เอกสารอ้างอิง

กาญจนา วิชิตตระกูลถาวร. 2542. การควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค. วิทยานิพนธ์ มหาบัณฑิต สาขาโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

กาญจนา วันเสาร์ และเอื้องฟ้า บรรเทาวงษ์. 2544. ปุ๋ยน้ำหมักดีจริงหรือ. เคหะการเกษตร 25 (4) : 179-185.

วรรณดี บัญญัติรัชต, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และอนันต์ วงเจริญ. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในน้ำหมักชีวภาพเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วรรณดี บัญญัติรัชต, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และอนันต์ วงเจริญ. 2551. ประสิทธิภาพของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในน้ำหมักชีวภาพเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมเกียรติ สุวรรณคีรี จตุรงค์ พวงมณี จำลอง โพธาเจริญ และสิทธิชัย รอดแก้ว. 2545. การวิจัยและพัฒนาน้ำสกัดชีวภาพเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ออมทรัพย์ นพอมรบดี, สมพร อิศรานุรักษ์, สุนันทา ชมพูนิช, ภาวนา ลิกขนานนท์, นิตยา กันหลง, รังษี เจริญสถาพร และ รัตนาภรณ์ พรหมศรัทธา. 2547. ข้อมูลทางวิทยาศาตร์ น้ำหมักชีวภาพ (ตอนที่ 1) เอกสารวิชาการลำดับที่ 3/2547 พิมพ์ครั้งที่ 1 ที่ควิกปริ๊นท์ ออฟเซ็ท กรุงเทพฯ.

Agrios, G.N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Academic press, Inc. New York.

Bakker, A.W., and B. Schippers. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. Mediated plant growth-stimulation. Soil Biol. Biochem. 19: 451-457.

Bunyatratchata, W., W. Saksirirat, P. Sirithorn, and P. Teerakulpisut. 2003. Survey and race identification of Fusarium wilt pathogen of tomato, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* *In* KKU Annual Agricultural Seminar. Khon Kaen Abstract in English.

Felse, P. A. and T. Panda. 1999. Self – directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. Process Biochemistry 34: 563-566.

Fridlender, M., J. Inbar, and I. Chet. 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by β-1,3- glucanase-producing *Pseudomonas cepacia.* Soil Biol. Biochem. 25:1211–1221.

Kloepper J. M., R. Laverry and J. C. Lozano. 1986. Observation on the effect of inoculating cassava plants with *Pseudomonas fluorescens*. Phytophathology 117: 17 – 25.

Larkin, R. P. and D. R. Fravel. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium Wilt of tomato. Plant Disease 82(9) : 1022-1028.

Leeman, M., E. M. Denouden, J. A. van Pelt, F. Dirkx, H. Steijl, P. Bakker, and B. Schippers. 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance to fusarium wilt of radish by *Pseudomona fluorescens.* Phytopathol. 86:149–155.

Leong, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biochotrol plantpathogen. Annual Review Phytipathology. 24: 187-209.

Loper, J. E. 1988. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. Phytopathology 78 : 166 – 172.

Marlette, M.L., J. C. Correll, P.Kaufman, and P.E. Cooper. 1996. To genetically distinct population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi.* race3 in the United State. Pl. Dis. 80 (12) : 165-166.

Matthijs, S., K.A. Tehrani, G. Laus, R.W. Jackson, R.M.Cooper, and P. Cornelis. 2007. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. Environmental Microbiology 9:425–434.

Mercado-Blanco, J., D. Rodriguez-Jurado, A. Hervas, and R. M. Jimenez-Diaz. 2004. Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-association fluorescent *Pseudomonas* spp. BioControl 30: 474-486.

Mew, T. W. and A. M. Rosales. 1986. Bacterization of rice plants for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani.* Phytopathology 76 : 1260 – 1264.

Mikani, A., H.R. Etebarian , P.L. Sholberg, D.T. O'Gormanb, S. Stokes , and A. Alizadeh . 2007. Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. Retrieved : September, 20, 2007 from http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.020.

Nagarajkumar, M., R. Bhaskaran, and R. Velazhahan. 2004. Involvement of secondary metabolites and lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. Microbiol. Res. 159: 73–81.

Naosekpam, S.A., R. Verma, and V. Shanmugam. 2006. Extracellular Chitinases of Fluorescent Pseudomonads Antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Causing Carnation Wilt. Current Microbiol. 52:310–316.

