



บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	สูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมหลายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อโรคใบจุดนูนและส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด
	A Formulation of Mixed Bacterial Antagonist Strain in Effective Antibiosis and Plant Growth Promoting Rhizobacteria to Control Bacterial Pustule of Green Soybean
นามผู้วิจัย	นางสาวสุนันทนา นุราภักดิ์
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	(รองศาสตราจารย์สุดฤดี ประเทืองวงศ์, Ph.D.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(อาจารย์สุพจน์ กาเข็ม, วท.ค.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(อาจารย์จรัสวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์, วท.ค.)
หัวหน้าภาควิชา	(รองศาสตราจารย์สมศิริ แสงโชติ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรอง

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

สูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมหลายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อโรคใบจุดนูน
และส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด

A Formulation of Mixed Bacterial Antagonist Strain in Effective Antibiosis and Plant Growth
Promoting Rhizobacteria to Control Bacterial Pustule of Green Soybean

โดย

นางสาวสุนันทนา นุราภักดิ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

พ.ศ. 2555

สุนันทนาถ นุราภักดิ์ 2555: สูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะผสมหลายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อโรคนิวโมเนอมาและส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุดฤดี ประเทืองวงศ์, Ph.D. 147 หน้า

โรคนิวโมเนอมาเกิดจาก *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Xag) จัดเป็นโรคสำคัญของถั่วเหลืองฝักสดที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด (BCA) ควบคุมได้ คือ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46, *Paenibacillus pabuli* SW01/4, *Pseudomonas fluorescens* SP007s และ *Serratia marcescens* SP1360 โดยศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้เชื้อ BCA ดังกล่าวเป็นแบบผสมรวมทั้งหมด 15 คู่ผสม พบว่าคู่ผสมระหว่างเชื้อ 2 สายพันธุ์คือ KPS46+SP007s ให้ผลดีในการยับยั้งเชื้อ Xag (เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 1.9 ซม.) และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (83.3%) ซึ่งดีกว่าการใช้เชื้อ 2 สายพันธุ์นี้แบบเดี่ยว รวมทั้งดีกว่าสายพันธุ์คู่ผสมอื่น ($P=0.05$) และได้ทดสอบอัตราส่วนผสมที่ประชากรเชื้อระหว่าง KPS46 : SP007s เพิ่มสูงขึ้นเพียงพอต่อการควบคุมโรค พบว่าที่อัตรา 9:1 ประชากรเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีการเพิ่มขึ้นเท่ากับและ/หรือมากกว่าการเลี้ยงเชื้อเดี่ยวแยกกันหลังจากบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมงทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและบนผิวใบถั่วเหลือง ในขณะที่ประชากรของเชื้อโรค Xag จะลดลง ($P=0.05$) เมื่อปลูกเชื้อบนต้นพืชร่วมกับเชื้อผสม BCA หรือเมื่อเลี้ยงเชื้อโรคในน้ำคั้นจากใบพืชที่มีการปลูกเชื้อ BCA ผสม เมื่อนำสารกรองเซลล์จากการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง KPS46+SP007s ไปแยกชนิดด้วย Thin - layer chromatography จะได้ชนิดสารยับยั้งเชื้อโรคเพิ่มขึ้น (4 แถบ ที่ค่า R_f 0.21, 0.37, 0.47 และ 0.82) ซึ่งมากกว่าสารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยวแยกกัน (3 แถบ ที่ค่า R_f ของ KPS46 0.25, 0.33 และ 0.37 และค่า R_f ของ SP007s 0.21, 0.33 และ 0.66) แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อ BCA ผสมจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการผลิตสารยับยั้งเชื้อโรคที่สำคัญออกมา ทั้งนี้เชื้อ BCA ผสมมีการผลิตสารยับยั้งเชื้อโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชเพิ่มขึ้น ตลอดจนการครอบครองผิวใบที่สัมพันธ์กับการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค Xag

