM

ต้องการทราบว่าความเข้มข้น 9 mM มีเนื้อสาร Si เท่าไหร่

$$= 0.095 \times 28$$

$$= 2.66 \text{ กรัม}$$

ดังนั้นความเข้มข้นของซาลิซิก แอซิก 9 mM มีเนื้อสารซิลิกอน (Si) เท่ากับ 2.66 กรัม

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวไก่อแก้ว สุธรรมมา
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 18 กันยายน พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	อุบลราชธานี
ประวัติการศึกษา	ระดับปริญญาตรี สาขาวิชาการจัดการศัตรูพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนการค้นคว้าวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์จาก บัณฑิตวิทยาลัย