Naveen, K.A.,E. Khare, J.H. Oh,S.C. Kang, and D.K. Maheshwari. Diverse mechanisms adopted by fluorescent *Pseudomonas* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. Retrieved : September, 1, 2007 from http://www.springerlink.com/content/q157417j430v1819/fulltext.html.

Pierson, L. S. III. And E. A. Pierson. 1996. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. Microbiology Letters 136 : 101 – 108.

Ran, L.X., C.Y. Lui., G.J. Wu, L.C. van Loon, and P.A.H.M. Bakker. 2005. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. BioControl 32:111-120.

Reissing, J. L., J. L. Strominger, and L. F. Leloir. 1955. A modified colorimetric method for estimation of N–acetylamine sugars. Journal Biological Chemistry 27 : 959 – 966.

Scher, F.M. and R. Baker. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. Phytopathology 72 : 1567 – 1573.

Schwyn, B. and Neilands, J. B. 1997. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160: 46-54.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. Journal Biological Chemistry 195: 13-23.

Tahsein, A., Z. Omer, and C. Welch. Application and evaluation of Pseudomonas strains for biocontrol of wheat seedling blight. Retrieved: August, 7, 2007 from http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2007.08.007.

Thomashow, L. S., and D. M. Weller. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. J. Bacteriol.170 : 3499 – 3508.

Viswanathan, R., and R. Samiyappan. 2000. Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent pseudomonas against *Colletotrichum falcatum* Went causing rot disease in sugarcane. Microbiol Res. 155: 1–6.

Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathology 26 : 379 – 407.

Weert, D. S., H. Vermeiren , I.H.M. Mulders, I.H.M. Kuiper, G.V. Bloemberg , J. Vanderleyden, R. De Mot , and B.J.J. Lugtenberg. 2002. Chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonisation by *Pseudomonas fluorescens*. Molecular Plant–Microbe Interact. 15: 1173–1180.

Whipps, J. 2001. Microbuial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 52: 487–511.

Yang, S. S. and Y. Wang. 1999. Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. Bot. Bull. Acad. Sin. 40 :259 – 265.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient Broth (NB)

beef extract	3	g
peptone	5	g
distilled water	1000	ml

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนจนละลาย จากนั้นนำไปบรรจุภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (°ซ)นาน 20 นาที

Potato Dextrose Agar (PDA)

potato		200	g
dextrose	20	g	
agar		15-20	g
distilled water		1000	ml

ชั่งมันฝรั่ง 200 กรัม หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋า ใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มจนมันฝรั่งสุก นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง ละลายผงวุ้นในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มจนผงวุ้นละลาย แล้วนำมาผสมกับน้ำต้มมันฝรั่ง เติมน้ำตาลกลูโคส ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร บรรจุภาชนะ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 20 นาที

Pseudomonas Agar Base Medium

Gelatin peptone	16	กรัม
Casein hydrolysate	10	กรัม
Potassium sulphate	10	กรัม
Agar	11	กรัม
Glycerol	5	มิลลิลิตร
Distilled water	500	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมต่างๆลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร คนจนละลาย จากนั้นนำไปต้มจนแน่ใจว่าวุ้นละลายหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วทิ้งไว้จนอุณหภูมิประมาณ 50 °ซ จากนั้นเท *Pseudomonas* C-F-C supplement (SR103) ลงไป 1 vial แล้วเขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

อาหารที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

Chitin-peptone medium และ Chitin-peptone medium + 0.2% dried mycelium

Glucose	0.5%
Peptone	0.2%
Chitin	0.2%
K_2HPO_4	0.1%
$MgSO_4.7H_2O$	0.05%
NaCl	0.05%
dried mycelium	0.2%
Distilled water	100 ml

ผสมส่วนส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8 ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 20 นาที ส่วนอาหาร Chitin-peptone medium + 0.2% dried mycelium ของ Fol ผสม dried mycelium ของ Fol 0.2 กรัมใน 100 มิลลิลิตรของอาหาร Chitin-peptone medium

Nutrient Agar + 2.4%Chitin

Chitin	24	g
Nutrient Agar	1,000	ml

ผสม chitin จำนวน 24 กรัมใน 1,000 มิลลิลิตรของอาหาร NA ที่ต้มจนผงวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

