



## รายงานการวิจัย เรื่อง

การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์  
เพื่อควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

**Screening of bacterial antagonists and development of bacterial antagonist formulations  
for controlling diseases of vegetable in hydroponics condition**

มานะ กาญจนมณีเสถียร อัจฉรา เพ็งหนู ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี และวานิด รอดเนียม

Mana Kanjanamaneesathian, Ashara Pengnoo, Ruedeekorn Wiwattanapatapee and Wanit Rotniam

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 (ต่อเนื่อง 2 ปี)

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2556

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผ่านการพิจารณาจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2553-2554 (โครงการต่อเนื่อง 2 ปี)

ชื่อโครงการ การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

ชื่อผู้วิจัย มานะ กาญจนมณีเสถียร<sup>1</sup> อัจฉรา เฟื่องหนู<sup>2</sup> ฤดีกร วิวัฒนปฐพี<sup>2</sup> และวานิด รอดเนียม<sup>3</sup>  
หน่วยงานที่สังกัด <sup>1</sup>มหาวิทยาลัยศิลปากร <sup>2</sup>มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ <sup>3</sup>มหาวิทยาลัยทักษิณ

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 (ต่อเนื่อง 2 ปี)

ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2556

ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์

### บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ (1) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium* spp. ในการปลูกพืชระบบไฮโดรโปนิกส์ (2) พัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพและคงตัวเพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ และ (3) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus velezensis* ที่แยกได้จากรากพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pythium helicoides*, *Aphanomyces* sp. และ *P. aphanidermatum* ที่พบในระบบไฮโดรโปนิกส์ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus velezensis* มีความสามารถในการผลิต IAA มีขนาดเอนโดสปอร์ค่อนข้างใหญ่ และไม่มีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดอื่น จึงได้รับการคัดเลือกนำมาใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์

การพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์ *B. velezensis* รูปแบบแกรนูลชนิดละลายน้ำ ซึ่งประกอบด้วยสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ lactose และ polyvinyl pyrrolidone K-30 พบว่า สูตรตำรับ F8 มีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม ละลายน้ำได้ดี มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรตำรับ  $10^{10}$  CFU/g และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *Aphanomyces* sp. สูง (96%) อย่างไรก็ตาม หลังจากเก็บชีวภัณฑ์ไว้ในอุณหภูมิห้อง (26-32°C) เป็นเวลา 6 เดือน ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์มีแนวโน้มลดลง

การพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์ *B. velezensis* รูปแบบของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น ซึ่งประกอบด้วยสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์กระจายตัวในของเหลว โดยอาศัยสารแขวนตะกอน xanthan gum พบว่า สูตรตำรับ F4 มีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรตำรับ  $10^{10}$  CFU/g มี

ประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *Aphanomyces* sp. สูง (90.8%) ไม่เกิดการตกตะกอนหลังจากตั้งไว้ 4 สัปดาห์ หลังจากเก็บชีวภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาในชีวภัณฑ์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

เมื่อนำชีวภัณฑ์ *B. velezensis* รูปแบบของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นมาทำการทดสอบกับพืชทั้งในห้องปฏิบัติการ และกับพืชที่ปลูกในโรงเรือนปลูกพืชระบบไฮโดรโปนิกส์ (ระบบ dynamic root floating technique) พบว่าเมื่อทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ชีวภัณฑ์ *B. velezensis* รูปแบบของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการลดเปอร์เซ็นต์การตายที่เกิดกับเมล็ดของผัก *Lactuca sativa* และลดเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายที่รากพืชของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่า (*P. aphanidermatum*)

เมื่อทำการทดสอบกับพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ (ระบบ dynamic root floating technique) ณ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีเพชรบุรี พบว่าเมื่อนิพ่น (spraying) ชีวภัณฑ์ *B. velezensis* รูปแบบของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น ( $10^{13}$  CFU/มิลลิลิตร) [1% และ 10% (ปริมาตรโดยปริมาตร) ตามลำดับ] ไปยังรากของผัก (*L. sativa* var. Red Coral ที่ปรากฏอาการของโรคแล้วอย่างชัดเจน และ *L. sativa* var. Green Oak ที่ไม่ปรากฏอาการของโรค) จะสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายที่รากพืชของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าที่ปรากฏในระบบปลูก และยังพบว่าการฉีดพ่นชีวภัณฑ์มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของพืชด้วยเช่นกัน

เมื่อทำการทดสอบกับพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ (ระบบ dynamic root floating technique) พบว่าเมื่อราด (drenching) ชีวภัณฑ์ *B. velezensis* รูปแบบของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นไปยังผัก *Brassica campestris* var. *chinensis* สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของผักชนิดนี้ด้วยเช่นกัน

**คำสำคัญ :** การพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะ โรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

**Research Title Screening of bacterial antagonists and development of bacterial antagonist formulations for controlling diseases of vegetable in hydroponics condition**

**Researcher** Mana Kanjanamaneesathian<sup>1</sup>, Ashara Pengnoo<sup>2</sup>, Ruedeekorn Wiwattanapatapee<sup>2</sup> and Wanit Rotniam<sup>3</sup>

**Office** <sup>1</sup>Silpakorn University, <sup>2</sup>Prince of Songkla University and <sup>3</sup>Taksin University

**Research Grants** Research and Development Institute, Silpakorn University, Fiscal Budget of Year 2010 (Two years project)

**Year of Completion** 2013

**Type of research** applied research

**Abstract**

This research project aimed to (1) select an effective bacterial antagonists to control disease caused by *Pythium* spp. in vegetables grown in hydroponic system (2) develop the formulations of a bacterial antagonist, *B. velezensis*, in water-soluble granule and suspension concentrate forms and (3) test the efficacy of the selected formulation in controlling root rot disease in vegetable in hydroponic production system.

*Bacillus velezensis*, isolated from root of vegetable grown hydroponically, was effective in inhibiting a mycelial growth of *Pythium helicoides*, *Aphanomyces* sp. and *P. aphanidermatum* presented in the hydroponic system. This bacterium had relatively large endospore and was capable of producing IAA, a plant growth hormone. This bacterium was subsequently chosen for formulation study.

Granule formulations were composed of the bacterial endospores of *B. velezensis*, lactose and polyvinyl pyrrolidone K-30. The formulation F8 had good physical characteristics and high water solubility. Granules contained bacteria in the range of  $10^{10}$  CFU/g and performed high mycelial growth inhibition of *Aphanomyces* sp. (96 %). However, the population of *B. velezensis* in the formulation had decreased with time after 6 months storage at room temperature (26-32°C).

Suspension concentrate formulations were composed of the bacterial spores dispersed in concentrate liquid using xanthan gum as a suspending agent. The formulation F4 had good physical characteristics and there was no sedimentation occurred after 4 week storage at room temperature. The

formulation contained bacteria in the range of  $10^{10}$  CFU/g and performed high mycelial growth inhibition of *Aphanomyces* sp. (90.8 %). The population of *B. velezensis* in the suspension concentrate remained high and had a tendency to increase after 6 months storage at room temperature.

Initial results indicated that the suspension concentrate formulation was effective in controlling root rot when applied directly to seedlings of *L. sativa*. This efficacy was, however, nullified when the formulation was applied as a suspension to raise these seedlings.

The suspension concentrate formulation was sprayed onto the roots of one-month-old *Lactuca sativa*, grown by the dynamic root floating technique (DRFT) used as the hydroponic growing system, in two efficacy trials. In the first test with *L. sativa* (var. Red Coral) with root rot symptoms, a 1% suspension concentrate formulation ( $10^{13}$  CFU/mL) (v/v) was effective in reducing the %age of root tips colonized by the pathogen and for increasing the fresh shoot weight. In the second test with *L. sativa* (var. Green Oak) using healthy-looking roots, a 10% suspension concentrate formulation ( $10^{13}$  CFU/mL) (v/v) was also effective in reducing the %age of root tips colonized by the pathogen. The suspension concentrate formulation of the bacterium increased the fresh shoot weight.

This formulation, when applied as a drench treatment to seedlings of *Brassica campestris* var. *chinensis*, increased growth of this vegetable.

**Key words :** development of bacterial antagonist formulations, diseases of vegetable in hydroponics condition

## สารบัญ

|                                                                                                                                                                                             | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ .....                                                                                                                                                                       | ก    |
| บทคัดย่อภาษาไทย .....                                                                                                                                                                       | ข    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....                                                                                                                                                                    | ค    |
| สารบัญ .....                                                                                                                                                                                | ง    |
| สารบัญตาราง .....                                                                                                                                                                           | จ    |
| สารบัญภาพ .....                                                                                                                                                                             | ฉ    |
| บทนำ.....                                                                                                                                                                                   | 1    |
| วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....                                                                                                                                                            | 3    |
| สารเคมี อุปกรณ์ และชีวภัณฑ์.....                                                                                                                                                            | 4    |
| วิธีดำเนินการวิจัย.....                                                                                                                                                                     | 5    |
| ผลการทดลองและวิจารณ์.....                                                                                                                                                                   | 16   |
| สรุป.....                                                                                                                                                                                   | 41   |
| เอกสารอ้างอิง .....                                                                                                                                                                         | 43   |
| ภาคผนวก                                                                                                                                                                                     |      |
| (1) การวิเคราะห์ลำดับเบส : วิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA ทั้งสาย Forward และ Reverse<br>ด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล<br>ทางพันธุกรรม NCBI..... | 46   |
| (2) ผลงานเผยแพร่จากโครงการวิจัยนี้.....                                                                                                                                                     | 47   |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่                                                                                                                                                                     | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 4.1 ส่วนประกอบของชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ.....                                                                                                                             | 10   |
| 4.2 ส่วนประกอบของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น .....                                                                                                                       | 12   |
| 5.1 จังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างพืชปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ต่างๆ ที่พบเชื้อราก่อโรค<br>และใช้ในการทดสอบ.....                                                                    | 16   |
| 5.2 ชนิดของเชื้อราก่อโรคที่พบว่าก่อให้เกิดอาการรากเน่าและทำให้เกิดอาการเหี่ยวถาวร<br>กับพืชทดสอบ 3 ชนิด .....                                                                | 17   |
| 5.3 จำนวน isolates ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่แยกจากฟาร์มในจังหวัด<br>ที่ทำการเก็บตัวอย่างที่มีการปลูกพืชไฮโดรโปนิกส์ในระบบต่างๆ .....      | 18   |
| 5.4 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่มีศักยภาพในการเป็นปฏิปักษ์<br>ต่อเส้นใยของเชื้อรา <i>P. helicoides</i> และพืชที่เป็นแหล่งของเชื้อ..... | 20   |
| 5.5 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>P. helicoides</i> .....                                                                      | 21   |
| 5.6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของเชื้อรา <i>P. helicoides</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์.....                                                                            | 22   |
| 5.7 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA .....                                                                                                 | 23   |
| 5.8 ลักษณะและขนาดของสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ .....                                                                                                                     | 24   |
| 5.9 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการเจริญร่วมกันบนอาหารแข็ง PDA .....                                                                                                        | 25   |
| 5.10 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่มีคุณสมบัติในการผลิตฮอร์โมน IAA .....                                                            | 26   |
| 5.11 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย<br>เชื้อรา <i>P. helicoides</i> โดยการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S ribosomal RNA gene .....   | 27   |
| 5.12 ผลการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของแกรนูลในแต่ละสูตร .....                                                                                                                | 28   |
| 5.13 ผลการประเมินความกร่อนและความหนาแน่นของแกรนูล .....                                                                                                                      | 29   |
| 5.14 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์แกรนูลละลายน้ำและ<br>ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ .....                                                      | 29   |
| 5.15 ปริมาตรของการตกตะกอนของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. velezensis</i><br>ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสูตรต่างๆ .....                                                     | 31   |
| 5.16 ลักษณะทางกายภาพและการกระจายตัวของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. velezensis</i><br>ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสูตรต่างๆ .....                                           | 31   |
| 5.17 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. velezensis</i> ที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์<br>ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ .....                      | 32   |
| 5.18 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. velezensis</i> ในชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ<br>หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน .....                                | 33   |

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.19 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. velezensis</i> ในชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นแต่ละสูตร<br>หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน ..... | 33 |
| 5.20 เพอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของต้นกล้าผักสลัด green oak ที่ใส่เชื้อรา <i>P. aphanidermatum</i><br>ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง.....                             | 34 |
| 5.21 เพอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อราที่รากของต้นกล้าผักสลัดอายุ 30 วัน ที่ปลูก<br>ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง .....                                                   | 35 |
| 5.22 เพอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อราที่รากผักสลัด red coral ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง<br>เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ .....                                          | 37 |
| 5.23 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของรากและต้นผักสลัด red coral ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง<br>เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ .....                                        | 38 |
| 5.24 เพอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อราที่รากผักสลัด green oak ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง<br>เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ .....                                          | 39 |
| 5.25 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของรากและต้นผักสลัด green oak ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง<br>เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ .....                                        | 40 |
| 5.26 ความยาว น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของรากและต้นกวางตุ้งที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์....                                                                     | 41 |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่                                                                                                                                                                         | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 5.1 ลักษณะการยับยั้งเชื้อราก่อโรค <i>P. helicoides</i> โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. velezensis</i> .....                                                                    | 19   |
| 5.2 ลักษณะของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดแกรนูลละลายน้ำ สูตรที่ 8 .....                                                                                                       | 27   |
| 5.3 ลักษณะของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น.....                                                                                                         | 30   |
| 5.4 การตกตะกอนของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. velezensis</i> ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น<br>สูตรต่างๆ.....                                                                  | 30   |
| 5.5 ระบบการปลูกพืชไฮโดรโปนิกส์ระบบ DRFT ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์<br>แบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. velezensis</i> ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในการควบคุมโรครากเน่า..... | 36   |

## 1. บทนำ

ไฮโดรโปนิกส์ คือเทคโนโลยีการปลูกพืชแบบไม่ใช้ดิน โดยปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีน้ำ และปุ๋ยเป็นส่วนประกอบ หรือปลูกบนวัสดุอื่นที่ไม่ใช่ดิน เช่น ทราย กรวด เวอร์มิคิวไลต์ หรือขี้เลื่อย (Jensen, 1991) ระบบการผลิตพืชโดยวิธีไฮโดรโปนิกส์ได้ริเริ่มโดย W.F Gericke ในปี ค.ศ 1930 (Gericke, 1940) และในปัจจุบันได้มีการปลูกพืชโดยวิธีไฮโดรโปนิกส์เป็นการค้าแพร่หลายไปยังประเทศต่างๆ ทั่วโลก (Marr, 1994) อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่าพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์มีเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืชเข้าทำลาย (Jensen, 1991; Marr, 1994; Stanghellini and Rasmussen, 1994) ในบางรายงานพบว่า เชื้อโรคและแมลงศัตรูพืชเข้าทำลายพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์มากกว่าการปลูกพืชในดินโดยทั่วไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการปลูกพืชระบบไฮโดรโปนิกส์มีอุณหภูมิและความชื้นสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโรคและการแพร่ระบาดของแมลง (Menzies *et al.* , 1996; Anonymous, 2002 )

จากการศึกษาของ Marr ในปี ค.ศ.1994 และ Menzies และคณะ ในปี ค.ศ. 1996 พบว่าเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* เข้าทำลายผลผลิตของมะเขือเทศและแตงกวาในประเทศอเมริกา นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อโรคอื่นๆ ที่เข้าทำลายพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ ได้แก่ *Pythium* spp. (Marr, 1994; Menzies *et al.* , 1996; Rey *et al.*, 1997 ) *Phytophthora* spp. (De Jonghe *et al.*, 2005) และ *Fusarium* spp. (Anonymous, 2002; Fravel and Larkin , 2002) แม้ว่าเชื้อโรคเหล่านี้จะเป็นเชื้อจุลินทรีย์ดิน แต่สามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ได้ โดยติดมากับเมล็ดหรือดินจากการเพาะต้นกล้า เมื่อส่วนของเชื้อราเหล่านี้เข้าไปในถึงสารละลายธาตุอาหาร เชื้อราจะเจริญเติบโตแล้วแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปกับระบบการให้น้ำ เข้าทำลายบริเวณรากพืช ก่อให้เกิดอาการต่างๆ กับพืชได้ เช่น ต้นพืชตาย เหี่ยว หรือแคระแกรน ถึงแม้ว่าระบบไฮโดรโปนิกส์จะมีวิธีการและขั้นตอนในการผลิตที่ปลอดภัย เช่น การใช้วิธีการแบบให้สารละลายไหลผ่านรากพืชเป็นแผ่นบางๆ (Nutrient Film Technique) เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าไปในระบบการปลูกพืช แต่วิธีการดังกล่าวยุ่งยากซับซ้อน ไม่สามารถควบคุมได้ 100 % และมีต้นทุนในการผลิตสูง ส่งผลให้ราคาของผลผลิตสูงตามไปด้วย