เมื่อนำเชื้อผสมพัฒนาการใช้สารพาที่แตกต่างหลากหลายได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ 2 ชนิดคือ อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณ VS Medium (ประกอบด้วยกากถั่วเหลือง : กาก Vinasses อัตรา 1:1); และ ชีวผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปพร้อมใช้ ISR-BP Mixture (ประกอบด้วย kaolin: น้ำตาลทราย: SiO_2 : CMC: $CaCO_3$: $FeSO_4$: deshecofix อัตรา 70: 15 : 5 : 5 : 1 : 2 : 2) ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มประชากรเชื้อ; และการยับยั้งโรค ตามลำดับ โดยเมื่อทดสอบในโรงเรือนและสภาพไร่ที่ใช้ ISR-BP Mixture (เก็บไว้นาน 6 เดือน) คลุกเมล็ดและพ่นใบเป็นระยะ 3 ครั้ง จะลดการระบาดของโรค (AUDPC) ได้ 86 และ 85% ตามลำดับ และเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองฝักสดจากไร่ 69 % ผลการทดลองชี้ว่า สูตรสำเร็จเชื้อผสมลดโรคนิวโมเนอมาที่เกิดจาก Xag ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ที่มีกลไกส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช ผลิตภัณฑ์ยับยั้งโรค และการแข่งขันชนะเชื้อโรค รวมทั้งผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่พัฒนาจากวัสดุราคาถูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตเป็นการค้าระดับอุตสาหกรรมต่อไป

Sunanthanat Nurapak 2012: A Formulation of Mixed Bacterial Antagonist Strain in Effective Antibiosis and Plant Growth Promoting Rhizobacteria to Control Bacterial Pustule of Green Soybean. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Sutruedee Prathuangwong, Ph.D. 147 pages.

Four-bacterial strains *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46, *Paenibacillus pabuli* SW01/4, *Pseudomonas fluorescens* SP007s, and *Serratia marcescens* SPt360 are biological control agents (BCA) that suppress bacterial pustule, one of serious diseases of green soybean caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Xag). To increase control efficacy, the possible strain mixtures were studied with total 15 combinations. A combination of the two strains, KPS46+SP007s gave significantly ($P=0.05$) better suppression against Xag (1.9 cm in diameter of inhibition zone) and revealed better promotion of plant growth (83.3%) than each of the two strains used individually, and than other strain mixtures. High population density of strain mixture between KPS46:SP007s as required for disease control revealed with 9:1 ratio that was equivalent to or higher than each strain population cultured individually on both medium and soybean leaves after 48 h incubation. Pathogenic Xag was significantly reduced ($P=0.05$) when co-inoculated with the mixed BCA KPS46+SP007s or co-cultured with the sap extracted from treated plants. Thin-layer chromatography extraction of their cell-free culture filtrates provided a greater number of biologically effective bands obtained from KPS46+SP007s mixture (4 bands of corresponded R_f value of 0.21, 0.37, 0.47, and 0.82) compared to each individual strains separated (3 bands of KPS46 R_f value of 0.25, 0.33, and 0.37; and SP007s R_f value of 0.21, 0.33, 0.66) that indicated activation of major metabolites produced after the strains were co-cultured. Secondary metabolites production, increased plant growth enhancement, and colonization on leaf surface by strain mixture KPS46+SP007s, were correlated with antibacterial activity against Xag growth.

Different growth media and bioproducts of strain mixture developed with various carriers exhibited two-novel formulations named VS Medium (contained soybean meal : vinasses 1:1); and ISR-BP Mixture (kaolin : sucrose : SiO_2 : CMC : CaCO_3 : FeSO_4 : desheofix =70 : 15 : 5 : 5 : 1 : 2 : 2) that were the most effective for increased BCA population; and disease suppression respectively. In greenhouse and field experiments, ISR-BP Mixture of 12 month old shelf life used as seed treatment and 3-foliar spray intervals reduced area under disease progress curve (AUDPC) with 86 and 85% respectively and increased 69% yield obtained from field trials. These results suggest that bacterial pustule caused by Xag is effectively reduced by formulated product sustained a mixture of these two BCA strains that the mechanism involved may include plant growth promotion, antibiosis, and competition. The growth medium and bioproduct developed are the potential benefit for utilizing commercially available further with inexpensive ingredients.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุกฤดี ประเทืองวงศ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำทางด้านวิชาการ แนวความคิดในการทำงานวิจัย ตลอดจนการใช้ชีวิต และการอยู่ร่วมกันในสังคมพร้อมทั้งแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาระหว่างการศึกษาดำเนินงานวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สุพจน์ กาเข้ม และ ดร.จารุวัฒน์ เกษธรรมพิทักษ์ กรรมการร่วม ที่ให้คำปรึกษาแนะนำและให้คำปรึกษาในทุกระเบื้องตลอดมา กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สมศิริ แสงโชติ และ ดร.นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ที่ให้ความกรุณาตรวจสอบแก้ไขเพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ชัยสิทธิ์ ปรีชา ดร.คูสิต อธิวุฒันันท์ ดร.ณัฐริญา เบื่อนสันเทียะ ดร. ดิยากร นัทรณการัตน์ และ นางสาววิลาวรรณ เชื้อบุญ ที่ให้คำแนะนำ และสอนเทคนิควิธีการตลอดการวิจัย และเจ้าหน้าที่และบุคลากรภาควิชาโรคพืชทุกท่านที่เอื้ออำนวยความสะดวก และอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ด้วยดี ขอขอบคุณนางสาววราภรณ์ ภูักดีพันธ์ุ และนางสาวนลินา เหมสนิท ที่เป็นเพื่อนที่ดีที่คอยช่วยเหลือ และดูแลกันตลอดมา ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ชาวโรคพืชทุกคนที่เป็นกำลังใจในการเรียนและการทำวิจัยมาโดยตลอด