อาหารที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

Skimmed milk agar

Skimmed milk powder	2.0	g
Glucose	1.0	g
K_2HPO_4	0.2	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	g
$FeSO_4.7H_2O$	trace	
Agar	15	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.0

Protease production medium

Glucose	0.5%
Peptone	0.75%
$MgSO_4.7H_2O$	0.5%
$FeSO_4.7H_2O$	0.01%
K_2HPO_4	0.5%
Distilled water	100 ml

อาหารที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เบตา-1,3 กลูคาเนส

Peptone medium (0.2% laminarin) และ Peptone medium (0.2% laminarin) + 0.2% dried mycelium

Peptone	10	g
NaCl	5	g
Laminarin	2	g
Dried mycelium ของเชื้อรา Fol	2	g
Distilled water	1,000	ml

ผสมส่วนส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วนอาหาร Peptone medium (0.2%laminarin)+ 0.2% dried mycelium ของเชื้อรา Fol ผสม dried myceliumของเชื้อรา Fol 0.2 กรัมใน 1000 มิลลิลิตรของอาหาร Peptone medium (0.2%laminarin)

ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

0.4 M Sodium carbonate (Na_2CO_3)

ชั่งสาร Sodium carbonate จำนวน 42.39 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร กวนให้ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

Folin ciocalteu phenol's reagent

เตรียมโดยนำ Folin ciocalteu phenol ผสมในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 N

Somogyi reagent

Copper reagent A : ละลาย 25 กรัม ของ Sodium carbonate (Na_2CO_3), 25 กรัมของ Sodium potassium tartrate $[COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O]$, 20 กรัมของ Sodium hydrogen carbonate (Na_2HCO_3) และ 200 กรัมของ Sodium sulfate (Na_2SO_4) ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

Copper reagent B : ละลาย 15 กรัมของ Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$) ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

เมื่อนำมาใช้ให้ผสม 25 มิลลิลิตรของ reagent A และ 1 มิลลิลิตรของ reagent B เข้าด้วยกัน (ไม่ควรผสม reagent ดังกล่าวทิ้งไว้นาน ควรผสมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้)

Nelson's reagent

ละลาย 50 กรัมของ Ammonium molybdate $[(NH_4)_6Mo_7O_4.4H_2O)]$ ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติม 42 มิลลิลิตรของ Concentrate sulfuric acid ตามด้วย Sodium arsenate ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) dibasic solution (Sodium arsenate 6 กรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร) ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันดี ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.5% Casein solution

ละลาย 1.5 กรัมของ Casein ใน 0.1 M Phosphate buffer pH 7.0 นำไปต้มโดยคนตลอดเวลาจน Casein ละลาย จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH 7.0

0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0)

ชั่งสาร Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4) จำนวน 13.6 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนให้ละลาย ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) จำนวน 14.2 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

0.4 M Trichloroacetic acid (TCA)

ละลาย 65.35 กรัมของ TCA ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

0.8 M Potassium tetraborate ($K_2B_4O_7.H_2O$)

ละลาย 244.41 กรัม ของ Potassium tetraborate ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วย volumetric flask

ρ-Dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) reagent

ละลาย 1.0 กรัม ของ DMAB ใน 100 มล. Glacial acetic acid (AR grade) ที่มี 1.25% (v/v) ของ 10 N HCl