การใช้สารกำจัดเชื้อราควบคุมเชื้อ *Pythium* spp. , *Phytophthora* spp. , *Fusarium* spp. และเชื้อราอื่นๆ ที่เข้าทำลายรากพืช เช่น fosetyl-aluminium (Grote and Bucsi, 1998) เป็นวิธีการหนึ่งที่นำมาใช้เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าว แต่ในปัจจุบันพบว่ามีข้อจำกัดหลายอย่างโดยเฉพาะด้านความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค สารกำจัดเชื้อราบางชนิดมีความเป็นพิษและมีสารตกค้าง เช่น prochloraz และ carbendazim ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ (Song *et al.*, 2004) แม้ว่าสารกำจัดเชื้อราที่มีความเป็นพิษต่ำเหล่านี้ อาจนำมาใช้ควบคุมโรคพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ได้ แต่ถ้านำมาใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน อาจทำให้เชื้อราโรคพืชเกิดความต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราได้ โดยมีรายงานพบว่า เชื้อ *Pythium* spp. , *Phytophthora* spp. และเชื้อราสาเหตุ

อื่นๆ สามารถพัฒนาสายพันธุ์ให้ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราได้ ทำให้เชื้อราสาเหตุมีความรุนแรงมากขึ้น (Nene and Thapliyal, 1993) ดังนั้นจึงมีการคิดค้นวิธีการอื่นๆ เพื่อควบคุมโรคพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ เช่น การใช้รังสียูวี (Sutton *et al.*, 2000) การใช้โอโซน (Vestergard, 1994) เป็นต้น การควบคุมโรคพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์นอกจากการใช้สารเคมี และการควบคุมทางกายภาพแล้ว มีรายงานพบว่าสามารถใช้มาตรการทางชีววิธี โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชได้ (Jenkins *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2003; Muslim *et al.*, 2003 ) ) เช่น การใช้เชื้อ *Trichoderma harzianum* (Mayano *et al.*, 2003) การใช้เชื้อ *Pseudomonas chlororaphis* ควบคุมเชื้อ *Pythium aphanidermatum* ที่เข้าทำลายรากของพริก แตงกวา และดอกเบญจมาศ เป็นต้น (Chatterton, 2002; Khan *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2000)

เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีรายงานและได้รับความสนใจในการใช้เป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะเพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคพืช ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Bacillus* spp. เป็นเชื้อที่ไม่มีผลหรือมีผลข้างเคียงน้อยมากต่อพืชและสิ่งมีชีวิตอื่น (Shoda, 2000) และเป็นเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตเร็วประมาณ 24-48 ชั่วโมง สามารถสร้าง endospore ที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีความแห้งแล้ง อุณหภูมิสูง และความเค็มสูงได้ดี นอกจากนี้คุณสมบัติที่สำคัญอีกประการของ *Bacillus* spp. คือ ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะประเภทเพปไทด์ (peptide antibiotics) ได้หลายชนิด ซึ่งสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคพืชได้ (Shogi, 1978) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถพบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ และบริเวณรอบรากพืช

จากการศึกษาของคณะวิจัย พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคหลายชนิด เช่น เชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าว (Kanjnamaneesathian *et al.* 1998; Kanjanamaneesathian *et al.* 2007; Pengnoo *et al.* 2000; Wiwattanapatapee *et al.* 2004; Wiwattanapatapee *et al.* 2007) เชื้อรา *Pyricularia oryzae* CaV. สาเหตุโรคใบไหม้ในฝัก เชื้อรา *Alternaria alternate* สาเหตุโรคใบเน่าในฝัก Grosch และคณะ (2001) ได้ทดลองใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ E21, E22, E23, E26 และ E28 ที่แยกได้จากบริเวณรากของต้นมะเขือเทศที่ปลูกในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. พบว่าทุกสายพันธุ์ที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aphanidermatum* ในสภาพห้องปฏิบัติการ ในขณะที่เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ FZB44 ที่แยกได้จากดินไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าว แต่สามารถลดการเกิดโรคได้ดีเมื่อทดสอบในสภาพแปลงปลูก

ในประเทศไทยมีรายงานว่า มีการปลูกพืชระบบไฮโดรโปนิกส์ในระดับอุตสาหกรรมแพร่หลายมากขึ้น แต่ยังไม่มียานการศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อโรค ส่วนใหญ่จะมีรายงานเกี่ยวกับอาการผิดปกติของพืชที่เกิดจากปัจจัยอื่นๆ เช่น ธาตุอาหาร อุณหภูมิ และความชื้น ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะและพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราเข้าทำลายพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

สำหรับชีวภัณฑ์ที่จะพัฒนาในงานวิจัยนี้ คือ แกรนูลชนิดละลายน้ำ (water-soluble granules) และของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น (suspension concentrate) สำหรับผสมลงในสารละลายธาตุอาหารพืชของระบบไฮโดรโปนิกส์ เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถเตรียมได้ง่าย ต้นทุนไม่สูง และเลือกใช้สารที่สามารถสลายตัวได้ในธรรมชาติ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค สามารถเก็บรักษาแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้เป็นระยะเวลานาน สะดวกต่อการใช้และปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรโดยตรงและอาจเป็นประโยชน์ต่อภาครัฐกิจเอกชนที่จะนำไปสู่การผลิตในเชิงการค้าต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium* spp. ในการปลูกพืชระบบไฮโดรโปนิกส์

2.2 เพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพและคงตัวเพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์

### 3. สารเคมี อุปกรณ์ และชีวภัณฑ์

#### 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1.1 potato dextrose agar (PDA)
- 3.1.2 potato dextrose broth (PDB)
- 3.1.3 PDA double strength
- 3.1.4 potato carrot agar (PCA)
- 3.1.5 nutrient agar (NA)

#### 3.2 สารเคมี

- 3.2.1 lactose monohydrate
- 3.2.2 alginate, polyvinylpyrrolidone (PVP), starch paste
- 3.2.3 xanthan gum
- 3.2.4 sodium carboxy methylcellulose (SCMC)

#### 3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet)
- 3.3.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 3.3.3 ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven)
- 3.3.4 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
- 3.3.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 3.3.6 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.3.7 กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
- 3.3.8 เครื่องเขย่า (Table rotary shaker)
- 3.3.9 เครื่องผสม (Planetary mixer)
- 3.3.10 เครื่องวัดความหนืด (Brookfield DV-III Ultra Programmable Rheometer)
- 3.3.11 เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
- 3.3.12 เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer)
- 3.3.13 เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น

## 4. วิธีดำเนินการวิจัย

### 4.1 การเก็บตัวอย่างโรคพืช การแยกเชื้อราสาเหตุโรค และการจำแนกชนิด

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรครากเน่า จากพื้นที่ที่มีการปลูกพืชระบบ ไฮโดรโปนิกส์ใน จังหวัดต่างๆ เช่น กรุงเทพมหานคร นนทบุรี สมุทรปราการ และเพชรบุรี นำตัวอย่างพืชมาแยกเชื้อราสาเหตุ *Pythium* spp. ด้วยวิธีการ tissue transplanting method และแยกให้ได้เชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ hyphal tip isolation ไปวางเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร potato dextrose agar (PDA) เพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ ทำการจำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานตามเกณฑ์ที่รายงานโดย Plaats-Niterink (1981)

### 4.2 การทดสอบการเกิดโรค

ทำการทดสอบการเกิดโรค โดยนำเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้ และทำการจำแนกชนิดแล้วจากข้อ 4.1 มาพิสูจน์การเกิดโรค โดยการปลูกพืชในสารละลายธาตุอาหาร และปลูกเชื้อราสาเหตุ (inoculate) บนทึกลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น แล้วคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคอย่างรุนแรงไว้ทดสอบต่อไป สำหรับพืชที่ใช้ในการทดสอบคือ ผักสลัด จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ butter head, green oak และ red coral เพราะเป็นพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

### 4.3 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติ

เก็บตัวอย่างรากพืชจากฟาร์มในพื้นที่ที่มีการปลูกพืชด้วยระบบไฮโดรโปนิกส์ในจังหวัดต่างๆ จำนวน 6 ฟาร์ม ได้แก่ ฟาร์มที่มีการปลูกพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ แบบ NFT ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 1 ฟาร์ม นนทบุรี จำนวน 1 ฟาร์ม และชลบุรี จำนวน 1 ฟาร์ม และฟาร์มที่มีการปลูกพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ แบบ Deep water ในจังหวัดเพชรบุรี จำนวน 1 ฟาร์ม อุทัย จำนวน 1 ฟาร์ม และชลบุรี จำนวน 1 ฟาร์ม โดยตัวอย่างรากพืชที่เก็บจากที่ต่างๆ จะถูกบรรจุในขวดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และมีฝาปิดสนิทป้องกันการปนเปื้อนหรือการรั่วไหลของน้ำ

นำตัวอย่างรากพืชดังกล่าวมาแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ทนความร้อนโดยการแช่ขวดน้ำที่มีตัวอย่างรากพืชในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 84 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที ก่อนนำส่วนของรากพืชลงเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA โดยในกรณีของตัวอย่างรากพืช จะทำการตัดส่วนของรากออกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ขนาดความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร โดยวิธี aseptic technique แล้วนำชิ้นส่วนดังกล่าววางบนอาหาร ส่วนในกรณีของตัวอย่างน้ำที่บรรจุตัวอย่างรากพืชตัวอย่าง นำมาใช้แยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยวิธี pour plate ด้วยอาหาร PDA

ทำการบ่มงานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง เมื่อพบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารจึงทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีลักษณะเป็น single colony ไปเพาะเลี้ยงในหลอดที่มีอาหาร PDA แบบลาดเอียง (PDA slant) เพื่อเก็บเชื้อแบคทีเรียสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

#### 4.4 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium helicoides*

##### 4.4.1 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium helicoides*

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ทนร้อนที่แยกได้จากข้อ 4.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides* ด้วยวิธีการ dual culture technique บนอาหาร PDA (โดยทำการทดลองเพียงจำนวน 1 ข้ำ เนื่องจากเป็นการคัดเลือกเบื้องต้นและมีเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบเป็นจำนวนมาก) จากนั้นบ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) บันทึกผลการทดลองโดยตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides* เป็นเวลา 15 วัน (บันทึกผลในวันที่ 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ 15 ตามลำดับ) ด้วยการวัดขนาดความกว้างของบริเวณยับยั้งระหว่างโคโลนีของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย ทำการคัดเลือกและเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *P. helicoides* สำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

##### 4.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะจากเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium helicoides*

นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides* (ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 4.2.1) ลงเลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเชื้อแบคทีเรียจำนวน 2 หลอด ลงเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว PDB ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร และนำมาวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (horizontal shaker) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำ bacterial suspension มาปั่นแยกเพื่อเก็บส่วน supernatant ด้วยการนำ bacterial suspension ใส่ในหลอด centrifuge ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร และแบ่งส่วนใสที่ผ่านการกรองออกเป็น 2 ส่วน (ส่วนหนึ่งนำไปผ่านความร้อนโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที อีกส่วนหนึ่งไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ) นำส่วนใสแต่ละส่วนที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมาทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราด้วยวิธีการ pour plate โดยนำไปผสมกับอาหาร PDA ที่มีการใส่วุ้นเพิ่มอีก 1.5% ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ วางให้อาหารแข็งตัว แล้วนำเชื้อรา *P. helicoides* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 4 วัน

มาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อดังกล่าว สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนส่วนใส ทำการทดลอง 4 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราจากสูตร (Gamaliel *et al.*, 1989) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 100 - \frac{(r^2 \times 100)}{R^2}$$

$r$  = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของราชุดทดสอบ

$R$  = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของราชุดควบคุม

#### 4.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium helicoides* ในอาหารเหลว PDB

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่ผ่านการคัดเลือก มาเลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เชื้อแบคทีเรีย จำนวน 2 หลู ลงเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว PDB ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงย้ายเชื้อรา *P. helicoides* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 4 วัน โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ดังกล่าว จำนวน 2 ชิ้นต่อ 1 ขวด แล้วนำมาวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (horizontal shaker) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา *P. helicoides* ดังกล่าว สำหรับชุดควบคุมใช้ขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว PDB ที่เพาะเลี้ยงเฉพาะเชื้อรา *P. helicoides* เพียงอย่างเดียว ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เมื่อวางเลี้ยงครบ 10 วัน กรองเอาเฉพาะส่วนเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides* เพื่อนำเอาไป อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปชั่งเพื่อนำน้ำหนักแห้ง

จากนั้นคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. helicoides* ไปทำการคัดเลือกคุณสมบัติที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์

#### 4.5 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์

##### 4.5.1 การทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 4.2 มาทดสอบเพื่อดูลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง PDA โดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์มา streak บนอาหาร PDA บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สังเกตและบันทึกการเจริญเติบโต

#### 4.5.2 การตรวจดูลักษณะและวัดขนาดสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 4.2 มาหมักแอมแกรมเพื่อดูลักษณะและวัดขนาดของสปอร์ โดยนำเชื้อมา smear บนสไลด์บางๆ รอให้แห้ง แล้วนำไป fixed ด้วยการผ่านสไลด์บนเปลวไฟเร็วๆ 2-3 ครั้ง จากนั้นหยดสารละลาย crystal violet ลงบนเชื้อที่ smear ไว้ ทิ้งไว้นาน 1 นาที นำไปล้างด้วยน้ำไหล แล้วหยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วบริเวณที่เคลือบเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ และหยด 95% ethanol ลงไปอย่างรวดเร็ว แล้วล้างแอลกอฮอล์ออกด้วยน้ำ จากนั้นหยด safranin O ลงไปให้ท่วม ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ รอนแห้งจึงนำไปตรวจดูลักษณะและวัดขนาดของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

#### 4.5.3 การทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร PDA

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือก มาทดสอบความเข้ากันได้ โดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA โดยปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่หนึ่ง ให้เป็นเส้นตรง 1 เส้น ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ แล้วปลูกเชื้อแบคทีเรียอีกสายพันธุ์เป็นเส้นขนาน ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร ทั้งสองด้านของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่หนึ่ง ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) ตรวจผลการทดลองเมื่อครบ 3 และ 7 วัน

#### 4.5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการผลิตฮอร์โมน IAA

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงเลี้ยงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร NB ปริมาตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษ nitrocellulose ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (ที่ผ่านการ sterile แล้ว) ที่วางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผสมกับสาร L-TRP (ความเข้มข้น 5 mM) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบการผลิต IAA โดยนำกระดาษ nitrocellulose ที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ วางลงในจานเลี้ยงเชื้อเปล่า แล้วหยดสาร Salkowski reagent ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษ nitrocellulose บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 15-20 นาที บันทึกผล ถ้าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิต IAA ได้ จะเกิดสีชมพูบนกระดาษ nitrocellulose บันทึกผลเป็นบวก (+) และถ้าเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบไม่สามารถผลิต IAA ได้ จะเกิดสีเหลืองของ reagent บนกระดาษ nitrocellulose บันทึกผลเป็นลบ (-)

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. helicoides* ได้ดีที่สุด จำนวน 3 สายพันธุ์เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำและของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น สำหรับใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ต่อไป

#### 4.6 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือก มาจำแนกชนิดของเชื้อ โดยการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S ribosomal RNA gene ทั้งสาย Forward และ Reverse ด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI

#### 4.7 การเตรียมและประเมินผลชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

##### 4.7.1 การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือก มาเลี้ยงไว้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อลงในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 99 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และปิเปตเชื้อมีค่าปริมาตร 2 มิลลิลิตร เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ปริมาตรขวดละ 50 มิลลิลิตร โดยให้น้ำเลี้ยงเชื้อเคลือบบนผิวอาหารให้ทั่ว นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ทำการเก็บสปอร์ของเชื้อ โดยการล้างสปอร์ที่เจริญบนอาหาร PDA ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2-3 ครั้ง นำสปอร์ไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำลาย vegetative cell แล้วนับจำนวนสปอร์ด้วยวิธี drop plate บนอาหาร plate count agar (PCA) และเก็บสปอร์ไว้ในตู้เย็นเพื่อเตรียมชีวภัณฑ์ต่อไป

##### 4.7.2 การเตรียมชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

เตรียมชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำโดยนำส่วนประกอบต่างๆ ได้แก่ alginate, polyvinylpyrrolidone (PVP), starch paste, corn starch, lactose monohydrate, และสปอร์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในอัตราส่วนตามตารางที่ 4.1 ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมจนมีลักษณะเป็นก้อนหยาบพอเหมาะ นำไปผ่านร่อนเบอร์ 16 กดให้ส่วนผสมออกมาเป็นแกรนูล แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำชีวภัณฑ์ที่ได้ไปประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ

#### ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบของชีวภัณฑ์แกรนูลอนละลายน้ำ

| สูตรที่ | PVP<br>(g) | lactose<br>(g) | Starch paste<br>(g) | Corn starch<br>(g) | Alginate<br>(g) | น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ<br>(ml) |
|---------|------------|----------------|---------------------|--------------------|-----------------|--------------------------|
| 1       | -          | 95             | -                   | -                  | 5               | 27                       |
| 2       | 5          | 85             | -                   | -                  | 10              | 27                       |
| 3       | 5          | 85             | -                   | -                  | 10              | 27                       |
| 4       | -          | -              | 29                  | 85                 | 5               | -                        |
| 5       | -          | -              | 20                  | 95                 | -               | -                        |
| 6       | 1          | 99             | -                   | -                  | -               | 18                       |
| 7       | 3          | 97             | -                   | -                  | -               | 18                       |
| 8       | 5          | 95             | -                   | -                  | -               | 18                       |

#### 4.7.3 การประเมินผลชีวภัณฑ์แกรนูลอนละลายน้ำ

##### 4.5.3.1 การประเมินสมบัติทางกายภาพของชีวภัณฑ์แกรนูลอนละลายน้ำ

1) ทดสอบความสามารถในการละลายน้ำ โดยนำชีวภัณฑ์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แท่งแม่เหล็กคน ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งชีวภัณฑ์ละลายหมด บันทึกระยะเวลาในการละลายน้ำและลักษณะสารละลายที่ได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

2) วัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง นำชีวภัณฑ์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้ววัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

คัดเลือกสูตรที่สามารถละลายน้ำได้รวดเร็ว ได้สารละลายใส ไม่มีตะกอน และมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างไม่สูงหรือต่ำเกินไป นำไปทดสอบค่าความกร่อนและความหนาแน่นต่อไป

3) วัดค่าความกร่อน (friability) โดยใส่ตัวอย่างชีวภัณฑ์แกรนูลอนจำนวน 10 กรัมในเครื่องวัดความกร่อน Roche Friabilator ใช้ความเร็ว 25 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 นาที จากนั้นนำไปผ่านร่อนเบอร์ 18 แล้วชั่งน้ำหนักส่วนที่อยู่บนร่อน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความกร่อนของแกรนูลอน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

4) การวัดค่าความหนาแน่น (density) นำแกรนูลอนมาบรรจุในกระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร ตั้ง Jolting apparatus ให้เคาะ 3 ครั้ง ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ อ่านปริมาตรและชั่งน้ำหนัก แล้วคำนวณหาความหนาแน่น จากสูตร  $d = m/v$  เมื่อ  $d$  คือ ความหนาแน่น (กรัม/มล.)  $m$  คือ มวลสาร (กรัม) และ  $v$  คือ ปริมาตรของสาร (มล.)

จากนั้นคัดเลือกชีวภัณฑ์สูตรที่ดีที่สุดไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ

#### 4.5.3.2 การประเมินสมบัติทางชีวภาพของชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

1) ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรียปฏิบัฏ์ในชีวภัณฑ์ ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียปฏิบัฏ์ในชีวภัณฑ์ โดยสุ่มวัด 3 ครั้ง แล้วนำมา drop plate บนอาหาร plate count agar (PCA) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี และคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียปฏิบัฏ์ทั้งหมดในชีวภัณฑ์ (cfu ต่อกรัม)

2) การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์ในชีวภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์

เนื่องจากในระหว่างการทดลองเชื้อรา *P. helicoides* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่าที่แยกได้จากผักสลัดที่เป็นโรครากเน่า เกิดการปนเปื้อนและนำมาเลี้ยงต่อไม่ได้ ทางผู้ดำเนินการวิจัยจึงทำการคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าในระบบการปลูกพืชไฮโดรโปนิกส์ใหม่ ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อราได้เป็นเชื้อรา *Aphanomyces* sp. จึงนำเชื้อราสายพันธุ์นี้มาใช้ในการทดสอบ โดยนำชีวภัณฑ์แกรนูลมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมา pour plate ด้วยอาหาร PDA เมื่ออาหารแข็งดีแล้ว นำชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อรา *Aphanomyces* sp. มาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อที่ทำการ pour plate ไว้แล้ว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-4 วัน แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ) และหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Aphanomyces* sp. ตามสูตรเช่นเดียวกับข้อ 4.2.2

### 4.8 การเตรียมและประเมินผลชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัฏ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

#### 4.8.1 การเตรียมชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

เตรียมชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นโดยนำสปอร์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิบัฏ์ ผสมกับสารแขวนตะกอนชนิดต่างๆ ได้แก่ xanthan gum (5% w/v) sodium alginate (5% w/v) และ sodium carboxy methylcellulose (CMC) (2.5% w/v) ในอัตราส่วนตามตารางที่ 4.2 ผสมให้เข้ากันดีด้วยแท่งแม่เหล็กคน ที่ความเร็ว 700 รอบต่อนาที จากนั้นนำชีวภัณฑ์ที่ได้ไปประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ

ตารางที่ 4.2 ส่วนประกอบของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

| สูตรที่ | Spore (ml.) | Water (ml.) | CMC (g) | Xanthan (g) | Alginate (g) |
|---------|-------------|-------------|---------|-------------|--------------|
| F1      | 40          | 60          | -       | -           | -            |
| F2      | 40          | 40          | 20      | -           | -            |
| F3      | 40          | 30          | 30      | -           | -            |
| F4      | 40          | 50          | -       | 10          | -            |
| F5      | 40          | 40          | -       | 20          | -            |
| F6      | 40          | 50          | -       | -           | 10           |
| F7      | 40          | 40          | -       | -           | 20           |

#### 4.8.2 การประเมินผลสมบัติทางกายภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

##### 1) ปริมาตรการตกตะกอน (sedimentation volumn)

นำชีวภัณฑ์ทั้ง 7 สูตรที่เตรียมได้ ใส่ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร วางไว้ในอุณหภูมิห้อง (26-30 องศาเซลเซียส) เก็บผลการทดลองโดยการวัดความสูงของตะกอน ที่เวลา 0 ชั่วโมง, 4 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ เก็บผลทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ ทำการทดลองสูตรละ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย และคำนวณปริมาณของการตกตะกอนได้จากสมการดังนี้

$$F = H_u/H_0$$

$F$  = ปริมาตรของการตกตะกอน (sedimentation volume)

$H_u$  = ส่วนสูงสุดท้ายของตะกอนเมื่อวางทิ้งไว้ระยะเวลาหนึ่ง

$H_0$  = ส่วนสูงเริ่มต้นก่อนการตกตะกอนหรือส่วนสูงทั้งหมดก่อนการตกตะกอน

##### 2) การกระจายตัวคืนรูป (redispersibility) ของชีวภัณฑ์

นำชีวภัณฑ์ทั้ง 7 สูตร วางทิ้งไว้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำชีวภัณฑ์แต่ละสูตรใส่หลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร วางไว้ในอุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกลักษณะทางกายภาพ แล้วทำการกลับหลอดเป็นมุม 360 องศา จนกลับคืนสภาพเป็นของเหลวแขวนตะกอน บันทึกจำนวนครั้งที่ทำการกลับหลอด วัดค่า 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

#### 4.8.3 การประเมินผลสมบัติทางชีวภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

นำชีวภัณฑ์ที่เตรียมได้ไปทดสอบสมบัติทางชีวภาพ ได้แก่ การนับจำนวนแบคทีเรียปฏิบัฏในชีวภัณฑ์และการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ ซึ่งทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4.5.3.2

#### 4.9 การทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะในชีวภัณฑ์ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องที่เวลาต่างๆ

ทำการทดสอบการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียปฏิชีวนะในชีวภัณฑ์แกรนูลและชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอน หลังจากเก็บรักษาชีวภัณฑ์ไว้ในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 8 สัปดาห์ จนครบ 6 เดือน โดยตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะด้วยวิธีการ drop plate บนอาหาร PCA นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้งหมดในชีวภัณฑ์

#### 4.10 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับพืชในห้องปฏิบัติการ

##### 4.10.1 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 1

ทำการเพาะกล้าผักสลัด (*Lactuca sativa*) เมื่อต้นกล้าอายุได้ 14 วัน ย้ายต้นกล้าไปวางบนฟองน้ำที่มีชั้น潤ของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ *Pythium aphanidermatum* วางอยู่ แล้วนำไปวางปลูกบนถาดเพาะกล้าอันใหม่ จากนั้นจึงดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์กับพืช โดยกำหนดให้มี 4 กรรมวิธีการทดลอง ดังนี้ กรรมวิธีทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุม คือต้นกล้าที่รดด้วยน้ำ กรรมวิธีทดลองที่ 2 คือต้นกล้าที่รดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่ไม่ได้ใส่เชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% Blank SC) กรรมวิธีทดลองที่ 3 คือต้นกล้าที่รดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* จำนวน  $10^{12}$  CFU /ml (1% SC) และกรรมวิธีทดลองที่ 4 คือต้นกล้าที่รดด้วยเซลล์สดของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* จำนวน  $10^{14}$  CFU /ml (1% fresh cell) โดยทั้ง 4 กรรมวิธีการทดลองได้รับของเหลวกรรมวิธีทดลองละ 500 ml (โดยแต่ละกรรมวิธีทดลองมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยกล้าผักสลัดจำนวน 4 ต้น) ทำการเช็คผลการทดลองโดยนับจำนวนต้นกล้าที่มีชีวิตภายหลังการรดของเหลว 15 และ 30 วันตามลำดับ

##### 4.10.2 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 2

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 2 จะดำเนินการโดยการเตรียมต้นกล้าและการกำหนดกรรมวิธีทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 1 แต่มีข้อแตกต่างจากการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 1 คือ จะทำการย้ายต้นกล้าอายุ 14 วัน ลงในกล่องพลาสติก (ขนาด 18 x 27 x 10 ซม. ที่มีน้ำปริมาตร 2 ลิตร และมีชั้น潤ของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ *P. aphanidermatum* เจริญ จำนวน 6 ชั้น ลอยอยู่) โดยทั้ง 4 กรรมวิธีทดลองได้รับของเหลวกรรมวิธีทดลองละ 1 ลิตร (แต่ละกรรมวิธีทดลองมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีกล้าผักสลัดจำนวน 12 ต้น) ทำการเช็คผลการทดลอง 2 ลักษณะ คือในลักษณะที่หนึ่งทำโดยนับจำนวนต้นกล้าที่มีชีวิตภายหลังการย้ายต้นกล้าลงในกล่องพลาสติก 30 วัน และในลักษณะที่สองทำโดยนับจำนวนปลายรากของพืชที่พบมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุ *P. aphanidermatum* ภายหลังจากที่นำปลายรากของพืช (จำนวน 10 ชิ้นต่อต้น) ในแต่

กรรมวิธีทดลองมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ปลายรากที่พบการเจริญของเชื้อราสาเหตุ *P. aphanidermatum* 1 วันภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

#### 4.11 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับพืชในโรงเรือนปลูกพืชระบบ dynamic root floating technique (DRFT)

##### 4.11.1 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในการควบคุมและป้องกันโรครากเน่าของผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Red coral)

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Red coral) ที่รากเป็นโรครากเน่าและมีอาการรุนแรงแล้ว (โรคเกิดจากเชื้อราสาเหตุที่ปรากฏในระบบ DRFT อยู่แล้ว และไม่มีการปลูกใส่เชื้อราสาเหตุเพิ่มเติม) ทำการทดลองโดยฉีดพ่นชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นไปที่รากของผักที่มีอายุปลูก 38 วันในระบบ DRFT การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับพืช กำหนดให้มี 4 กรรมวิธีทดลองโดยกรรมวิธีทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุม คือรากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยน้ำ กรรมวิธีทดลองที่ 2 คือรากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% Blank SC) กรรมวิธีทดลองที่ 3 คือรากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่ใส่เชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* จำนวน  $10^{13}$  CFU/ml (1% SC) และกรรมวิธีทดลองที่ 4 คือ รากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยเซลล์สดของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* จำนวน  $10^{14}$  CFU/ml (1% fresh cell) โดยทั้ง 4 กรรมวิธีทดลองได้รับของเหลวชุดทดลองละ 1500 ml (แต่ละกรรมวิธีทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำได้รับของเหลว 500 ml และมีกล้าผักสลัดจำนวน 25 ต้น) ทำการเก็บผลการทดลอง 7 วันภายหลังการฉีดพ่น โดยการชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และนับจำนวนปลายรากของพืชที่พบมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุ *P. aphanidermatum* ภายหลังจากที่นำปลายรากของพืช (จำนวน 10 ชิ้นต่อต้น) ในแต่ละชุดการทดลองมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ปลายรากที่พบการเจริญของเชื้อราสาเหตุ *P. aphanidermatum* 1 วัน ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

##### 4.11.2 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในการควบคุมและป้องกันโรครากเน่าของผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Green oak)

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Green oak) ทำเช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น กับผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Red coral) โดยมีความแตกต่างคือรากของผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Green oak) มีลักษณะสีขาว ปกติ ไม่มีอาการของโรครากเน่า ไม่มีอาการรอยแผลหรืออาการเน่าปรากฏให้เห็น (อย่างไรก็ตามโรงเรือนที่ใช้ในการทดลองมีประวัติการเกิดโรครากเน่ากับผักสลัดที่ปลูกในระบบ DRFT อยู่

แล้ว จึงไม่มีการปลูกใส่เชื้อราสาเหตุเพิ่มเติมเช่นกัน) การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับพืช ทำการทดสอบโดยกำหนดให้มี 4 กรรมวิธีทดลองดังนี้ กรรมวิธีทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุม คือรากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยน้ำ กรรมวิธีทดลองที่ 2 คือรากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% Blank SC) กรรมวิธีทดลองที่ 3 คือรากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* จำนวน  $10^{13}$  CFU/ml (10% SC) และกรรมวิธีทดลองที่ 4 คือ รากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยเซลล์สดของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* จำนวน  $10^{14}$  CFU/ml (1% fresh cell) โดยทั้ง 4 กรรมวิธีทดลองได้รับของเหลวกรรมวิธีทดลองละ 1000 ml (แต่ละกรรมวิธีทดลองมี 2 ซ้ำ แต่ละซ้ำได้รับของเหลว 500 ml และ มีกล้าผักสลัดจำนวน 25 ต้น) ทำการเช็คผลการทดลอง 7 วันภายหลังการฉีดพ่น โดยการชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และนับจำนวนปลายรากของพืชที่พบมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุ *P. aphanidermatum* ภายหลังจากที่นำปลายรากของพืช (จำนวน 10 ชิ้นต่อต้น) ในแต่ละกรรมวิธีทดลองมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ปลายรากที่พบการเจริญของเชื้อราสาเหตุ *P. aphanidermatum* 1 วัน ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA

#### 4.11.3 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดกวางตุ้ง (*Brassica campestris* var. *chinensis*)

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดกวางตุ้ง (*B. campestris* var. *chinensis*) มีกรรมวิธีทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในการควบคุมและป้องกันโรครากเน่าของผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Red coral และสายพันธุ์ Green oak) โดยมีความแตกต่างคือการใส่ของเหลวในแต่ละกรรมวิธีทดลอง ด้วยการใช้อัตโนมัติ pipette หยดของเหลวปริมาตร 5 ml ลงไปยังบริเวณโคนต้นกล้าของผักกาดกวางตุ้ง มีอายุปลูก 14 วันในระบบ DRFT