ที่สำคัญยิ่งประโยชน์อันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแด่ครอบครัว นุราก็ดี และครอบครัวสุวรรณา ตลอดจนครู อาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้มา ณ ปัจจุบัน

สุนันทนาถ นุราก็ดี

ตุลาคม 2555

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลและวิจารณ์	42
ผล	42
วิจารณ์	108
สรุปและข้อเสนอแนะ	118
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	121
ภาคผนวก	134
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง	135
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารสำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย	138
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรีย	143
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	145

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราส่วนการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบสายพันธุ์เดี่ยวและแบบผสมหลายสายพันธุ์ในอาหารเหลว NB	22
2	ส่วนประกอบและอัตราส่วนผสมสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดผงที่ใช้ในการศึกษา	36
3	คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> สาเหตุโรคใบจุดนูนถั่วเหลือง	45
4	คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์คุณภาพที่ใช้ในการวิจัย	47
5	ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4 สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	49
6	การต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์	52
7	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ในการผลิตสารยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนเมื่อทดสอบด้วยวิธี paper disc	54
8	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ในการเจริญร่วมกันบนผิวหน้าอาหารทดสอบด้วยวิธีการต่างๆ	56
9	ประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ที่เลี้ยงแบบเดี่ยวและแบบผสมในอาหารเหลว NB และประสิทธิภาพในการผลิตสารยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	60
10	คุณสมบัติของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์แบบเดี่ยวและแบบผสมหลายสายพันธุ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด	64
11	อัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนในห้องปฏิบัติการ	68
12	ประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมบนใบถั่วเหลืองฝักสดหลังปลูกเชื้อที่ระยะเวลาต่างกัน และประสิทธิภาพของน้ำล้างใบต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน	74

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	ประสิทธิภาพของน้ำล้างใบที่มีสารยับยั้งเชื้อก่อโรคใบจุดบนถั่วเหลืองที่ผลิตโดยเชื้อปฏิปักษ์บนผิวใบ	76
14	ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด ต่อศักยภาพในการผลิตสาร secondary metabolites ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	78
15	ประสิทธิภาพของสาร secondary metabolites จากการสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม และแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยวต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลืองฝักสด	81
16	ประสิทธิภาพของแถบสารสกัดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46 และ <i>P. fluorescens</i> SP007s แบบเชื้อเดี่ยวและแบบผสมที่แยกจากแผ่น TLC ในการยับยั้งเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	84
17	การเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยวและสายพันธุ์ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณสูตรต่างๆ	89
18	อัตราการเจริญของเชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46 และ <i>P. fluorescens</i> SP007s (อัตรา 9:1) ในสูตรอาหารดัดแปลง VS medium ที่มีส่วนผสมของ Vinasses และกากถั่วเหลืองแตกต่างกัน	90
19	ปัจจัยความเป็นกรด – ด่าง และอุณหภูมิระดับต่างกันในระยะการบ่มเชื้อ 24 ชั่วโมงที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46 และ <i>P. fluorescens</i> SP007s (อัตรา 9:1) ในสูตรอาหาร VS medium	91
20	ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> ในสูตรเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในวัสดุผสมสูตรต่าง ๆ	93
21	ประสิทธิภาพของสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพในการผลิตสูตรสำเร็จที่ผลต่อความมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46 และ <i>P. fluorescens</i> SP007s	95