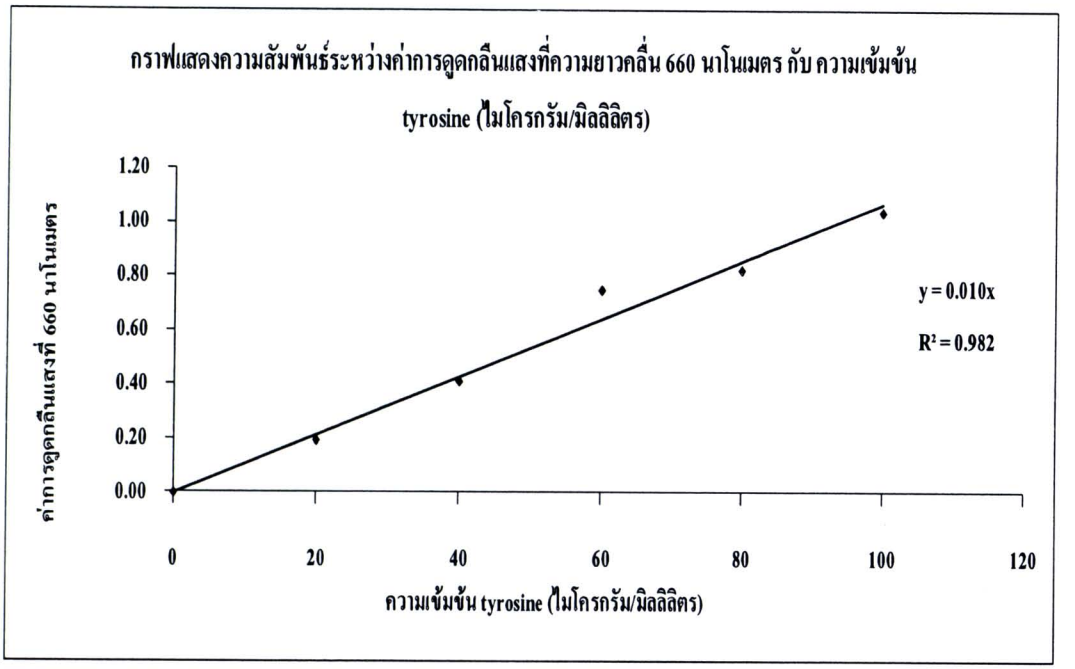
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณไทโรซีน (Tyrosine) ตามวิธีของ Yang and Wang (1999)

1.1 ปิเปตส่วนใส (supernatant) จากข้อ 3.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติม 0.4 M sodium carbonate (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม Folin ciocalteu phenol's reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าทันที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คำนวณปริมาณไทโรซีน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

1.2 เตรียม stock solution ของไทโรซีน ให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณไทโรซีนตามวิธีเดียวกับ 1.1 ค่าที่ได้นำมาพลอทเป็นกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนไทโรซีน (รูปที่1) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบปริมณกรดอะมิโน

1.3 กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit) ของกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้ได้ปริมาณไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง



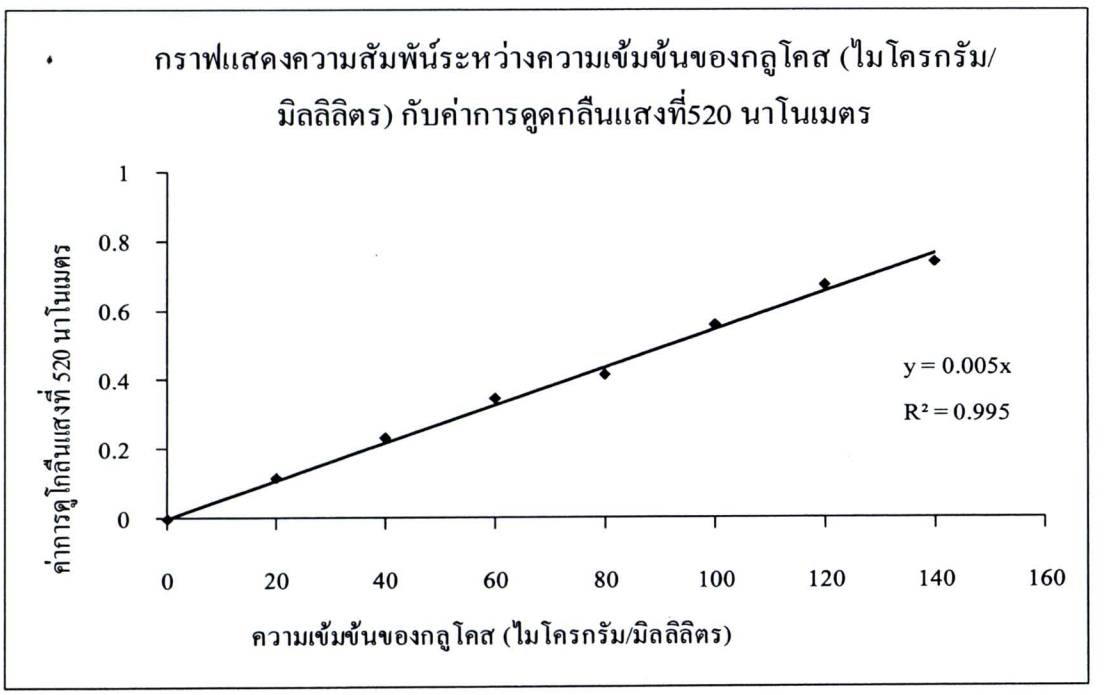
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของไทโรซีน (Tyrosine)

2. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

2.1 ปีเปตตัวอย่างจากข้อ 3.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติม Somogyi's reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันที เติม Nelson's reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเป็น Blank คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.2 ละลายกลูโคส 20 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask จะได้ stock solution ที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการเจือจาง stock solution ให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีเดียวกับข้อ 2 นำค่าที่ได้ไปพลอทเป็นกราฟมาตรฐานของโปรตีน (รูปที่ 2)

2.3 กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit) ของกิจกรรมเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง



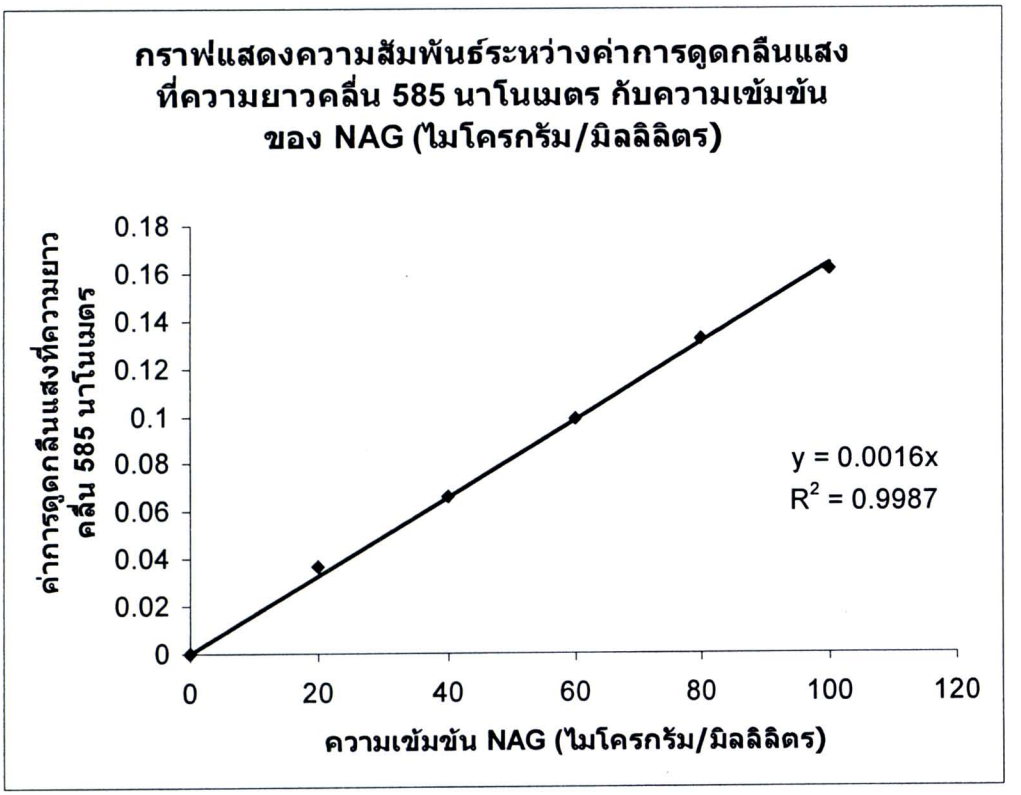
รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานของกลูโคส

3. วิเคราะห์ปริมาณปริมาณเอ็นอะซิทิลกลูโคซามีน (*N*-acetylglucosamine : NAG)

3.1 ปิเปตส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 0.5 มล. ใส่ในหลอดทดลอง เติม 0.8 M Potassium tetraborate 0.1 มล. (ภาคผนวก ข) ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 นาที ทำให้เย็นลง เติม DMAB reagent 3 มล. ผสมกันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร ภายในเวลา 10 นาที ค่าที่ได้นำไปหาปริมาณ NAG โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน

3.2 เตรียม stock solution ของ NAG ให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณ NAG พลอทเป็นกราฟมาตรฐานของ NAG (รูปที่ 3)

3.3 กำหนดให้ 1 หน่วย (Units) ของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้ได้ปริมาณ NAG 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานของเอ็นอะซิทิลกลูโคซามีน (*N*-acetylglucosamine)