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดกวางตุ้ง กำหนดให้มี 4 กรรมวิธีทดลอง โดยกรรมวิธีทดลองที่ 1 คือต้นกล้าผักกาดกวางตุ้งที่หยดด้วยน้ำเป็นชุดควบคุม กรรมวิธีทดลองที่ 2 คือต้นกล้าผักกาดกวางตุ้งที่หยดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% Blank SC) กรรมวิธีทดลองที่ 3 คือต้นกล้าผักกาดกวางตุ้งที่หยดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* จำนวน  $10^{13}$  CFU/ml (1% SC) และกรรมวิธีทดลองที่ 4 คือต้นกล้าผักกาดกวางตุ้งที่หยดด้วยเซลล์สดของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* จำนวน  $10^{14}$  CFU/ml (1% fresh cell) (แต่ละกรรมวิธีทดลองมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีกล้าผักกาดกวางตุ้งจำนวน 25 ต้น) ทำการเช็คผลการทดลอง 14 วันภายหลังการหยดของเหลว โดยการวัดความยาวต้น ความยาวราก ชั่งน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง

## 5. ผลการทดลองและวิจารณ์

### 5.1 การเก็บตัวอย่างโรคพืช การแยกเชื้อราสาเหตุโรค และการจำแนกชนิด

แหล่งปลูกผักที่ปลูกด้วยระบบไฮโดรโปนิกส์ในรูปแบบต่างๆ ที่พบเชื้อราก่อโรค *Pythium* spp. และ *Aphanomyces* sp. จากพืชปลูกในขณะทำการเก็บตัวอย่าง พบเป็นเชื้อรา *Pythium* sp. จำนวน 16 isolates และ *Aphanomyces* sp. จำนวน 1 isolate รวมจำนวน 17 isolates (ตารางที่ 5.1)

ตารางที่ 5.1 จังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างพืชปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ต่างๆ ที่พบเชื้อราก่อโรคและใช้ในการทดสอบ

| สถานที่เก็บตัวอย่าง             | ระบบปลูกพืช/พืช             | เชื้อราก่อโรค          |
|---------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| 1. ฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร  | DRFT/butter head            | <i>Pythium</i> sp.     |
| 2. ฟาร์มในจังหวัดสมุทรปราการ    | NFT/butter head             | <i>Pythium</i> sp.     |
| 3. ฟาร์มในจังหวัดสมุทรปราการ    | NFT/butter head             | <i>Pythium</i> sp.     |
| 4. ฟาร์มในจังหวัดนนทบุรี        | NFT/butter head             | <i>Pythium</i> sp.     |
| 5. ฟาร์มในจังหวัดสมุทรปราการ    | NFT/butter head             | <i>Pythium</i> sp.     |
| 6. ฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร  | NFT/cos                     | <i>Pythium</i> sp.     |
| 7. ฟาร์มในจังหวัดสมุทรปราการ    | NFT/cos                     | <i>Pythium</i> sp.     |
| 8. ฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร  | DRFT/green oak              | <i>Pythium</i> sp.     |
| 9. ฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร  | DRFT/green oak              | <i>Pythium</i> sp.     |
| 10. ฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร | NFT/ frillice               | <i>Pythium</i> sp.     |
| 11. ฟาร์มในจังหวัดสมุทรปราการ   | DRFT/ frillice              | <i>Pythium</i> sp.     |
| 12. ฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร | DFRT/red coral              | <i>Pythium</i> sp.     |
| 13. ฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร | DFRT/red coral              | <i>Pythium</i> sp.     |
| 14. ฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร | DRFT/red coral              | <i>Pythium</i> sp.     |
| 15. ฟาร์มในจังหวัดสมุทรปราการ   | NFT/red coral               | <i>Pythium</i> sp.     |
| 16. ฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร | DRFT/red oak                | <i>Pythium</i> sp.     |
| 17. ฟาร์มในจังหวัดเพชรบุรี      | DRFT/water<br>morning glory | <i>Aphanomyces</i> sp. |

## 5.2 การทดสอบการเกิดโรค

การทดสอบการเกิดโรค และความรุนแรงของการเกิดโรครากเน่าในพืชทดสอบ 3 ชนิด คือ butter head, green oak และ red coral พบว่า เชื้อราก่อโรค *Pythium* sp. จากฟาร์มในจังหวัดสมุทรปราการ (ฟาร์มลำดับที่ 7 ในตารางที่ 5.1) เชื้อราก่อโรค *Pythium* sp. จากฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร (ฟาร์มลำดับที่ 9 ในตารางที่ 5.1) เชื้อราก่อโรค *Pythium* sp. จากฟาร์มในจังหวัดสมุทรปราการ (ฟาร์มลำดับที่ 11 ในตารางที่ 5.1) และ เชื้อราก่อโรค *Pythium* sp. จากฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร (ฟาร์มลำดับที่ 12 ในตารางที่ 5.1) ทำให้พืชทดสอบ 3 ชนิด คือ butter head, green oak และ red coral แสดงอาการรากเน่าและต้นพืชมีอาการเหี่ยวถาวร

โดยเชื้อราก่อโรค *Pythium* sp. จากฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร (ฟาร์มลำดับที่ 9 ในตารางที่ 5.1) นอกจากจะทำให้พืชทดสอบ 3 ชนิด คือ butter head, green oak และ red coral แสดงอาการรากเน่าและต้นพืชมีอาการเหี่ยวถาวรแล้ว ยังทำให้ต้นพืชทดสอบแห้งตายด้วย

จากการจำแนกชนิดเชื้อราก่อโรค *Pythium* sp. ทั้ง 4 isolates โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานตามเกณฑ์ที่รายงานโดย Plaats-Niterink (1981) พบว่า เชื้อราก่อโรครากเน่าทั้ง 4 isolates คือ *P. myriotylum*, *P. helicoides*, *P. carolinianum* และ *P. dissotocum* ตามลำดับ (ตารางที่ 5.2)

**ตารางที่ 5.2** ชนิดของเชื้อราก่อโรคที่พบว่าก่อให้เกิดอาการรากเน่าและทำให้เกิดอาการเหี่ยวถาวรกับพืชทดสอบ 3 ชนิด

| สถานที่เก็บตัวอย่าง            | ระบบปลูกพืช/พืช | เชื้อราก่อโรค*         |
|--------------------------------|-----------------|------------------------|
| 1. ฟาร์มในจังหวัดสมุทรปราการ   | NFT/cos         | <i>P. myriotylum</i>   |
| 2. ฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร | DRFT/green oak  | <i>P. helicoides</i>   |
| 3. ในจังหวัดสมุทรปราการ        | DRFT/frillice   | <i>P. carolinianum</i> |
| 4. ฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร | DRFT/red coral  | <i>P. dissotocum</i>   |

\*หมายเหตุ ใช้เชื้อราก่อโรค *P. helicoides* จากฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานครในการทดสอบในขั้นต่อไป โดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการเนื่องจากทำให้พืชทดสอบ 3 ชนิด คือ butter head, green oak และ red coral แสดงอาการรากเน่าและต้นพืชมีอาการเหี่ยวถาวรและต้นพืชตาย ซึ่งเป็นอาการที่รุนแรงกว่าเชื้อราก่อโรคอีก 3 ชนิด

### 5.3 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์

เมื่อนำตัวอย่างรากพืช จากพื้นที่ที่มีการปลูกพืชระบบไฮโดรโปนิกส์ในจังหวัดต่างๆ จำนวนรวม 129 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้เชื้อที่คาดว่าจะจะเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. จำนวน 441 สายพันธุ์ (ตารางที่ 5.3)

ตารางที่ 5.3 จำนวน isolates ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกจากฟาร์มในจังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างที่มีการปลูกพืชไฮโดรโปนิกส์ในระบบต่างๆ

| สถานที่เก็บตัวอย่าง              | ระบบปลูกพืช | จำนวนสายพันธุ์ที่แยกได้จากรากพืช |
|----------------------------------|-------------|----------------------------------|
| 1. ฟาร์มในจังหวัดกรุงเทพมหานคร   | NFT         | 67                               |
| 2. ฟาร์มในจังหวัดอยุธยา          | DRFT        | 69                               |
| 3. ในจังหวัดชลบุรี (เอกชน)       | NFT         | 50                               |
| 4. ฟาร์มในจังหวัดชลบุรี (ราชการ) | DRFT        | 63                               |
| 5. ฟาร์มในจังหวัดนนทบุรี         | NFT         | 126                              |
| 6. ฟาร์มในจังหวัดเพชรบุรี        | DRFT        | 66                               |
| รวม                              |             | 441                              |

จากตารางจะเห็นได้ว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากรากพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ได้จำนวนมาก ดังนั้นรากของพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์จึงถือว่าเป็นแหล่งของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และน่าจะเป็นส่วนของพืชที่ผู้วิจัยสามารถใช้เป็นแหล่งค้นหาเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคพืชหรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยเฉพาะพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ต่อไป

ทั้งนี้การวิจัยนี้เป็นการวิจัยที่จะทำการค้นหาเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ใหม่เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุและพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อใช้ควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์เพื่อเป็นงานวิจัยที่ครอบคลุมและครบวงจร มีรายงานการวิจัยในต่างประเทศที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (Grosch et al. 1999a) และ *Pseudomonas* spp. หรือสารที่ผลิตจากเชื้อชนิดนี้ (De Jonghe et al. 2005a) ในการควบคุมโรคในระบบไฮโดรโปนิกส์

### 5.4 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium helicoides*

#### 5.4.1 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

##### *P. helicoides*

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย (ที่แยกได้จากข้อ 5.3) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides* ในเบื้องต้นด้วยวิธีการ dual culture technique ผลการทดลองพบว่า มีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้จำนวน 72 สายพันธุ์ และโดยในจำนวนนี้มีเชื้อแบคทีเรียที่น่าจะมีศักยภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเส้นใยของเชื้อรา *P. helicoides* จำนวน 20 สายพันธุ์ (ภาพที่ 5.1 และตารางที่ 5.4) โดยทำให้เกิดบริเวณยับยั้งขึ้นระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับเชื้อราสาเหตุ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากบริเวณของชุดควบคุมหรือบริเวณที่เชื้อราไม่สัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียอย่างชัดเจน จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *P. helicoides* ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 5.1 ลักษณะการยับยั้งเชื้อราก่อโรค *P. helicoides* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis*

#### 5.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides*

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 20 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides* มาทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างสารปฏิปักษ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา พบว่าสารปฏิปักษ์ที่ไม่เน่าเหม็นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. จำนวน 6 สายพันธุ์ ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม และเมื่อนำสารปฏิปักษ์ไปเน่าเหม็นเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที พบว่าสารปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ 121 C/4, 123 B/2 และ 029 C/1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดควบคุม โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราเท่ากับ 75.5, 67.0 และ 15.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5.5) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารปฏิปักษ์ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าว สามารถทนต่ออุณหภูมิ (ความร้อน) สูงได้ สอดคล้อง

กับังงานวิจัยของ Von der Weid และคณะ (2003) ที่ศึกษาพบว่าสารปฏิชีวนะของ *Paenibacillus peoriae* มีความคงตัวสูงหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ Leelasuphakul และคณะ (2006) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* NSRS 89-24 สามารถทนต่อความร้อนได้ดี และยังคงยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคของข้าวได้ดี

ตารางที่ 5.4 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่คิดว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพในการเป็นปฏิชีวนะต่อเส้นใยของเชื้อรา *P. helicoides* และพืชที่เป็นแหล่งของเชื้อ

| สายพันธุ์ที่ | รหัส   | สถานที่เก็บตัวอย่าง           | ชนิดของพืชที่นำรากมาใช้แยกแบคทีเรีย        |
|--------------|--------|-------------------------------|--------------------------------------------|
| 1            | 029C/1 | อำเภอบางไทร จังหวัดอยุธยา     | <i>Brassica alboglabra</i>                 |
| 2            | 029C/7 | อำเภอบางไทร จังหวัดอยุธยา     | <i>B. alboglabra</i>                       |
| 3            | 092A/1 | อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี | <i>B. pekinensis</i>                       |
| 4            | 092A/6 | อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี | <i>B. pekinensis</i>                       |
| 5            | 094A/3 | อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี | **                                         |
| 6            | 095A/3 | อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี | **                                         |
| 7            | 097A/1 | อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี | <i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i> |
| 8            | 097A/3 | อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี | <i>L. sativa</i> var. <i>capitata</i>      |
| 9            | 098A/6 | อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี | <i>L. sativa</i> var. <i>longifolia</i>    |
| 10           | 099A/3 | อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี | <i>L. sativa</i> var. <i>longifolia</i>    |
| 11           | 100A/3 | อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี | <i>L. sativa</i>                           |
| 12           | 101A/2 | อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี | <i>L. sativa</i>                           |
| 13           | 101A/5 | อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี | <i>L. sativa</i>                           |
| 14           | 120C/2 | อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี     | <i>B. chinensis</i>                        |
| 15           | 121C/4 | อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี     | <i>B. chinensis</i>                        |
| 16           | 123B/1 | อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี     | <i>Ipomoea aquatica</i>                    |
| 17           | 123B/2 | อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี     | <i>I. aquatica</i>                         |
| 18           | 125A/1 | อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี     | <i>L. sativa</i> var. <i>longifolia</i>    |
| 19           | 128A/3 | อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี     | <i>L. sativa</i> var. <i>crispa</i>        |
| 20           | 129C/1 | อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี     | <i>L. sativa</i> var. <i>crispa</i>        |

ตารางที่ 5.5 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides*

| สายพันธุ์แบคทีเรียปฏิชีวนะ | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>P. helicoides</i> |           |
|----------------------------|---------------------------------------------------------|-----------|
|                            | ไม่เน่าเชื้อ                                            | เน่าเชื้อ |
| 1. 029 C/1                 | 100 a                                                   | 15.0 b    |
| 2. 029 C/7                 | 100 a                                                   | 0 b       |
| 3. 092 A/1                 | 0 b                                                     | 0 b       |
| 4. 092 A/6                 | 15.7 b                                                  | 0 b       |
| 5. 094 A/3                 | 0 b                                                     | 0 b       |
| 6. 095 A/3                 | 0 b                                                     | 0 b       |
| 7. 097 A/1                 | 0 b                                                     | 0 b       |
| 8. 097 A/3                 | 25.0 b                                                  | 0 b       |
| 9. 098 A/6                 | 0 b                                                     | 0 b       |
| 10. 099 A/3                | 0 b                                                     | 0 b       |
| 11. 100 A/3                | 0 b                                                     | 0 b       |
| 12. 101 A/2                | 0 b                                                     | 0 b       |
| 13. 101 A/5                | 0 b                                                     | 0 b       |
| 14. 120 C/2                | 0 b                                                     | 0 b       |
| 15. 121 C/4                | 100 a                                                   | 75.5 a    |
| 16. 123 B/2                | 100 a                                                   | 67.0 a    |
| 17. 125 A/1                | 0 b                                                     | 0 b       |
| 18. 128 A/3                | 0 b                                                     | 0 b       |
| 19. 129 C/1                | 0 b                                                     | 0 b       |
| 20. ชุดควบคุม              | 0 b                                                     | 0 b       |
| F-test                     | **                                                      | **        |
| C.V. (เปอร์เซ็นต์)         | 52.61                                                   | 139.77    |

\*\* แตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.01$  อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

### 5.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium helicoides* ในอาหารเหลว PDB

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. จำนวน 20 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides* มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างชีวมวล (biomass) ของเส้นใยเชื้อราในอาหาร PDB ผลการทดลองพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus* spp. จำนวน 7 สายพันธุ์ ให้ผลในการยับยั้งการสร้างชีวมวล ได้แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม (ตารางที่ 5.6)