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
22	ประสิทธิภาพของสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพในสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในอัตราส่วนต่างๆ ต่อการมีชีวิตรอดของ <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46 และ <i>P. fluorescens</i> SP007s และประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการควบคุมโรคใบจุดบนถั่วเหลืองในสภาพเรือนทดลอง	97
23	ประสิทธิภาพสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบเดี่ยวและเชื้อผสมที่พัฒนาในการยับยั้งการเจริญของ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> สาเหตุโรคใบจุดบน ถั่ว ในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc	100
24	ประสิทธิภาพสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46 และ <i>P. fluorescens</i> SP007s ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการควบคุมโรคใบจุดบน ถั่ว ระดับเรือนทดลอง	101
25	ประสิทธิภาพของการใช้สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมคลุกเมล็ดและพ่นใบถั่วเหลืองฝักสดต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มพูนปริมาณผลผลิตของถั่วเหลืองฝักสดในสภาพไร่	104
26	ประสิทธิภาพของการใช้สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมคลุกเมล็ดและพ่นใบถั่วเหลืองฝักสดต่อการส่งเสริมคุณภาพผลผลิตถั่วเหลืองฝักสดในระดับไร่	105

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพวิธีการสกัดสาร secondary metabolites จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธีการคัดแปลงของ Mckeen <i>et al.</i> (1986)	30
2	แสดงตำแหน่งการวางและขั้นตอนการแยกสาร secondary metabolites โดยวิธี Thin-layer chromatography	32
3	โคโลนีของเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> No.12-2 (Xag) บนอาหาร NA มีสีเหลือง ผิวขอบเรียบยกตัวนูนจากผิวหน้าอาหาร (ก) และการเจริญบนอาหาร YDCA พบว่ามีโคโลนีลักษณะกลม เข้มเป็นมัน สีเหลืองอ่อน (ข) เซลล์แบคทีเรียติดสีแดงของ Safanin-o เมื่อทดสอบด้วยวิธี Gram's stain (ค) เชื้อสามารถชักนำให้เกิดปฏิกิริยา HR บนใบยาสูบภายในเวลา 24 ชั่วโมง (ง) และก่อให้เกิดอาการโรคใบจุดนูนบนใบถั่วเหลืองทดสอบหลังปลูกเชื้อ 7 วัน (จ)	44
4	ลักษณะโคโลนีและรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์; <i>Pseudomonas fluorescens</i> SP007s (ก), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KPS46 (ข), <i>Serratia marcescens</i> SPt360 (ค) และ <i>Paenibacillus pabuli</i> SW01/4 บนอาหาร NA (ง)	48
5	ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> สาเหตุโรคใบจุดนูนของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์จากการทดสอบด้วยวิธี paper disc ได้แก่ <i>P. pabuli</i> SW01/4 (ก), <i>S. marcescens</i> SPt360 (ข), <i>P. fluorescens</i> SP007s (ค), <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46 (ง) และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (จ)	52
6	อัตราการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <i>P. fluorescens</i> SP007s, <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46, <i>P. papuli</i> SW01/4 และ <i>S. marcescens</i> SPt360 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB มีอายุการเลี้ยง 96 ชั่วโมง	54
7	แสดงประสิทธิภาพการเจริญร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการบนอาหาร NA โดยวิธีการ dual culture (ก) agar diffusion (ข) และ paper disc diffusion (ค)	57