ภาคผนวก ง ขั้นตอนการทำน้ำหมักชีวภาพจากผักกาดขาว

1. สับผักกาดขาวให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ

2. ผสมผักกาดขาวและกากน้ำตาลในอัตราส่วน 3:1

กากน้ำตาล

ผสมกากน้ำตาลลงในผักกาดขาว

2. หมักในถังที่มีฝาปิดเป็นเวลาคนทุกวันเป็นเวลา 15 วัน กรองเอากากออก เก็บส่วนที่เป็นน้ำหมักสีน้ำตาลเข้าไว้ในภาชนะเพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป

ถังที่ใช้หมัก

น้ำหมักชีวภาพ

ประวัติและผลงานนักวิจัย

2.1. ข้อมูลส่วนตัว

ชื่อ-นามสกุล:(ภาษาไทย) นางวรรณดี บัญญัติรัชต

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Wandee Bunyatratchata

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน: 3-1016-00078-24-2

ตำแหน่งปัจจุบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

ที่ทำงาน: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

โทรศัพท์: 043 – 202377 โทรสาร 043 – 202377 E – mail address: wanbun@kku.ac.th

2.2 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2524	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2533	ปริญญาโท	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.)	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2549	ปริญญาเอก	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต	โรคพืชวิทยา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

2.3 สาขาวิชาการที่ชำนาญ

จุลชีววิทยาทั่วไป, จุลชีววิทยาทางการเกษตร, การควบคุมทางชีวภาพ

2.4 ผลงานวิจัยที่พิมพ์ออกเผยแพร่ (บางส่วน)

Research Journal Publications

Sattayasai, N., R. Sudmoon, S. Nuchadomrong, A. Chaveerach, A. R. Kuchnlc, R. G. Mudalige-Jayawickrama, and **W. Bunyatratchata**. 2009. *Dendrobium findleyanum* agglutinin: production, localization, anti-fungal activity and gene characterization. Plant Cell Rep.28: 1243-1252.

Sudmoon, R., S., N. Sattayasai, **W. Bunyatratchata**, A. Chaveerach, and S. Nuchadomrong. 2008. Thermostable mannose-binding lectin from *Dendrobium findleyanum* with activities dependent on sulfhydryl content. Acta Biochim Biophys Sin. 40: 811-818.

Preecharam, S., S. Daduang, **W. Bunyatratchata**, T. Araki and S. Thammasirirak. 2008. Antibacterial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. African Journal of Biotechnology 7(97): 3121-3128.

Thongtumma, S., S. Chanthai, **W. Bunyatratchata,** and C. Ruangviriyachai. 2007. A study on an influence of some factors affecting on pyocyanin. *Journal of Science Khon Kaen University* 35 (2): 123-133

Hongthani, W., S. Chanthai, **W. Bunyatratchata** and C. Ruangviriyachai. 2007. Production and analysis of antibiotic phenazine from *Pseudomonas aeruginosa. Journal of Science Khon Kaen University* 35 (1):49-59

Thongtumma, S., P. Tansupo, **W. Bunyatratchata,** S. Chanthai and C. Ruangviriyachai. 2007. Capability in inhibition some bacterial growth using phenazine-producing *Pseudomonas aeruginosa. Naresuan Agriculture Journal* 10(1): 41-50.

Saosoong, K., S. Tongtumma, S. Chanthai, W. Wongphathanakul, **W. Bunyatratchata** and C. Ruangviriyachai. 2007. Isolation and study of chemical properties of pyocyanin produced from *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 (ATCC 9027). *KKU Res. J.* 12(1): 24-32.

Uawonggul, N., S. Thammasirirak, A. Chaveerach, T. Arkaravichien, **W. Bunyatratchata,** W. Ruangjirachuporn, P. Jearranaiprepame, T. Nakamura, M. Matsuda, M. Kobayashi, S. Hattori and S. Daduang. 2007. Purification and characterization of Heteroscorpine – 1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon.* 49(1): 19-29.

Bunyatratchata, W., W. Saksirirat. P. Sirithorn and P. Teerakulpisut. 2006. Genetic characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* as determined by ARDRA and RAPD analysis. *Khon Kaen Agriculture Journal.* 34 (3): 173-184.