ตารางที่ 5.6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของเชื้อรา *P. helicoides* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ

| สายพันธุ์แบคทีเรียปฏิชีวนะ | ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเส้นใยเชื้อรา <i>P. helicoides</i> (กรัม) |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1. 029 C/1                 | 1.34 a-d                                                  |
| 2. 029 C/7                 | 1.11 bcd                                                  |
| 3. 092 A/1                 | 0.95 cd                                                   |
| 4. 092 A/6                 | 1.19 a-d                                                  |
| 5. 094 A/3                 | 1.46 ab                                                   |
| 6. 095 A/3                 | 1.31 a-d                                                  |
| 7. 097 A/1                 | 1.15 bcd                                                  |
| 8. 097 A/3                 | 0.90 d                                                    |
| 9. 098 A/6                 | 1.17 bcd                                                  |
| 10. 099 A/3                | 1.24 a-d                                                  |
| 11. 100 A/3                | 1.54 ab                                                   |
| 12. 101 A/2                | 1.33 a-d                                                  |
| 13. 101 A/5                | 1.46 ab                                                   |
| 14. 120 C/2                | 1.23 a-d                                                  |
| 15. 121 C/4                | 1.41 abc                                                  |
| 16. 123 B/2                | 1.29 a-d                                                  |
| 17. 125 A/1                | 1.16 bcd                                                  |
| 18. 128 A/3                | 0.94 cd                                                   |
| 19. 129 C/1                | 1.47 ab                                                   |
| 20. ชุดควบคุม              | 1.65 a                                                    |
| F-test                     | **                                                        |
| C.V. (เปอร์เซ็นต์)         | 16.78                                                     |

\*\* แตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.01$  อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT



ตารางที่ 5.8 ลักษณะและขนาดของสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

| สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ | ลักษณะของสปอร์ | ขนาดของสปอร์ ( $\mu\text{m}$ ) |
|---------------------------------|----------------|--------------------------------|
| 1. 029 C/1                      | รูปกลม         | 1.07 e                         |
| 2. 029 C/7                      | รูปกลม         | 1.57 cd                        |
| 3. 097 A/3                      | รูปแท่ง        | 1.22 de                        |
| 4. 121 C/4                      | รูปแท่ง        | 1.80 c                         |
| 5. 123 B/2                      | รูปกลม         | 2.26 b                         |
| 6. 129 C/1                      | รูปแท่ง        | 2.69 a                         |
| F-test                          |                | **                             |
| C.V. (%)                        |                | 9.07                           |

\*\* แตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.01$  อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

### 5.5.3 การทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร PDA

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาทดสอบความเข้ากันได้ โดยนำมาเลี้ยงร่วมกันบนอาหารแข็ง PDA ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ 129 C/1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีขนาดสปอร์ยาวที่สุด สามารถเจริญร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ 029 C/1, 121 C/4, 029 C/7 และ 097 A/3 ได้โดยไม่เกิดการยับยั้ง (ตารางที่ 5.9)

ทั้งนี้การทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และพบการเข้าได้ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ 029 C/1, 121 C/4, 029 C/7 และ 097 A/3 จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาชีวภัณฑ์ที่มีเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดร่วมกันในผลิตภัณฑ์เดียว โดยเชื้อแบคทีเรียที่แต่ละชนิดอาจมีกลไกที่แตกต่างกันและร่วมกันป้องกันโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อให้การใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรียเกิดประโยชน์สูงสุด ทั้งนี้งานวิจัยที่มีรายงานมาก่อนมีการใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งในการทดลองกับพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ เท่านั้น (Grosch *et al.*, 1999a; De Jonghe *et al.*, 2005a; Liu *et al.*, 2007)

ตารางที่ 5.9 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการเจริญร่วมกันบนอาหารแข็ง PDA

| สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ | ระยะระหว่างเชื้อ (ชม.) |       | ผลการเจริญร่วมกัน |
|------------------------------------|------------------------|-------|-------------------|
|                                    | 3 วัน                  | 7 วัน |                   |
| 1. 029 C/1 และ 123 B/2             | 0.53                   | 0.45  | ยับยั้ง           |
| 2. 029 C/1 และ 121 C/4             | 0.30                   | 0.30  | ยับยั้ง           |
| 3. 029 C/1 และ 029 C/7             | 0.52                   | 0.43  | ยับยั้ง           |
| 4. 029 C/1 และ 129 C/1             | 0.17                   | 0.00  | เข้ากันได้        |
| 5. 029 C/1 และ 097 A/3             | 0.32                   | 0.33  | ยับยั้ง           |
| 6. 123 B/2 และ 121 C/4             | 0.18                   | 0.12  | เข้ากันได้        |
| 7. 123 B/2 และ 029 C/7             | 0.52                   | 0.47  | ยับยั้ง           |
| 8. 123 B/2 และ 129 C/1             | 0.40                   | 0.35  | ยับยั้ง           |
| 9. 123 B/2 และ 097 A/3             | 0.07                   | 0.00  | เข้ากันได้        |
| 10. 121 C/4 และ 029 C/7            | 0.27                   | 0.27  | เข้ากันได้        |
| 11. 121 C/4 และ 129 C/1            | 0.25                   | 0.07  | เข้ากันได้        |
| 12. 121 C/4 และ 097 A/3            | 0.00                   | 0.00  | เข้ากันได้        |
| 13. 029 C/7 และ 129 C/1            | 0.03                   | 0.00  | เข้ากันได้        |
| 14. 029 C/7 และ 097 A/3            | 0.00                   | 0.00  | เข้ากันได้        |
| 15. 129 C/1 และ 097 A/3            | 0.00                   | 0.00  | เข้ากันได้        |

#### 5.5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ในการผลิตฮอร์โมน IAA

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 6 สายพันธุ์ มาทดสอบคุณสมบัติในการผลิตฮอร์โมน IAA พบว่า เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ 121C/4 และ 129 C/1 สามารถผลิตฮอร์โมน IAA ได้ดี ดังแสดงในตารางที่ 5.10 การพบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ 121C/4 และ 129 C/1 สามารถผลิตฮอร์โมน IAA ได้ดี เป็นโอกาสที่จะขยายผลการใช้ชีวภัณฑ์ที่มีเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ได้กว้างขวาง และเกิดประโยชน์มากยิ่งขึ้น ทั้งนี้หากใช้ชีวภัณฑ์ที่มีเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ในระบบการปลูกพืชไฮโดรโปนิกส์จะสามารถช่วยป้องกันควบคุมโรค และส่งเสริมการเกิดเติบโตของพืชในขณะเดียวกัน และผลของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติทั้ง 2 ลักษณะนี้ในชีวภัณฑ์จะช่วยให้ความเสียหายที่เกิดกับผลผลิตมีน้อยลง ทั้งนี้รายงานส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ในต่างประเทศมักจะใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณลักษณะเพียงแบบใดแบบหนึ่งเท่านั้น (Liu *et al.*, 2007)

**ตารางที่ 5.10** ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คิดว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีคุณสมบัติในการผลิตฮอร์โมน IAA

| รหัสสายพันธุ์ | คุณสมบัติการผลิตฮอร์โมน IAA* |
|---------------|------------------------------|
| 1. 029 C/1    | -                            |
| 2. 029 C/7    | -                            |
| 3. 097 A/3    | -                            |
| 4. 121 C/4    | +                            |
| 5. 123 B/2    | -                            |
| 6. 129 C/1    | +                            |

\*หมายเหตุ การทดสอบในเชิงคุณภาพเบื้องต้นว่าเชื้อที่ได้ทำการทดสอบผลิตฮอร์โมน IAA หรือไม่ โดย (-) หมายถึง เชื้อไม่มีคุณสมบัติผลิตฮอร์โมน IAA และ (+) หมายถึง เชื้อมีคุณสมบัติผลิตฮอร์โมน IAA

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ 129C/1 มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่า สามารถเจริญเติบโตได้ดีและเร็ว มีลักษณะสปอร์และขนาดสปอร์ที่เหมาะสม ดังนั้นเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงในการนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ไปควบคุมโรครากเน่าในสภาพธรรมชาติ เช่นเดียวกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์แบคทีเรียรูปแบบแกรนูลละลายน้ำและของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น สำหรับใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ต่อไป

## 5.6 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์

จากการนำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.3 จำนวน 6 สายพันธุ์ มาจำแนกชนิดของเชื้อโดยการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S ribosomal RNA gene ทั้งสาย Forward และ Reverse ด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ ได้ผลการจำแนกชนิดเชื้อดังแสดงในตารางที่ 5.11

ตารางที่ 5.11 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides* โดยการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S ribosomal RNA gene

| สายพันธุ์ที่ | รหัสสายพันธุ์ | สกุลและชนิดของแบคทีเรีย*          | ชนิดของพืชที่นำแยกแบคทีเรีย           |
|--------------|---------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| 1            | 029C/1        | <i>Paenibacillus polymyxa</i>     | <i>Brassica alboglabra</i>            |
| 2            | 029C/7        | <i>P. polymyxa</i>                | <i>B. alboglabra</i>                  |
| 3            | 097A/3        | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | <i>L. sativa</i> var. <i>capitata</i> |
| 4            | 121C/4        | <i>P. polymyxa</i>                | <i>B. chinensis</i>                   |
| 5            | 123B/2        | <i>P. polymyxa</i>                | <i>I. aquatica</i>                    |
| 6            | 129C/1        | <i>B. velezensis</i>              | <i>L. sativa</i> var. <i>crispa</i>   |

\*หมายเหตุ ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA ทั้งสาย Forward และ Reverse ด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI แสดงในภาคผนวก (1)

## 5.7 การเตรียมและประเมินผลชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิสัมพันธ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

### 5.7.1 การเตรียมชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิสัมพันธ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

จากการนำสารประกอบต่างๆ ได้แก่ alginate, polyvinylpyrrolidone (PVP), starch paste สารช่วยแตกตัว corn starch สารเจือจาง lactose monohydrate อัตราส่วนต่างๆ ผสมกับสปอร์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ *B. velezensis* พบว่าสามารถผลิตชีวภัณฑ์ได้ทั้งหมด 8 สูตร ชีวภัณฑ์แต่ละสูตรมีลักษณะเป็นแกรนูลสม่ำเสมอ สีขาวนวล ดังรูปที่ 5.2



ภาพที่ 5.2 ลักษณะของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิสัมพันธ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ สูตรที่ 8

### 5.7.2 การประเมินผลชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

#### 5.7.2.1 การประเมินสมบัติทางกายภาพของชีวภัณฑ์

จากการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของชีวภัณฑ์ทั้ง 8 สูตร พบว่า มีคุณสมบัติการละลายน้ำที่แตกต่างกัน ทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการละลาย และลักษณะสารละลายที่ได้ (ตารางที่ 5.12) โดยสูตรที่ประกอบด้วยสารยึดเกาะเป็น alginate หรือ starch paste (สูตรที่ 1-5) จะใช้เวลาในการละลายน้ำนานกว่าสูตรที่ไม่มีสารยึดเกาะ (สูตรที่ 6-8) และสูตรที่ประกอบด้วยสารช่วยแตกตัว PVP (สูตรที่ 2-3 และ 6-8) หรือ corn starch (สูตรที่ 4-5) จะช่วยเร่งการแตกกระจายตัวของแกรนูล เป็นผลให้ใช้เวลาในการละลายน้ำน้อยกว่า ส่วนลักษณะสารละลายที่ได้ หลังจากแกรนูลละลายจะมีลักษณะใส ยกเว้นสูตรที่ใช้ starch paste และ corn starch (สูตรที่ 4-5) ซึ่งเป็นผลจากคุณสมบัติของแป้งที่ละลายน้ำได้น้อย ส่วนค่าความเป็นกรดของสารละลายของสูตรสำเร็จทั้งหมด มีค่าอยู่ในช่วงกรดอ่อน คือ อยู่ในช่วงประมาณ 5.0-6.3 จากผลการประเมินในตารางที่ 5.12 จึงคัดเลือกสูตรที่ 6-8 ซึ่งมีคุณสมบัติการละลายเร็วไม่แตกต่างกันไปประเมินคุณสมบัติความกร่อนและความหนาแน่นต่อไป

จากผลการประเมินคุณสมบัติความกร่อนและความหนาแน่นของแกรนูลสูตรที่ 6-8 ตามตารางที่ 5.13 พบว่าแกรนูลมีความหนาแน่นใกล้เคียงกัน แต่มีคุณสมบัติความกร่อนแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยสูตรที่มีสัดส่วนของ PVP มากกว่า มีความกร่อนน้อยลง ทั้งนี้ นอกจาก PVP ทำหน้าที่เป็นสารช่วยแตกกระจายตัวแล้ว ยังมีคุณสมบัติช่วยเพิ่มการเกาะกันของผงยาในแกรนูลทำให้แกรนูลมีความแข็งแรง ไม่แตกกร่อนง่าย ระหว่างการขนส่งและการนำไปใช้ จึงเลือกสูตรที่ 8 ไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพต่อไป

ตารางที่ 5.12 ผลการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของแกรนูลในแต่ละสูตร

| สูตรที่  | pH            | การละลายน้ำ (นาที) | ลักษณะสารละลาย     | ลักษณะแกรนูล   |
|----------|---------------|--------------------|--------------------|----------------|
| 1        | 6.29 ± 0.04 a | 30.00 ± 0.01 a     | ใส มีตะกอนเล็กน้อย | จับตัวกันแน่น  |
| 2        | 6.13 ± 0.01 b | 18.06 ± 0.04 b     | ใส มีตะกอนเล็กน้อย | จับตัวกันแน่น  |
| 3        | 5.78 ± 0.01 c | 15.31 ± 0.02 c     | ใส มีตะกอนเล็กน้อย | จับตัวกันแน่น  |
| 4        | 5.72 ± 0.01 d | 8.30 ± 0.00 d      | ขาวขุ่น            | แตกกระจายได้ดี |
| 5        | 5.69 ± 0.04 d | 2.66 ± 0.16 e      | ขาวขุ่น            | แตกกระจายได้ดี |
| 6        | 5.49 ± 0.01 e | 1.86 ± 0.07 e      | ใส                 | แตกกระจายได้ดี |
| 7        | 5.34 ± 0.01 f | 1.52 ± 0.92 ef     | ใส                 | แตกกระจายได้ดี |
| 8        | 5.05 ± 0.02 g | 1.25 ± 0.84 ef     | ใส                 | แตกกระจายได้ดี |
| F-test   | **            | **                 |                    |                |
| C.V. (%) | 0.44          | 5.54               |                    |                |

\*\* แตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.01$  อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

ตารางที่ 5.13 ผลการประเมินความกรอบและความหนาแน่นของแกรนูล

| สูตรที่  | ค่าความกรอบ (%) | ค่าความหนาแน่น (กรัม/มล.) |
|----------|-----------------|---------------------------|
| 6        | 22.8 ± 0.7 a    | 0.82 ± 0.03 a             |
| 7        | 15.4 ± 0.7 b    | 0.76 ± 0.00 b             |
| 8        | 8.3 ± 0.1 c     | 0.75 ± 0.02 b             |
| F-test   | **              | **                        |
| C.V. (%) | 3.72            | 2.73                      |

\*\* แตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.01$  อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

### 5.7.2.2 การประเมินสมบัติทางชีวภาพของชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

เมื่อนำชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำสูตรที่ 8 มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ โดยนับจำนวนแบคทีเรียปฏิบัณท์ในชีวภัณฑ์และการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ *B. velezensis* มีชีวิตรอดในปริมาณสูง ( $10^{10}$  cfu/g) และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุได้ดี มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5.14)

ตารางที่ 5.14 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์แกรนูลละลายน้ำและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ

| ชีวภัณฑ์แกรนูลละลายน้ำ | ปริมาณแบคทีเรียในชีวภัณฑ์<br>(cfu/g) | การยับยั้งเชื้อรา <i>Aphanomyces</i> sp.<br>(%) |
|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <i>B. velezensis</i>   | $2.38 \times 10^{10}$                | 96.00                                           |

## 5.8 การเตรียมและประเมินผลชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัณท์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

### 5.8.1 การเตรียมชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัณท์ที่เตรียมได้จาก Sodium alginate, Sodium CMC, Xanthan gum ผสมกับสปอร์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ *B. velezensis* พบว่าสามารถผลิตชีวภัณฑ์ได้ทั้งหมด 7 สูตร ชีวภัณฑ์ในแต่ละสูตรมีลักษณะเป็นของเหลว สีครีมขุ่น (ภาพที่ 5.3) กลิ่นมีความคล้ายคลึงกับสปอร์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ และมีความหนืดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสารที่ใช้ผสม โดยสามารถเรียงลำดับความหนืดมากจนไปถึงน้อยดังนี้ สูตรผสม Xanthan gum (F5, F4) สูตรผสม Sodium CMC (F3, F2) และสูตรผสม Sodium alginate (F7, F6) ตามลำดับ