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
8	ปริมาณ indole-3-acetic acid (IAA) ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงแบบสายพันธุ์เดี่ยวและแบบผสมหลายสายพันธุ์ในอาหารเหลว NB บ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง ; ตัวเลขแสดงปริมาณสาร IAA (μg / มิลลิลิตร)	65
9	ตำแหน่งแถบสารบน TLC plate silica gel ที่ใช้แยกสาร secondary metabolites ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46 และ <i>P. fluorescens</i> SP007s แบบเดี่ยว (ก และ ข) และแบบผสม (ค)	85
10	ภาพจำลองแถบสาร secondary metabolites ที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยว <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46 และ <i>P. fluorescens</i> SP007s และแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46 และ <i>P. fluorescens</i> SP007s อัตราส่วน 9:1 โดยวิธี Thin-layer Chromatography	86
11	อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม <i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46 และ <i>P. fluorescens</i> SP007s (อัตรา 9:1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ VS medium เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ MS และ NGB ที่อายุการเลี้ยงเชื้อ 0 – 96 ชั่วโมง	92
12	อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบผสมและแบบเชื้อเดี่ยวที่อายุการเก็บ 12 เดือน ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง	98
13	ภาพแสดงระดับการเกิดโรคใบจุดบนที่เกิดจาก <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> ที่ถั่วเหลืองอายุ 35- 56 วัน จากการควบคุมโดยใช้สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบผสมหลายสายพันธุ์ และแบบเชื้อเดี่ยว เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมโดยสารเคมีและการไม่มีการควบคุม	107

สูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมหลายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อโรค ใบจุดนูนและส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด

A Formulation of Mixed Bacterial Antagonist Strain in Effective Antibiosis and Plant Growth Promoting Rhizobacteria to Control Bacterial Pustule of Green soybean

คำนำ

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นวิธีการควบคุมโรคทางเลือกที่เน้นการลดปริมาณประชากรเชื้อสาเหตุโรค ตลอดจนลดกิจกรรมของเชื้อก่อโรคให้อยู่ในระดับที่ไม่สามารถก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชในระดับเศรษฐกิจ ซึ่งในปัจจุบันการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืชได้รับความสนใจทั้งในด้านการวิจัยและนำมาใช้ในระบบเกษตร ทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ มีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่ติดเทียมการใช้สารเคมีสังเคราะห์ โดยกลไกหลักของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ การยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชทั้งในลักษณะการผลิตสารพิษยับยั้ง (antibiosis) และการเจริญแข่งขันครอบครองพื้นที่และใช้แหล่งอาหาร (competition) การส่งเสริมการเจริญเติบโต (plant growth promoting rhizobacteria หรือ PGPR) และการผลิตสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโรคในพืช (induced plant resistance) ตลอดจนส่งเสริมสุขภาพพืชให้เจริญเติบโตและให้ผลผลิตเต็มศักยภาพทางพันธุกรรม ซึ่งกลไกการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่หลากหลายนี้ เชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งอาจมีการแสดงออกที่ไม่ครอบคลุมและเลือกแสดงออกตามสภาวะที่ชักนำ การผสมสายพันธุ์เชื้อปฏิปักษ์ที่มีกลไกต่างกันในการปรับใช้เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคเพิ่มสูงขึ้น และครอบคลุมทุกกลไก เช่น การใช้เชื้อผสมหลายสายพันธุ์ที่มีกลไกแตกต่างกันทั้งในด้านการยับยั้งเชื้อโรคและการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช โดยการใช้ทุกระยะเจริญเติบโตของพืชจะส่งเสริมให้พืชมีสุขภาพดีและป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคสายพันธุ์รุนแรงได้ ทั้งนี้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการคัดเลือกและการศึกษากลไกของ แบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพหลายชนิดเพื่อควบคุมโรคสำคัญในพืชกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46, *Paenibacillus pabuli* SW01/4, *Serratia marcescens* SP360 และ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ที่สามารถใช้กับการผลิตพืชเศรษฐกิจที่หลากหลายได้แก่ ถั่วเหลือง งาม กระจับเตพา สัก ทานตะวัน ข้าวโพด (สุตฤดี และคณะ 2548 ; Prathuangwong *et al.*,