Bunyatratchata, W., W. Saksirirat. P. Sirithorn and P. Teerakulpisut. 2005. Race Identification of Fusarium wilt Pathogen of Tomato, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* by pathogenic reaction on standard differential host and development of Thai differential host. *Khon Kaen Agriculture Journal* 33(2): 95 – 107.

Bunyatratchata, W., S. Thaboran, T. Somdee and K. Kong-nghn. 2002. Detection of some bacteria in cooked foods in Khon Kaen University Campus. *KKU Res. J.* 7(1) : 38-50

Abstracts and Presentations

Saksirirat, W. P. Charirak, and **W. Bunyatratchata**. 2009. Induce systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. against bacterial and gray leaf spot in tomatoes. The International Symposium ORGANIC. King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT), National Innovation Agency (NIA), Silpakorn University (SU) (in Thailand)

Tongcharoen, C., W. Saksirirat, A. Wongcharoen, and **W. Bunyatratchata.** 2008. Biological control of rhizosphere bacteria against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici in Vitro.* 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. Mahasarakham University. (in Thailand).

Charirak, P., W. Saksirirat and **W. Bunyatratchata**. 2008. Degrading enzyme activities of chitinase and B-1,3-glucanase in tomato leaf induced by *Trichoderma* spp. 10Th Graduate Research Conference. Khon Kaen Unversity (in Thailand)

Ruangviriyachai, C., S. Chanthai and **W. Bunyatratchata**. 2005. Phenazines Bioactive Compound from *Pseudomonas* spp. in Thailand. Proceedings the International conference on TSB annuals meeting: In novative Biotechnology ; The Era of Bionanotechnology. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkol, Thailand.

Uawonggul, N., A. Chaveerach, S. Thammasirirak, T. Arkaravichien, **W. Bunyatratchata,** W. Ruangjirachuporn, P. Jearranaiprepame and S. Daduang. 2005. Investigation of Anti – microorganism Activity of Heteroscorpine – 1 (HS – 1), Neurotoxin from *Heterometrus laoticus* Thai Scorpion Venom. 2 nd Yamada Symposium on Key Natural Organic Molecules in Biological Systems. Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan.

Saosoong, K., S. Tongtumma, S. Chanthai, W. Wongphathanakul, **W. Bunyatratchata** and C. Ruangviriyachai. 2005. Production and Analysis of Pyocyanin from *Pseudomonas* sp. 31st Congress on Science and Technology of Thailand.

Hongthani, W., C. Ruangviriyachai, S. Chanthai and **W. Bunyatratchata.** 2005. Production and Analysis of Bacterial phenazines. 4th Perch congress (in Thailand.)

Bunyatratchata, W., W. Saksirirat. P. Sirithorn and P. Teerakulpisut. 2003. Race identification of Fusarium wilt pathogen of tomato, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* by pathogenic reaction on standard differential host and development of Thai differential host. 6th National Plant Protection Conference (in Thailand).

Bunyatratchata, W., W. Saksirirat. P. Sirithorn and P. Teerakulpisut. 2003. Survey and race identification of Fusarium wilt pathogen of tomato, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* . KKU Annual Agricultural Seminar (in Thailand).

ประวัติและผลงานผู้ร่วมวิจัย

1. **ชื่อ** นายวีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์

   MR. Weerasak SAKSIRIRAT

2. **รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ** : 38-40-0259 **เลขประจำตัวประชาชน**: 3-4299-00090-22-6
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** : รองศาสตราจารย์ ระดับ 9
4. **ที่ทำงาน**:

   ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

   โทรศัพท์ / โทรสาร 043-343110, Email weerasak@mail.kku.ac.th

5. **ประวัติการศึกษา**

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา (ตรี โท เอก และประกาศนียบัตร) ชื่อเต็ม	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชาการศึกษา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2521	ตรี	วท.บ.	เกษตรศาสตร์	อารักขาพืช	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2524	โท	วท.ม.	จุลชีววิทยา	โรคพืช	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2533	เอก	Dr.-Ing.	Plant Protection	Plant Pathology	University of Kassel	Germany

6. **งานวิจัยที่เผยแพร่(บางส่วน):**

วรรณดี บัญญัติรัชต **วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์** พิศาล ศิริธร และ ปิยะดา ธีรกุลพิสุทธิ์. 2546. การสำรวจและจำแนก race ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. การสัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี 2546. 27-28 มกราคม 2546. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 401-410.