ภาพที่ 5.3 ลักษณะของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

#### 5.8.2 การประเมินผลสมบัติทางกายภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

เมื่อวางชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. velezensis* รูปแบบของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นไว้ในอุณหภูมิห้องตามเวลาที่กำหนด จะพบการตกตะกอนแยกชั้นของสูตร F1-F3 และ F6-F7 (ตารางที่ 5.15) โดยชั้นบนจะเป็นน้ำและมีตะกอนอยู่ด้านล่าง บางสูตรเกิดตะกอนที่จับตัวกันแบบหลวมๆ และบางสูตรเกิดตะกอนที่จับตัวกันแน่น (ตารางที่ 5.16) สำหรับชีวภัณฑ์สูตร F4 และ F5 ซึ่งมีส่วนผสมของ xanthan gum เป็นสารแขวนตะกอน มีลักษณะทางกายภาพคงเดิมไม่พบการตกตะกอน และมีปริมาตรของการตกตะกอนเท่ากับ 1 ซึ่งเป็นคุณสมบัติของของเหลวแขวนตะกอนที่ดี (ภาพที่ 5.4)



ภาพที่ 5.4 การตกตะกอนของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. velezensis* ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสูตรต่างๆ

ตารางที่ 5.15 ปริมาตรของการตกตะกอนของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสูตรต่างๆ

| สูตร | ปริมาตรของการตกตะกอน (F) |       |        |           |           |           |           |
|------|--------------------------|-------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|      | 0 ชม.                    | 4 ชม. | 24 ชม. | 1 สัปดาห์ | 2 สัปดาห์ | 3 สัปดาห์ | 4 สัปดาห์ |
| F1   | 1.00                     | 0.97  | 0.81   | 0.16      | 0.16      | 0.16      | 0.16      |
| F2   | 1.00                     | 1.00  | 1.00   | 0.42      | 0.25      | 0.17      | 0.17      |
| F3   | 1.00                     | 1.00  | 1.00   | 0.46      | 0.26      | 0.17      | 0.17      |
| F4   | 1.00                     | 1.00  | 1.00   | 1.00      | 1.00      | 1.00      | 1.00      |
| F5   | 1.00                     | 1.00  | 1.00   | 1.00      | 1.00      | 1.00      | 1.00      |
| F6   | 1.00                     | 1.00  | 0.22   | 0.17      | 0.17      | 0.17      | 0.17      |
| F7   | 1.00                     | 1.00  | 0.24   | 0.23      | 0.21      | 0.21      | 0.21      |

ตารางที่ 5.16 ลักษณะทางกายภาพและการกระจายตัวของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสูตรต่างๆ

| ชีวภัณฑ์ | ลักษณะทางกายภาพ                                                                                                   | ลักษณะการกระจายตัว                                    | จำนวนการกลับหลอด (ครั้ง) |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------|
| F1       | เกิดการแยกชั้น 2 ชั้น โดยชั้นบนเป็นชั้นน้ำใสไม่มีสีและชั้นล่างเป็นตะกอนสีครีมจับตัวกันแน่น                        | กระจายตัวได้ง่ายมาก (++++)                            | 1                        |
| F2       | เกิดการแยกชั้น 2 ชั้น โดยชั้นบนเป็นชั้นน้ำใสสีส้มอ่อนและชั้นล่างเป็นตะกอนสีครีมจับตัวกันแน่น                      | กระจายตัวได้ง่ายแต่มีตะกอนบางส่วนติดที่ก้นหลอด (+++)  | 2                        |
| F3       | เกิดการแยกชั้น 2 ชั้น โดยชั้นบนเป็นชั้นน้ำใสสีส้มอ่อนและชั้นล่างเป็นตะกอนสีครีมจับตัวกันแน่น                      | กระจายตัวได้ง่ายแต่มีตะกอนเล็กน้อยติดที่ก้นหลอด (+++) | 2                        |
| F4       | ลักษณะสารแขวนตะกอนค่อนข้างหนืดและไม่เกิดการตกตะกอน                                                                | -                                                     | -                        |
| F5       | ลักษณะสารแขวนตะกอนค่อนข้างหนืดและไม่เกิดการตกตะกอน                                                                | -                                                     | -                        |
| F6       | เกิดการแยกชั้น 3 ชั้น โดยชั้นบนเป็นชั้นน้ำใสไม่มีสีชั้นกลางเป็นชั้นน้ำขุ่นและชั้นล่างเป็นตะกอนสีครีมจับตัวกันแน่น | กระจายตัวได้ง่ายแต่มีตะกอนบางส่วนติดที่ก้นหลอด (+++)  | 4                        |
| F7       | เกิดการแยกชั้น 3 ชั้น โดยชั้นบนเป็นชั้นน้ำใสไม่มีสีชั้นกลางเป็นชั้นน้ำขุ่นและชั้นล่างเป็นตะกอนสีครีมจับตัวกันแน่น | กระจายตัวได้ง่ายแต่มีตะกอนบางส่วนติดที่ก้นหลอด (+++)  | 5                        |

หมายเหตุ : (++++)= กระจายตัวได้ดีมาก, (+++)= กระจายตัวได้ดี, (++)= กระจายตัวได้น้อย, (+)= กระจายตัวได้น้อยมาก

### 5.8.3 การประเมินผลสมบัติทางชีวภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

เมื่อนำชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ โดยนับจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์และการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* สามารถมีชีวิตรอดและยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุได้ดี (ตารางที่ 5.17)

จากผลการทดสอบทางกายภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น ชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสูตร F4 มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ที่มีชีวิตรอดสูง และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ดี จึงคัดเลือกสูตร F4 ไปศึกษาประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองต่อไป

ตารางที่ 5.17 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ

| สูตรชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น | ปริมาณแบคทีเรีย <i>B. velezensis</i> ในชีวภัณฑ์ (cfu/g) | การยับยั้งเชื้อรา <i>Aphanomyces</i> sp. (%) |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| F1                                  | $2.34 \times 10^{10}$                                   | 88.5                                         |
| F2                                  | $2.16 \times 10^{10}$                                   | 81.2                                         |
| F3                                  | $1.65 \times 10^{10}$                                   | 87.0                                         |
| F4                                  | $2.18 \times 10^{10}$                                   | 90.8                                         |
| F5                                  | $2.10 \times 10^{10}$                                   | 84.0                                         |
| F6                                  | $2.04 \times 10^{10}$                                   | 87.9                                         |
| F7                                  | $2.39 \times 10^{10}$                                   | 87.4                                         |

## 5.9 การทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องที่เวลาต่างๆ

### 5.9.1 ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

จากผลการทดลอง พบว่าจำนวนแบคทีเรียในชีวภัณฑ์จะเริ่มลดลงตั้งแต่ในเดือนที่ 2 และจำนวนแบคทีเรียจะลดลงไปจนกระทั่งในเดือนที่ 4 และ 5 เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32°C) (ตารางที่ 5.18) การลดลงของแบคทีเรียในชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าชีวภัณฑ์แบคทีเรียในรูปแบบนี้ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์เพื่อการทดสอบต่อไป เนื่องจากมีแนวโน้มว่าการลดลงของแบคทีเรียน่าจะลดลงเรื่อยๆ หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลาต่อไป

ตารางที่ 5.18 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณธ์ *B. velezensis* ในชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน

| ชีวภัณฑ์แกรนูลละลายน้ำ | จำนวนแบคทีเรีย (cfu/g.) |                   |                   |                   |                   |                      |
|------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
|                        | เดือนที่ 1              | เดือนที่ 2        | เดือนที่ 3        | เดือนที่ 4        | เดือนที่ 5        | เดือนที่ 6           |
| <i>B. velezensis</i>   | $2.4 \times 10^{10}$    | $2.5 \times 10^9$ | $9.0 \times 10^7$ | $3.0 \times 10^7$ | $3.0 \times 10^7$ | $3.2 \times 10^{11}$ |

### 5.9.2 ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัณธ์ชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

เมื่อเก็บชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัณธ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในภาชนะที่มีฝาปิด และวางเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของชีวภัณฑ์แต่ละสูตร ตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณธ์ที่มีชีวิตรอด เป็นระยะเวลา 6 เดือน ผลการทดลองพบว่าชีวภัณฑ์ในแต่ละสูตร มีความคงสภาพเหมือนครั้งแรกที่ผลิตเสร็จ ไม่ปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น มีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดในชีวภัณฑ์สูง

การที่ระดับจำนวนแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนักระหว่างเดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 3 ในระหว่างเก็บรักษา แต่มีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในเดือนที่ 4 ถึง เดือนที่ 6 (ตารางที่ 5.19) โดยเฉพาะในสูตร 2 สูตร (สูตร F4 และ F5) อาจเกิดจากการที่ส่วนผสมของทั้ง 2 สูตร มี xanthan gum เป็นองค์ประกอบเป็นส่วนใหญ่ สูตรที่มี xanthan gum เป็นองค์ประกอบนี้มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดีไม่มีการตกตะกอน (ตารางที่ 5.16) และอาจส่งผลทำให้มีสถานะที่มีความเหมาะสมต่อการที่ endospores ที่ใช้เป็นส่วนผสมของทั้ง 2 สูตร จะงอกเป็น vegetative cells ซึ่งส่งผลทำให้มีการเพิ่มของจำนวนแบคทีเรียมากยิ่งขึ้น การเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัณธ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าชีวภัณฑ์แบคทีเรียในรูปแบบนี้น่าจะเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์เพื่อการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 5.19 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณธ์ *B. velezensis* ในชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นแต่ละสูตร หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน

| สูตรชีวภัณฑ์<br>ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น | จำนวนแบคทีเรีย (cfu/g.) |                      |                      |                      |                      |                      |
|-----------------------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                         | เดือนที่ 1              | เดือนที่ 2           | เดือนที่ 3           | เดือนที่ 4           | เดือนที่ 5           | เดือนที่ 6           |
| F1                                      | $2.3 \times 10^{10}$    | $6.9 \times 10^9$    | $5.0 \times 10^7$    | $4.6 \times 10^7$    | $5.1 \times 10^7$    | $3.4 \times 10^{11}$ |
| F2                                      | $2.2 \times 10^{10}$    | $4.9 \times 10^9$    | $5.0 \times 10^8$    | $4.1 \times 10^9$    | $7.9 \times 10^9$    | $3.0 \times 10^{11}$ |
| F3                                      | $1.7 \times 10^{10}$    | $1.3 \times 10^{10}$ | $6.8 \times 10^9$    | $3.5 \times 10^{10}$ | $3.3 \times 10^{10}$ | $1.0 \times 10^{12}$ |
| F4                                      | $2.2 \times 10^{10}$    | $1.6 \times 10^{10}$ | $7.5 \times 10^{11}$ | $1.0 \times 10^{13}$ | $1.0 \times 10^{13}$ | $1.1 \times 10^{15}$ |
| F5                                      | $2.1 \times 10^{10}$    | $1.5 \times 10^{10}$ | $7.5 \times 10^{11}$ | $9.7 \times 10^{12}$ | $8.4 \times 10^{12}$ | $2.1 \times 10^{15}$ |
| F6                                      | $2.0 \times 10^{10}$    | $9.8 \times 10^9$    | $1.3 \times 10^6$    | $1.0 \times 10^{11}$ | $8.0 \times 10^{10}$ | $1.1 \times 10^{11}$ |
| F7                                      | $2.4 \times 10^{10}$    | $8.8 \times 10^9$    | $1.8 \times 10^{11}$ | $3.1 \times 10^{10}$ | $3.2 \times 10^{10}$ | $2.5 \times 10^{12}$ |

## 5.10 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับพืชในห้องปฏิบัติการ

### 5.10.1 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 1

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 1 พบว่า กรรมวิธีทดลองที่ 2 คือ ดันกล้าที่ราดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% Blank SC) กรรมวิธีทดลองที่ 3 คือดันกล้าที่ราดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% SC) และกรรมวิธีทดลองที่ 4 คือดันกล้าที่ราดด้วยเซลล์สดของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% fresh cell) มีจำนวนต้นรอดตายมากกว่ากรรมวิธีทดลองที่ 1 คือดันกล้าที่ราดด้วยน้ำเป็นชุดควบคุม เมื่อทำการเช็คผลการทดลองโดยนับจำนวนต้นกล้าที่มีชีวิตภายหลังการราดของเหลว 15 และ 30 วันตามลำดับ (ตารางที่ 5.20)

การที่ชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการทำให้ต้นกล้าผักสลัดมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าชีวภัณฑ์ชนิดนี้ (ที่มีแบคทีเรีย *B. velezensis* เป็นองค์ประกอบ และเป็นแบคทีเรียชนิดที่ผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ) มีประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมโรคที่เกิดจากเส้นใยของเชื้อราได้ โดยชีวภัณฑ์นี้อาจจะนำมาใช้ในช่วงการเพาะกล้าผักที่ต้องการผลิตในระบบไฮโดรโปนิคส์ เพื่อป้องกันต้นกล้าผักจากเชื้อราสาเหตุที่อาจจะปนเปื้อนกับวัสดุเพาะเมล็ด เช่น ถาดเพาะเมล็ด หรือฟองน้ำที่ใช้ในการเพาะเมล็ดและเลี้ยงต้นกล้าผักก่อนย้ายปลูกลงในระบบไฮโดรโปนิคส์

ตารางที่ 5.20 เปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดของต้นกล้าผักสลัด green oak ที่ใส่เชื้อรา *P. aphanidermatum* ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง

| กรรมวิธีทดลอง    | เปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดของต้นกล้าผักสลัด |                |
|------------------|------------------------------------------|----------------|
|                  | 15 วัน                                   | 30 วัน         |
| 1. control       | 75.06 ± 4.80 b                           | 8.34 ± 4.81 b  |
| 2. 1% Blank SC   | 95.83 ± 4.16 a                           | 83.34 ± 9.62 a |
| 3. 1% SC         | 100.00 ± 0.00 a                          | 91.67 ± 4.81 a |
| 4. 1% fresh cell | 100.00 ± 0.00 a                          | 87.50 ± 7.97 a |
| F-test           | **                                       | **             |
| C.V. (%)         | 6.86                                     | 21.02          |

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

\*\* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.01$

### 5.10.2 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 2

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 2 พบว่า ดันกล้าที่ราดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% SC) มีค่าเปอร์เซ็นต์ปลายรากที่พบการเจริญของเชื้อราสาเหตุ *P. aphanidermatum* 1 วันภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA น้อยกว่า ดันกล้าที่ราดด้วยน้ำ (ชุดควบคุม) และดันกล้าที่ราดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% Blank SC) (ตารางที่ 5.21)

ตารางที่ 5.21 เปอร์เซนต์การเกิดเชื้อราที่รากของต้นกล้าผักสลัดอายุ 30 วัน ที่ปลูกในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง

| กรรมวิธีทดลอง    | เปอร์เซนต์การตรวจพบเชื้อราสาเหตุที่ปลายราก |
|------------------|--------------------------------------------|
| 1. control       | 95.83 ± 3.96 a                             |
| 2. 1% Blank SC   | 87.50 ± 7.42 a                             |
| 3. 1% SC         | 70.00 ± 7.38 b                             |
| 4. 1% fresh cell | 80.83 ± 8.10 ab                            |
| F-test           | **                                         |
| C.V. (%)         | 16.55                                      |