2004), ถั่วเหลืองฝักสด (สุคฤดี และคณะ 2549) และพืชผัก เช่น คენห่า กะหล่ำดอก และกะหล่ำปลี (วิลาวรรณและคณะ 2549) ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์เหล่านี้มีกลไกที่หลากหลายในการดูแลสุขภาพพืช และมีความโดดเด่นแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เชื้อ และการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาใช้ร่วมกันได้ แต่ยังไม่มีความชัดเจน อย่างไรก็ตามการใช้สายพันธุ์เชื้อต่างกันหรือเลี้ยงผสมกันจำเป็นต้องพิจารณาคุณสมบัติต่าง ๆ ของสายพันธุ์ประกอบด้วย เพราะอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพเดิมในการควบคุมโรค และการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช การมีชีวิตรอด การเพิ่มปริมาณ และการแสดงออกของกลไกการควบคุมโรค รวมทั้งการผสมเชื้อหลายสายพันธุ์ อาจส่งเสริมให้เกิดการแสดงออกของกลไกใหม่ได้ ทั้งนี้การใช้เชื้อผสมอาจใช้ในลักษณะการเชื้อสดหรือแบบสูตรผลิตภัณฑ์และควรใช้ทุกขั้นตอนการปลูกพืช การพัฒนาสูตรสำเร็จจุลินทรีย์ที่มีการใช้สารพาหะหรือสารผสมธรรมชาติในการป้องกันเซลล์ และ/หรือ ส่งเสริมประสิทธิภาพจุลินทรีย์เหล่านี้จะต้องคงความมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ได้นาน คงประสิทธิภาพ และใช้ง่าย สะดวก และเชื้อสามารถแสดงกลไกเต็มศักยภาพ ดังนั้นการพัฒนาสูตรสำเร็จจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและส่งเสริมสุขภาพพืชได้ในวงกว้าง และมีกลไกที่ครอบคลุมชัดเจนจึงเป็นเป้าหมายของการศึกษานี้ด้วย การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพร่วมกันระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 *P. pabuli* SW01/4 *S. macescens* SPT360 และ *P. fluorescens* SP007s ในการควบคุมโรคและการกระตุ้นการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด โดยเน้นการควบคุมโรคใบจุดบนของถั่วเหลืองที่เกิดจาก *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ที่เป็นโรคแบคทีเรียที่สำคัญของถั่วเหลืองและยังขาดวิธีการควบคุมที่มีประสิทธิภาพ ตลอดจนศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสาร secondary metabolites ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค ผลิตสาร indole-3-acetic-acid ที่เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช อัตราส่วนผสมและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมตลอดจนการพัฒนาสูตรสำเร็จพร้อมใช้แบบเชื้อสายพันธุ์ผสมที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและส่งเสริมการควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดที่ดีกว่าสูตรเดิมและการใช้เซลล์สด ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะเป็นแนวทางในการพัฒนาสูตรสำเร็จจุลินทรีย์แบบผสมหลายสายพันธุ์ที่มีกลไกหลากหลายใช้ได้กับการปลูกถั่วเหลืองทุกขั้นตอนตลอดจนได้ค้นพบสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมหลายสายพันธุ์ วิธีการใช้ที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาขยายผลสู่การผลิตอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46, *Paenibacillus pabuli* SW01/4, *Serratia marcescens* SPt360 และ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ในการเจริญร่วมกัน เพิ่มศักยภาพการควบคุมโรคใบจุดนูน และการส่งเสริมการเจริญเติบโต (PGPR) ของถั่วเหลืองฝักสด

2. พัฒนาสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ผลิตภัณฑ์สูตรผงพร้อมใช้แบบผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์หลายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ควบคุมโรคใบจุดนูนของถั่วเหลืองฝักสด เพิ่มพูนผลผลิต สะดวกในการนำไปใช้ และคงความมีประสิทธิภาพได้นาน

การตรวจเอกสาร

ถั่วเหลืองฝักสด

ถั่วเหลืองฝักสด (Green soybean, vegetable soybean) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* L. Merr. จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Leguminosae และ วงย่อย (sub-family) Papilionaceae (Caldwell, 1973; Singh and Jain, 1981) เช่นเดียวกับถั่วเหลืองน้ำมัน โดยมีชื่อเรียกกันหลากหลาย ได้แก่ ถั่วเหลืองฝักสด หรือถั่วแระญี่ปุ่น มีถิ่นกำเนิดกระจายอยู่ตั้งแต่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และหมู่เกาะต่าง ๆ ในมหาสมุทรแปซิฟิกไปจนถึงทวีปออสเตรเลีย และประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ จีน แมนจูเรีย ญี่ปุ่น และเกาหลี ถั่วเหลืองฝักสดเป็นพืชตระกูลถั่ว ลักษณะเป็นพืชล้มลุก (annual) มีใบเลี้ยงคู่ มีการผสมเกสรในดอกเดียวกันหรือผสมตัวเอง (self-pollinate) ลำต้นตั้งตรงเป็นพุ่ม เป็นพืชฤดูเดียว ระบบรากเป็นระบบรากแก้ว แหล่งปลูกถั่วเหลืองฝักสดในประเทศไทยกระจายอยู่ในจังหวัดทางภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา พิษณุโลก กำแพงเพชร น่าน แพร่ ลำปาง เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ ลำพูน และอุทัยธานี ข้อมูลพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองฝักสดนั้นไม่มีการสำรวจที่แน่นอน ข้อมูลส่วนใหญ่ได้จากบริษัทเอกชนไม่เปิดเผยข้อมูลพื้นที่ปลูกที่แท้จริง และเป็นการผลิตเพื่อส่งออกเป็นหลัก ในขณะที่ผลผลิตเกษตรกรจะส่งจำหน่ายในตลาดสูงในประเทศ เช่น ซูเปอร์มาร์เก็ต หรือร้านอาหาร