สุวิตา แสไพศาล **วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์** และ พรเทพ ถนนแก้ว. 2549. การตรวจสอบกิจกรรมของ Extracellular Degrading Enzymes ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. การสัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี 2549. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 23-24 มกราคม 2549.

อรอุษา ลาวินิจ และ **วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์.** 2549. ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ในการควบคุมเชื้อ สาเหตุโรคพืชโดยชีววิธี การสัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี 2549. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 23-24 มกราคม 2549.

Saksirirat W., N. Sanoamuang, K. Thomma, J. Kamkajorn, S. Komain and S. Saepaisan. 2003. A new record of luminescent mushroom (*Omphalotus* sp.) in Thailand and studies on its cultivation and application. Proceedings of the 2nd International Conferece on Medicinal Mushroom and Biodiversity and Bioactive Compounds. Pp. 251-257. 17-19 July 2003, PEACH, Pattaya, Thailand.

Heebkaew R., **W. Saksirirat**, P. Sirithorn and P. Thummabenjapone. 2004. DNA fingerprints of straw mushroom (*Volvariella volvacea*) in Thailand. The IV ASIA-PACIFIC Mycological Congress. 14-19 November 2004, Chiang Mai, Thailand, page 149.

Saksirirat, W., M. Chuebandit, P. Sirithorn and N. Sanoamuang. 2005. Species diversity of antagonistic fungus, *Trichoderma* spp. From seed production fields and its potential for control Fusarium wilt of tomato and cucurbits. The 4th International Conference on Biopesticides. Feb.13-18, 2005. Imperial Maeping Hotel, Chiangmai, Thailand.

Sirimungkararat, S., T. Sangtamat, **W. Saksirirat** and Y. Waikakul. 2005. New food plants for eri silkworm rearing. Int. J. Wild Silkmoth & Silk. 10: 27-34.

Sirimungkararat, S., S. Kamoltip and **W. Saksirirat**. 2005. Reeling of eri cocoon (*Philosamia ricini* B.) for silk yarn production. Int. J. Wild Silkmoth & Silk. 10: 35-39.

Saksirirat W., J. Komkhajorn, N. Sanoamuang and H. Urairong. 2005. Towards genetic diversity of edible mushrooms in northeast Thailand by using amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) technique. BioThailand 2005, 2-5 November 2005, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, page 237.

Yothalak, R., P. Thanonkeo and **W. Saksirirat**. 2005. Effect of cold shock on growth and protein synthesis in *Volvariella volvacea*. BioThailand 2005, 2-5 November 2005, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, page 263.

Charoensoparat K, S. Lunprorm, N. Aukkanit, **W. Saksirirat** and P. Thanonkeo. 2005. Biological function of G protein β subunit gene in *Rhizoctonia solani*. BioThailand 2005, 2-5 November 2005, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, page 264.

Songpra, B., S. Sirimungkararat, H. Urairong, **W. Saksirirat**, P. Theerakulpisut and A. Phodee. 2006. A new record of entomopathogenic fungus, *Penicillium oxalicum* and its ITS-5.8S

rDNA sequence data. Proceedings International Conference on Biopesticides IV, pp. 67-73. February 13-18th 2005, Chiang Mai, Thailand.

ยุวดี ชูประภาวรรณ **วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์** อนันต์ หิรัญสาลี และ นิวัฒ เสนาะเมือง . 2550. การสำรวจ รวบรวม และประเมินประสิทธิภาพเชื้อราในดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างต่อการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม. แก่นเกษตร 35: 104-114

ยุวดี ชูประภาวรรณ **วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์** อนันต์ หิรัญสาลี และ นิวัฒ เสนาะเมือง . 2550.การประเมินประสิทธิภาพเชื้อราในดินต่อการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปมพริกในแปลงปลูกพืชขนาดเล็ก. แก่นเกษตร 35: 189-195

7. ทรัพย์สินทางปัญญา

7.1 อนุสิทธิบัตร เลขที่ 2315 วันที่ได้รับ 23 มกราคม 2549

วิธีการตรวจสอบ race 3 ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ ด้วยเทคนิค Polymerize Chain Reaction (PCR)

7.2 อนุสิทธิบัตร เลขที่ 2316 วันที่ได้รับ 23 มกราคม 2549

ไพร์เมอร์ (primer) ที่ใช้ตรวจสอบ race ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