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

\*\* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.01$

การที่ชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการทำให้เปอร์เซนต์การตรวจพบเชื้อราสาเหตุที่ปลายรากน้อยกว่าชุดควบคุม เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าชีวภัณฑ์ชนิดนี้ (ที่มีแบคทีเรีย *B. velezensis* เป็นองค์ประกอบและเป็นแบคทีเรียชนิดที่ผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ) นอกจากจะใช้ในการป้องกันต้นกล้าผักจากเชื้อราสาเหตุที่อาจจะปนเปื้อนกับวัสดุเพาะเมล็ด เช่น ถาดเพาะเมล็ด หรือฟองน้ำที่ใช้ในการเพาะเมล็ดและเลี้ยงต้นกล้าผักแล้ว ยังน่าจะมีศักยภาพในการนำไปใช้โดยการผสมลงในสารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้ปลูกพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ด้วยเช่นกัน ทั้งนี้การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏในการควบคุมโรคโดยการใช้นี้ลักษณะการผสมเชื้อปฏิบัฏในสารละลายเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าจะเป็นทางเลือกในการนำส่งเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏเพื่อให้ได้ผลในการป้องกันและควบคุมโรคพืชและมีรายงานการใช้วิธีการดังกล่าวในต่างประเทศ (Liu *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามการนำส่งชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัฏโดยการใส่ในสารละลายธาตุอาหารโดยเฉพาะกับพืชที่ปลูกในระบบ DRFT อาจจำเป็นต้องใช้ปริมาณชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัฏจำนวนมาก สำหรับในประเทศไทยมีการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อราปฏิบัฏ *Trichoderma harzianum* อย่างแพร่หลาย โดยใช้ใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารที่ใช้ปลูกผักไฮโดรโปนิกส์หลายชนิดที่ปลูกในระบบ NFT และพบว่า ชีวภัณฑ์เชื้อราปฏิบัฏ *T. harzianum* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าและเพิ่มปริมาณผลผลิตของผักไฮโดรโปนิกส์ได้ (จิระเดช 2547)

## 5.11 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับพืชในโรงเรือนปลูกพืชระบบ dynamic root floating technique (DRFT)

### 5.11.1 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในการควบคุมและป้องกันโรครากเน่าของผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Red coral)

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Red coral) ที่รากเป็นโรครากเน่าและมีอาการรุนแรงแล้ว (โรคเกิดจากเชื้อราสาเหตุที่ปรากฏในระบบ DRFT อยู่แล้ว และไม่มีการปลูกใส่เชื้อราสาเหตุเพิ่มเติม) ทำโดยการฉีดพ่นชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นไปที่รากของผักที่มีอายุปลูก 38 วันในระบบ DRFT (ภาพที่ 5.5) พบว่า รากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% Blank SC) รากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% SC) และ รากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยเซลล์สดของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% fresh cell) มีค่าเปอร์เซ็นต์จำนวนปลายรากของพืชที่พบมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุ *P. aphanidermatum* น้อยกว่ากรรมวิธีชุดควบคุม (ตารางที่ 5.22)



ภาพที่ 5.5 ระบบการปลูกพืชไฮโดรโปนิกส์ระบบ DRFT ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิบัทธ์ *B. velezensis* ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในการควบคุมโรครากเน่า

การที่ชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นที่ใช้โดยการฉีดพ่นไปยังรากของพืชที่แสดงอาการโรคแล้วมีประสิทธิภาพในการทำให้เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อราสาเหตุที่ปลายรากน้อยกว่าชุดควบคุม เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าชีวภัณฑ์ชนิดนี้ นอกจากจะใช้ในการป้องกันต้นกล้าผักจากเชื้อราสาเหตุที่อาจจะปนเปื้อนกับวัสดุเพาะเมล็ด เช่น ถาดเพาะเมล็ด หรือฟองน้ำที่ใช้ในการเพาะเมล็ดและเลี้ยงต้นกล้าผัก หรือใช้โดยการผสมลงในสารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้ปลูกพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ แล้ว ยังน่าจะมีศักยภาพในการนำไปใช้โดยการฉีดพ่นกับรากพืชที่เป็นโรคแล้วโดยตรง ทั้งนี้การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏในการควบคุมโรคโดยทั่วไปมักใช้ในลักษณะการผสมเชื้อปฏิบัฏในสารละลาย (Liu *et al.*, 2007) การนำส่งเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏโดยการฉีดพ่นชีวภัณฑ์ในการทดลองนี้เป็นการทดสอบในลักษณะที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และถึงแม้ว่าลักษณะการใช้ชีวภัณฑ์โดยการฉีดพ่นอาจมีความยุ่งยากในทางปฏิบัติ แต่การทดลองนี้เป็นหลักฐานที่ชี้ให้เห็นว่าการฉีดพ่นชีวภัณฑ์ที่มีเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสามารถลดความรุนแรงของโรคได้

ตารางที่ 5.22 เปอร์เซนต์การเกิดเชื้อราที่รากผักสลัด red coral ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

| กรรมวิธีทดลอง    | เปอร์เซนต์การตรวจพบเชื้อราสาเหตุที่ปลายราก |
|------------------|--------------------------------------------|
| 1. control       | 88.33 ± 5.85 a                             |
| 2. 1% Blank SC   | 65.00 ± 4.18 b                             |
| 3. 1% SC         | 60.00 ± 8.37 b                             |
| 4. 1% fresh cell | 60.00 ± 6.32 b                             |
| F-test           | *                                          |
| C.V. (%)         | 18.61                                      |

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

\* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.05$

นอกจากนั้นยังพบว่ากรรมวิธีทดลองที่ 2 คือรากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% Blank SC) กรรมวิธีทดลองที่ 3 คือรากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* และ กรรมวิธีทดลองที่ 4 คือ รากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยเซลล์สดของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของส่วนยอดให้มากกว่าน้ำหนักสดของกรรมวิธีชุดควบคุม (ตารางที่ 5.23)

การที่กรรมวิธีที่ 2 และ กรรมวิธีที่ 3 และ 4 สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของส่วนยอดให้มากกว่าน้ำหนักสดของกรรมวิธีชุดควบคุม อาจจะเนื่องมาจากส่วนผสมในกรรมวิธีที่ 2 เป็นสารอาหารให้กับพืช ส่งผลทำให้มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสด ส่วนการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดของส่วนยอดในกรรมวิธีที่ 3 และ 4 น่าจะมา

จากการที่ชีวภัณฑ์มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* ที่มีคุณสมบัติในการผลิตฮอร์โมน IAA เป็นองค์ประกอบ ซึ่งฮอร์โมน IAA นี้ น่าจะมีผลโดยตรงในการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดของส่วนยอดในการทดลองนี้

ตารางที่ 5.23 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของรากและต้นผักสลัด red coral ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

| กรรมวิธีการทดลอง | น้ำหนักสด (g.) |                | น้ำหนักแห้ง (g.) |                |
|------------------|----------------|----------------|------------------|----------------|
|                  | ราก            | ต้น            | ราก              | ต้น            |
| 1. control       | 6.25 ± 1.46 b  | 29.59 ± 2.97 c | 0.42 ± 0.04 b    | 1.50 ± 0.14 b  |
| 2. 1% Blank SC   | 7.03 ± 0.41 ab | 48.53 ± 2.32 a | 0.51 ± 0.04 ab   | 2.02 ± 0.30 a  |
| 3. 1% SC         | 6.90 ± 0.74 ab | 40.98 ± 2.76 b | 0.55 ± 0.01 a    | 1.77 ± 0.10 ab |
| 4. 1% fresh cell | 8.25 ± 0.65 a  | 40.83 ± 1.98 b | 0.56 ± 0.0a a    | 1.75 ± 0.18 ab |
| F-test           | **             | **             | **               | *              |
| C.V. (%)         | 16.49          | 12.72          | 15.07            | 22.33          |

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

\*,\*\* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ

#### 5.11.2 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในการควบคุมและป้องกันโรครากเน่าของผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Green oak)

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น กับผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Green oak) ทำเช่นเดียวกับ การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น กับผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Red coral) โดยมีความแตกต่างคือรากของผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Green oak) มีลักษณะปรกติมีสีขาว ไม่มีอาการของโรครากเน่าและไม่มีอาการรอยแผลหรืออาการเน่าปรากฏให้เห็น (อย่างไรก็ตามโรงเรือนที่ใช้ในการทดลองมีประวัติการเกิดโรครากเน่ากับผักสลัดที่ปลูกในระบบ DRFT อยู่แล้ว จึงไม่มีการปลูกใส่เชื้อราสาเหตุเพิ่มเติมเช่นกัน) การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับพืชดังกล่าวนี้พบว่า กรรมวิธีการทดลองที่ 2 คือรากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% Blank SC) กรรมวิธีการทดลองที่ 3 คือรากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 10% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (10% SC) และกรรมวิธีการทดลองที่ 4 คือ รากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยเซลล์สดของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* มีค่าเปอร์เซ็นต์จำนวนปลายรากของพืชที่พบมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุ *P. aphanidermatum* น้อยกว่ากรรมวิธีชุดควบคุม คือรากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยน้ำ (ตารางที่ 5.24) เช่นเดียวกับในกรณีของการทดสอบกับผักสลัด (*L. sativa* สายพันธุ์ Red coral)

การที่ชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นที่ใช้โดยการฉีดพ่นไปยังรากของพืชที่ยังไม่ปรากฏอาการโรคแล้วมีประสิทธิภาพในการทำให้เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อราสาเหตุที่ปลารากน้อยกว่าชุดควบคุม และให้ผลการควบคุมที่เด่นชัดมากกว่าการใช้กับพืชที่แสดงอาการของโรคแล้ว เป็นหลักฐานยืนยันเพิ่มเติมว่าชีวภัณฑ์ชนิดนี้ มีศักยภาพในการนำไปใช้โดยการฉีดพ่นกับรากพืชทั้งที่ยังไม่ปรากฏอาการของโรคและรากของพืชที่เป็นโรคแล้วโดยตรง นอกจากนั้นยังแสดงให้เห็นว่า การนำส่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการฉีดพ่นชีวภัณฑ์ในการทดลองนี้สามารถให้ผลการทดลองในเชิงบวกกับพืชทดสอบต่างสายพันธุ์คือ ผักสลัด *L. sativa* สายพันธุ์ Red coral และ ผักสลัด *L. sativa* สายพันธุ์ Green oak

ตารางที่ 5.24 เปอร์เซนต์การเกิดเชื้อราที่รากผักสลัด green oak ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

| กรรมวิธีทดลอง    | เปอร์เซนต์การเกิดเชื้อราที่ปลาราก |
|------------------|-----------------------------------|
| 1. control       | 95.00 ± 3.53 a                    |
| 2. 1% Blank SC   | 65.00 ± 3.53 b                    |
| 3. 10% SC        | 20.00 ± 0.00 c                    |
| 4. 1% fresh cell | 45.00 ± 3.53 bc                   |
| F-test           | **                                |
| C.V. (%)         | 10.89                             |

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

\*\* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.01$

นอกจากนั้นยังพบว่ารากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 10% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (10% SC) และรากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยเซลล์สดของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% fresh cell) สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของส่วนยอดได้มากกว่ากรรมวิธีชุดควบคุม (รากผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยน้ำ) (ตารางที่ 5.25) ทั้งนี้จะมีสาเหตุเนื่องจากชีวภัณฑ์ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* ที่มีคุณสมบัติในการผลิตฮอร์โมน IAA เป็นองค์ประกอบ ซึ่ง ฮอร์โมน IAA นี้จะมีผลโดยตรงในการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดของส่วนยอดในการทดลองนี้เช่นเดียวกับการทดลองที่ได้กล่าวถึงก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 5.23)

ตารางที่ 5.25 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของรากและต้นผักสลัด green oak ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

| กรรมวิธีการทดลอง | น้ำหนักสด (g.) |                 | น้ำหนักแห้ง (g.) |               |
|------------------|----------------|-----------------|------------------|---------------|
|                  | ราก            | ต้น             | ราก              | ต้น           |
| 1. control       | 11.28 ± 0.59 b | 40.11 ± 2.05 c  | 0.64 ± 0.06 b    | 1.91 ± 0.13 c |
| 2. 1% Blank SC   | 11.32 ± 0.68 b | 58.49 ± 2.91 bc | 1.18 ± 0.16 a    | 2.93 ± 0.09 b |
| 3. 10% SC        | 14.83 ± 0.83 a | 70.74 ± 7.61 ab | 1.13 ± 0.15 a    | 2.74 ± 0.14 b |
| 4. 1% fresh cell | 14.21 ± 0.58 a | 97.67 ± 5.50 a  | 1.11 ± 0.15 a    | 8.82 ± 0.28 a |
| F-test           | **             | **              | *                | *             |
| C.V. (%)         | 10.61          | 15.05           | 27.55            | 8.73          |

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

\*, \*\* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ

### 5.11.3 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดกวางตุ้ง (*Brassica campestris* var. *chinensis*)

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดกวางตุ้ง (*B. campestris* var. *chinensis*) พบว่าต้นกล้าผักกาดกวางตุ้งที่รดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% SC) สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของส่วนยอดได้มากกว่ากรรมวิธีหุ้ดควบคุม คือ รากผักสลัดที่รดด้วยน้ำ (ตารางที่ 5.26)

การที่ชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นที่ใช้รดไปยังต้นกล้าของพืชและสามารถเพิ่มน้ำหนักสดของส่วนยอดได้เมื่อเปรียบเทียบกับหุ้ดควบคุม เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าชีวภัณฑ์ชนิดนี้ นอกจากจะใช้ในการป้องกันต้นกล้าผักจากเชื้อราสาเหตุที่อาจจะปนเปื้อนกับวัสดุเพาะเมล็ด เช่น ถาดเพาะเมล็ด หรือฟองน้ำที่ใช้ในการเพาะเมล็ดและเลี้ยงต้นกล้าผัก หรือใช้โดยการผสมลงในสารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้ปลูกพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ และมีศักยภาพในการนำไปใช้โดยการฉีดพ่นกับรากพืชที่เป็นโรคหรือพืชปกติ (ในการทดสอบกับผักสลัด *L. sativa* สายพันธุ์ Red coral และ ผักสลัด *L. sativa* สายพันธุ์ Green oak) แล้ว การนำส่งเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณ์โดยการรดชีวภัณฑ์ในการทดลองกับผักกาดกวางตุ้ง (*B. campestris* var. *chinensis*) สามารถให้ผลการทดลองในเชิงบวกกับพืชทดสอบเช่นกัน ซึ่งเป็นการเพิ่มศักยภาพของชีวภัณฑ์รูปแบบของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นให้มากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ฮอร์โมน IAA ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* น่าจะมีผลโดยตรงในการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดของส่วนยอดในการทดลองนี้เช่นเดียวกับการทดลองที่ได้กล่าวถึงก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 5.23 และตารางที่ 5.25)

ตารางที่ 5.26 ความยาว น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของรากและต้นกวางตุ้งที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

| กรรมวิธีทดลอง    | ความยาว (cm.)  |                | น้ำหนักสด (g.) |                 | น้ำหนักแห้ง (g.) |               |
|------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|---------------|
|                  | ราก            | ต้น            | ราก            | ต้น             | ราก              | ต้น           |
| 1. control       | 27.12 ± 1.32 b | 33.62 ± 1.30 b | 2.33 ± 0.22 b  | 20.96 ± 4.80 b  | 0.39 ± 0.03      | 1.02 ± 0.11 a |
| 2. 1% Blank SC   | 35.37 ± 4.29 b | 34.65 ± 1.01 b | 2.96 ± 0.36 b  | 25.40 ± 3.50 ab | 0.38 ± 0.00      | 0.66 ± 0.13 b |
| 3. 1% SC         | 48.63 ± 5.47 a | 37.87 ± 0.92 a | 3.09 ± 0.20 b  | 34.31 ± 3.79 a  | 0.36 ± 0.02      | 1.32 ± 0.13 a |
| 4. 1% fresh cell | 45.82 ± 3.43 a | 38.32 ± 1.08 a | 4.19 ± 0.72 a  | 30.11 ± 2.93 ab | 0.41 ± 0.02      | 1.18 ± 0.11 a |
| F-test           | *              | *              | *              | *               | ns               | *             |
| C.V. (%)         | 20.04          | 6.04           | 27.65          | 27.61           | 12.19            | 23.90         |

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

\*,\*\* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับ  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ

## 6. สรุป

การศึกษาวิจัยนี้พบว่าเชื้อราก่อโรคในระบบไฮโดรโปนิกส์มีหลายชนิด เช่น *P. myriotyrum*, *P. helicoides*, *P. carolinianum* และ *P. dissotocum* รวมทั้งราที่มีรายงานว่าก่อโรคที่พบในน้ำและดิน เช่น *Aphanomyces* sp. การศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ ที่มีรายงานว่าเชื้อราก่อโรคในระบบไฮโดรโปนิกส์คือ *P. aphanidermatum* ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้จึงได้ทำการทดสอบผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ (ได้แก่เชื้อ *B. velezensis*) ที่มีต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราก่อโรคที่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์น่าจะมีศักยภาพในการควบคุมโรคและเชื้อราก่อโรคได้ดีกว่าการทดสอบกับเชื้อราก่อโรคชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว

นอกจากประเด็นในเรื่องของความหลากหลายของเชื้อราก่อโรค และ ความรุนแรงของโรคที่ร่าดังกล่าวสามารถทำให้เกิดโรคกับผักที่ปลูกโดยระบบไฮโดรโปนิกส์ที่สำคัญๆ แล้ว การศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูลต้นแบบในประเด็นต่างๆ ที่สำคัญ ดังต่อไปนี้คือ

(1) พบว่าส่วนของพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ และสภาพแวดล้อมในระบบปลูก เป็นแหล่งที่อยู่ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์หลากหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคและเชื้อราก่อโรค รวมทั้งมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืช ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคและเชื้อราก่อโรคได้

(2) นำเสนอกระบวนการผลิตเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณท์ให้เป็นชีวภัณฑ์ได้ ทั้งในรูปแบบของแข็ง (water-soluble granule) และ ของเหลว (suspension concentrate) ที่มีความคงสภาพได้นานในอุณหภูมิห้อง

และยังคงประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราก่อโรคได้และมีประสิทธิภาพให้ผลในการควบคุมเชื้อราก่อโรคในสภาพโรงเรือน

(3) พบว่าวิธีการฉีดพ่นเป็นวิธีการนำส่งชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพได้วิธีการหนึ่ง

อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยในรายงานนี้ยังอยู่ในขั้นของการวิจัยและพัฒนา และยังจำเป็นต้องขยายขอบเขตการศึกษาไปยังฟาร์มปลูกพืชในระบบไฮโดรโปนิคส์ของเอกชนที่ทำการปลูกพืชในระบบที่แตกต่างกันออกไป เช่น ระบบ NFT ซึ่งจะทำให้ระบบนำส่งชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แตกต่างกันออกไป

นอกจากนั้นยังพบว่าต้นทุนของการผลิตชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สำหรับชีวภัณฑ์ของเหลว (suspension concentrate formulation) เท่ากับ 135 บาทต่อลิตร ซึ่งมีราคาที่สูง ซึ่งอาจจะเป็นอุปสรรคต่อการนำไปใช้โดยเกษตรกรผู้ปลูกพืชในระบบไฮโดรโปนิคส์ โดยเฉพาะหากจำเป็นต้องนำส่งโดยวิธีการที่จะต้องใช้ชีวภัณฑ์มาก

การวิจัยในรายงานฉบับนี้เป็นการวิจัยและพัฒนการผลิตชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* เพื่อเป็นทางเลือกเพิ่มเติม ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการใช้ชีวภัณฑ์ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* อย่างแพร่หลายในการควบคุมโรคพืชที่เกิดกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด รวมทั้งการนำชีวภัณฑ์ของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* มาใช้ในการควบคุมโรคของพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์อย่างแพร่หลายก็ตาม (รศ. ดร. จิระเดช แจ่มสว่าง และ ผศ. ดร. วรรณวิไล อินทนู ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, ติดต่อส่วนตัว)

### กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในรายงานฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (NRCT) ผ่านสถาบันวิจัยและพัฒนา (SURDI) แห่งมหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2553 และ ปีงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2554

## เอกสารอ้างอิง

- จิระเดช แจ่มสว่าง 2547 การควบคุมโรคผักโดยชีววิธี เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีในการปลูกผักระบบไม่ใช้ดินและภายในโรงเรือน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (ชุดโครงการ-การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน) วันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2547 ณ อาคารเจ้าคุณทหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
- Anonymous. 2002. Greenhouse tomato (*Lycopersicon esculentum*): Commercial vegetable production guides. Oregon State University. U.S.A.  
(<http://oregonstate.edu/Dept/NWREC/tomatogh.html>). 13 pages.
- Chatterton, S. 2002. Biological control of Pythium root rot of bell pepper (*Capsicum annum* L.) in a small – scale hydroponic system. M. Sc. Thesis, University of Guelph, Guelph, Canada.
- De Jonghe, K., De Dobbelaere, I., Sarrazyn, R. and Höfte, M. 2005a. Control of *Phytophthora cryptogea* in the hydroponic forcing of witloof chicory with the rhamnolipid-based biosurfactant formulation PRO1. Plant Pathology. 54: 219-226.
- De Jonghe, K., De Dobbelaere, I., Sarrazyn, R. and Hofte, M. 2005. Control of brown root rot caused by *Phytophthora cryptogea* in the hydroponic forcing witloof chicory (*Cichorium intybus* var. *foliosum*) by means of a nonionic surfactant. Crop Protection. 24: 771-778.
- Fravel, D.R. and Larkin, R.P. 2002. Reduction of *Fusarium* wilt of hydroponically grown basil by *Fusarium oxysporum* strain CS-20. Crop Protection. 21: 539-543.
- Gericke, W.F. 1940. The Complete Guide to Soilless Gardening. Prentice Hall, New York. U.S.A.
- Grosch, R., Junge, H., Krebs, B. and Bochow, H. 1999a. Use of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent. III. Influence of *Bacillus subtilis* on fungal root diseases and on yield in soilless culture. Journal of Plant Diseases and Protection. 106 (6): 568-580.
- Grosch, R., Kofoet, A. and Junge, H. 2001. Biological control of root pathogen in soilless culture using bacteria. Acta Horticulturae. 548 : 393-400.
- Grote, D. and Bucsí, C. 1998. Chemical control of *Phytophthora nicotianae* on tomato roots with fosetyl-aluminiun in hydroponics. Gartenbauwissenschaft. 63 (2): 78-87.
- Jenkins, D.G., Cook, K.L., Garland, J.L. and Board, K.F. 2000. *Pythium* invasion of plant-based life support system: biological control and sources. Life Support Biosphere and Science: International Journal of Earth Space. 7 (2): 209-218.

- Jensen, M.H. 1991. Hydroponic culture for the tropics: opportunities and alternatives. Food and Fertilizer Technology Center. University of Arizona, Tucson, U.S.A. (<http://www.agnet.org/library/article/eb329.html>). 15 pages.
- Kanajanamaneesathian, K., Kusonwiriawong, C., and Pengnoo, A., 1998. Screening of bacterial antagonists for control of sheath blight in rice and development of suitable bacterial fomulation for effective application. *Australasian Plant Pathology*. 27:198-206.
- Kanajanamaneesathian, K., Wiwattanapatapee, R., Pengnoo, A., Oungbho, K. and Chumthong A. 2007. Efficacy of Novel formulation of *Bacillus megaterium* in suppressing sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathology Journal*. 6(2): 195-201.
- Khan, A., Sutton, J.C. and Grodzinski, B. 2003. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* on *Pythium aphanidermatum* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponic troughs. *Biocontrol Science and Technology*. 13 (6): 615-630.
- Liu, W., Sutton, J.C., Grodzinski, B., Kloepper, J.W. and Reddy, M.S. 2007. Biological control of *Pythium* root rot of Chrysanthemum in small-scale hydroponic units. *Phytoparasitica* 35 (2): 159-178.
- Leelasuphakul, W., Sivanunsaku, P. and Phongpaichit, S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of  $\beta$ -1,3- glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enz. Microb. Technol.* 38 : 990-997.
- Marr, C.W. 1994. Hydroponic systems: Greenhouse vegetable production. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, U.S.A. 11 pages.
- Mayano, C., Roposo, R., Gomez, V. And Melgarejo, P. 2003. Intergrated *Botrytis cinerea* managment in southeastern Spanish greenhouse. *Journal of Phytophology*. 151:80-85
- Menzies, J.G., Ehret, D.L., and Stan, S. 1996. Effect of inoculum density of *Pythium aphanidermatum* on the growth and yield of cucumber plants grown in recirculating nutrient film culture. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 18 (1): 50-54.
- Muslim, A., Horinouchi, H., and Hyakumachi, M. 2003. Control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with hypovirulent binucleate *Rhizoctonia* in soil and rock wool systems. *Plant Disease*. 87 (6): 739-747.
- Nene, Y.L. and Thapliyal, P.N. 1993. Fungicides in Plant Disease Control. New Delhi: Oxford & IBH publishing Company.

- Pengnoo, A., Kusonwiriawong, C., Niltatana, L. and Kanjanamaneesathian, M. 2000. Greenhouse and field trails of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizotonia solani*. *BioControl Journal*. 45:245-256.
- Plaats-Niterink, A.J.V. 1981. Monograph of the Genus *Pythium*. Centraalbureau Voor Schimmelcultuur, Baarn, Institute of Royal Netherland Academy of Science Letters. Mycological Number 21.
- Rey, P., Model, P., and Tirilly, Y. 1997. *Pythium* f induce a minor but ubiquitous disease in tomato soilless cultures. *Plant Pathology*. 79 : 173-180.
- Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant disease. *Bioscience Bioengineering*. 89 : 515 – 521.
- Shogi, J. 1978. Recent chemical studies on peptide antibiotics from the genus *Bacillus*. *Adv. Applied Microbiology*. 24 : 187-214.
- Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., and Liu, X. 2004. Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop Protection*. 23: 243-247.
- Stanghellini, M.E. and Rasmussen, S.L. 1994. Identification and origin of plant pathogenic microorganisms in recirculating nutrient solutions. *Advanced in Space Research*. 14 (11): 349-355.
- Sutton, J.C., Yu, H., Grodzinski, B., and Johnstone, M. 2000. Relationships of ultraviolet radiation dose and inactivation of pathogen propagules in water and hydroponic nutrient solutions. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 22 (3): 300-309.
- Vestergard, B. 1994. Establishing and maintaining specific pathogen free (SPF) conditions in aqueous solutions using ozone. *Advanced in Space Research*. 14 (11): 387-393.
- Von Der Weid, I., Alviano, D.S., Santo, A.L.S., Soares, R.M.A., Alviano, C.S. and Seldin, L. 2003. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. *Appl. Microbiol*. 95 : 1143-1151.
- Wiwattanapatapee, R., Pengnoo, A., Kanjanamaneesathian, M., Nilratana, L. and Jantharangsri, A. 2004. Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice:formulations, viability and bacterial release studies. *Journal of Controlled Release*. 95:453-460.
- Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A., Pengnoo, A. and Kanjanamaneesathian, M. 2007. Effervescent fast-disintegrating bacterial formulation for biological control of rice sheath blight. *Journal of Controlled Release*. 119, 229-235.
- Zheng, J., Sutton, J.C. and Yu, H. 2000. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, root, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 22 (4): 368-379.

### ภาคผนวก

(1) การวิเคราะห์ลำดับเบส : วิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA ทั้งสาย Forward และ Reverse ด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI

| Code   | Genus/Species                     | Identity (%) | Accession no. |
|--------|-----------------------------------|--------------|---------------|
| 101A/5 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 100          | HM107808.1    |
| 029C/1 | <i>Paenibacillus polymyxa</i>     | 99           | GU332610.1    |
| 120C/2 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 99           | HM107808.1    |
| 098A/6 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 100          | FJ654647.1    |
| 123B/2 | <i>Paenibacillus polymyxa</i>     | 99           | GU332610.1    |
| 100A/3 | <i>Bacillus subtilis</i>          | 99           | EU334108.1    |
| 123B/1 | -                                 | -            | -             |
| 097A/1 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 100          | HM107809.1    |
| 095A/3 | <i>Bacillus subtilis</i>          | 99           | EU334108.1    |
| 121C/4 | <i>Paenibacillus polymyxa</i>     | 99           | GU332610.1    |
| 101A/2 | <i>Bacillus velezensis</i>        | 99           | EU852930.1    |
| 125A/1 | <i>Bacillus subtilis</i>          | 100          | HM631974.1    |
| 094A/3 | <i>Bacillus subtilis</i>          | 100          | EU334108.1    |
| 029C/7 | <i>Paenibacillus polymyxa</i>     | 99           | AY359621.1    |
| 129C/1 | <i>Bacillus velezensis</i>        | 99           | EU852930.1    |
| 092A/1 | <i>Bacillus velezensis</i>        | 99           | GQ174489.1    |
| 128A/3 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 100          | FJ654647.1    |
| 097A/3 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 99           | GU323369.1    |
| 099A/3 | <i>Bacillus subtilis</i>          | 100          | GQ861470.1    |
| 092A/6 | <i>Bacillus velezensis</i>        | 99           | GQ174489.1    |

(2) รายการผลงานทางวิชาการที่ได้เผยแพร่แล้ว และที่อยู่ระหว่างการพิจารณาเผยแพร่จากการ  
ดำเนินการโครงการวิจัย

เรื่อง: การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืช  
ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

Title: Screening of bacterial antagonists and development of bacterial antagonist formulations for  
controlling diseases of vegetable in hydroponics condition)

หมายเหตุ: เรียงตามเวลาที่ทำการเผยแพร่ผลงาน

1. Mana Kanjanamaneesathian, Ruedeekorn Wiwattanapatapee, Ashara Pengnoo, Wanit Rotniam, Pitchanan Kanghae and Paranee Sawangsri. 2010. Isolation, screening and identification of antagonistic *Bacillus* spp. for controlling root rot disease caused by *Pythium helicoides* in vegetables produced by hydroponic condition. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. October 4-6, Pattaya, Thailand. Page 77. (Poster presentation).
2. Mana Kanjanamaneesathian, Reudeekorn Wiwattanapatapee, Ashara Pengnoo, Wanit Rotniam, Pitchanan Kanghae and Paranee Sawangsri. 2010. Potential of *Bacillus* spp. for controlling root rot disease caused by *Pythium helicoides* in vegetables produced in hydroponic condition. Proceedings of the 5<sup>th</sup> Thai Mycological Conference. December 7, Bangkok, Thailand. Page 80. (Poster presentation).
3. Mana Kanjanamaneesathian, Wanit Rotniam, Ashara Pengnoo and Reudeekorn Wiwattanapatapee. 2011. *Bacillus velezensis*, a new potential bacterial antagonist for controlling root rot disease of vegetables grown hydroponically. Proceedings of the International Conference on Biopesticides 6 (ICOB 6). December 11-16, Chiang Mai, Thailand. Page 234. (Poster presentation).
4. Mana Kanjanamaneesathian, Wanit Rotniam, Ashara Pengnoo and Reudeekorn Wiwattanapatapee. 2012. *Ipomoea aquatica* as a possible source of inoculum and host of plant pathogenic fungus in vegetables in hydroponics production system. . Proceedings of the 6<sup>th</sup> Thai Mycological Conference. March 6, Bangkok, Thailand. Page 44. (Poster presentation).
5. Mana Kanjanamaneesathian, Reudeekorn Wiwattanapatapee, Ashara Pengnoo, Wanit Rotniam, Wasunan Wongpetkhiew and Vichit Tanmala. 2013. Suspension concentrate formulation of *Bacillus velezensis* for controlling root rot disease of hydroponically-grown vegetables.

- Proceedings of the 3<sup>th</sup> Annual International Conference: Advances in Biotechnology (BIOTECH 2013). March 18-19, Singapore, Page 137-138. (Oral presentation).
6. Mana Kanjanamaneesathian, Reudeekorn Wiwattanapatapee, Wanit Rotniam, Ashara Pengnoo, Wasunan Wongpetkhiew and Vichit Tanmala. 2013. Application of a suspension concentrate formulation of *Bacillus velezensis* to control root rot of hydroponically-grown vegetables. New Zealand Plant Protection. Volume 66, Page 229-234. (Oral presentation).
  7. Mana Kanjanamaneesathian, Reudeekorn Wiwattanapatapee, Wanit Rotniam, Wasunan Wongpetkhiew. 2013. Spraying as a means for delivering a suspension concentrate formulation of *Bacillus velezensis* to suppress root rot disease and promote the growth of *Lactuca sativa*. Journal of Plant Diseases and Protection. (Submitted and In Review).
  8. มานะ กาญจนมณีเสถียร ฤดีกร วิวัฒนปฐพี วานิด รอดเนียม วสุนันท์ วงษ์เพชรเจียว และวิจิตร ต้นมละ. 2556. การใช้วิธี Drenching ในการนำส่งสูตรสำเร็จแขวนลอยเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus velezensis* ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาด *Lactuca sativa* ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปรอนิกส์. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 11, 26-28 พฤศจิกายน 2556, จังหวัดขอนแก่น (ส่งผลงานฉบับเต็มเพื่อพิจารณาตีพิมพ์และเสนอผลงานโดยวาจาในการประชุมในเดือนพฤศจิกายน 2556).