ถั่วเหลืองฝักสดมีความแตกต่างจากถั่วเหลืองน้ำมันคือ ถั่วเหลืองฝักสดมีขนาดใหญ่ บริเวณเมล็ดในระยะเมล็ดเต่งเต็มที่ แต่ฝักยังมีสีเขียวอยู่ อายุเก็บเกี่ยวฝักสดประมาณ 65 วัน หลังจากหยอดเมล็ด ฝักที่ได้มาตรฐานส่งตลาดญี่ปุ่นจะต้องมีเมล็ดตั้งแต่ 2 เมล็ดขึ้นไป ความยาวฝักไม่น้อยกว่า 4.5 เซนติเมตร ฝัก 1 กิโลกรัม มีจำนวนฝักไม่เกิน 350 ฝัก และไม่รอยตำหนิใด ๆ บนฝัก ลำต้นเป็นพุ่มเตี้ยมี 7-10 ข้อ และแขนง 2-3 แขนง เมล็ดพันธุ์มีขนาดใหญ่โดยเมล็ด 100 เมล็ด จะมีน้ำหนักประมาณ 25-35 กรัม (Chen *et al.*, 1991) ในขณะที่ถั่วเหลืองน้ำมันเป็นถั่วเหลืองที่มีฝักขนาดเล็ก เมล็ด 100 เมล็ดหนักเพียง 12-18 กรัม ลำต้นตั้งตรง มักเป็นลำต้นเดี่ยวไม่มีแขนง เมล็ดมีคุณค่าทางโภชนาการสูงประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และธาตุอาหารอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ผลผลิตเพื่อใช้ประโยชน์ในการทำน้ำมันพืช สำหรับการปรุงอาหาร (บุปผา, 2543)

โรคใบจุดนูนของถั่วเหลือง และความสำคัญ

โรคใบจุดนูน (bacterial pustule) ของถั่วเหลืองเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Vauterin *et al.*, 1995) เป็นโรคที่พบระบาดทั่วไปในแหล่งปลูกถั่วเหลืองฝักสด และถั่วเหลืองน้ำมัน พบระบาดมากในฤดูฝนและส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณผลผลิต (สุคฤดี และคณะ, 2539) โรคนี้จะมีอาการรุนแรงเมื่ออากาศร้อนและความชื้นหากเป็นรุนแรงจะทำให้ใบร่วง ผลผลิตลดลง ลักษณะอาการระยะแรกคล้ายกับราสนิม พบจุดสีเขียวย่อมนทั้งบนใบและใต้ใบ ต่อมาแผลพัฒนาตรงกลางนูนขึ้น แผลแห้งขยุบตัวเป็นคล้ายสะเก็ดสีน้ำตาลเข้มคล้ายราสนิม เกิดมีสีเหลืองล้อมรอบ (halo) ต่อมาแผลขยาย รูปร่างไม่แน่นอน และลูกกลมติดกันเป็นแผลใหญ่ ใบร่วงก่อนกำหนด ส่วนอาการบนฝักปรากฏแผลขนาดเล็กสีน้ำตาลแดง จุดแผลนูนเล็กน้อย ผลผลิตลดลง ฝักมีขนาดเล็ก ทั้งนี้เชื้อสามารถติดไปกับเมล็ดถั่วเหลืองได้ และแพร่กระจายได้ดีในแปลงปลูกโดยแมลง ลม ฝนและหยดน้ำที่สาดกระเซ็น และเชื้อสาเหตุสามารถอาศัยข้ามฤดูในเศษซากพืชที่ยังไม่สลายตัวได้นาน 3 เดือน (สุคฤดี, 2527) หากเกิดโรคใบจุดนูนร่วมกับโรคแอนแทรคโนส (*colletotrichum truncatum*) หรือมีการระบาดร่วมกันอย่างรุนแรงจะส่งผลให้ใบร่วงและยืนต้น โกร่นไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ พันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดที่อ่อนแอต่อโรคใบจุดนูนคือ AGS292, กำแพงแสน292 และพันธุ์ด้านทานปานกลางคือ No.75 (กรุงและศิริกุล, 2534) ส่วนพันธุ์ถั่วเหลืองน้ำมันที่อ่อนแอต่อโรคใบจุดนูนคือ พันธุ์ สจ.4 และ สจ. 5 (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

ลักษณะเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *glycines* เชื้อนี้มีรูปร่างเป็นท่อนตรงมีขนาดประมาณ 0.5-0.9X1.4-2.3 นาโนเมตร แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ (spore) มี flagella แบบ monotrichous ลักษณะโคโลนีบน nutrient agar (NA) และ Wakimoto's agar มีสีเหลืองเข้มและมันวาว ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผลิตรงควัตถุสีเหลืองละลายในแอลกอฮอล์ แต่ไม่ละลายน้ำ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-33 องศาเซลเซียส เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด และสูงสุดระหว่าง 10-35 องศาเซลเซียสตามลำดับ ย่อยสลายแป้งได้เร็ว สร้างเอนไซม์ catalase ไม่สร้างเอนไซม์ urease ไม่สามารถเปลี่ยน nitrate สามารถผลิต polysaccharides ซึ่งมี glucose manose xylose และ amino acid เป็นส่วนประกอบ ทำให้ทนต่อสภาพแห้งแล้ง และแสงแดด เนื่องจากดูดซับรังสี ultraviolet ได้บางส่วน (Voronkerrvich and Shmanenkova, 1968)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดและการแพร่ระบาดของโรคใบจุดนูน

โรคใบจุดนูนของถั่วเหลืองพบระบาดรุนแรงในสภาพอากาศร้อน และมีความชื้นสูง เชื้อสาเหตุสามารถเข้าทำลายถั่วเหลืองได้ทุกระยะการเจริญเติบโต (Allington and Feaster, 1946) อายุถั่วเหลืองที่อ่อนแอต่อโรคคือ อายุระหว่าง 30-40 วันหลังงอก โดยเฉพาะพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ พันธุ์ AGS292, กำแพงแสน 292 และ No.75 เชื้อสามารถเข้าทำลายได้ง่ายที่สุด และอุณหภูมิระหว่าง 30-33 องศาเซลเซียสมีผลต่อความรุนแรงของโรค (Sinclair and Dhingra, 1975) โดยเชื้อเข้าทำลายได้ดิขณะที่ปากใบเปิดกว้างเนื่องจากเชื้อเข้าสู่พืชได้มาก เชื้อแพร่กระจายจากใบล่างขึ้นสู่ใบบนได้ โดยอาศัยลม ฝน และแมลง (Uematsu *et al.*, 1983) นอกจากนี้ยังมี รายงานว่าเชื้อสามารถแพร่กระจายไปกับน้ำที่สาดกระเซ็น (splashing) ไปยังต้นอื่น ๆ และน้ำดังกล่าว ยังทำให้เชื้อที่อาศัยในเศษซากพืชบนผิวดินแพร่กระจายขึ้นมายังต้นถั่วเหลืองที่อยู่ข้างเคียงได้ (สุทธฤดี และ กิตติศักดิ์, 2527) เชื้อนี้ยังสามารถมีชีวิตข้ามฤดูโดยอยู่ในพืชตระกูลถั่วชนิดอื่นได้ เช่น ถั่วลิสง (*Arachis hypogea*) ถั่วพีเรเนียน (*Glycine javanica*) ถั่วแปบ (*Dolichos lablab*) และมันแกว (*Pachyrhizus erosus*) (สุทธฤดี, 2523) และสามารถอาศัยอยู่ข้ามฤดูบริเวณรากของข้าวสาลีหรือเข้าทำลายวัชพืชบางชนิด เช่น *Dolichos biflorus* และ *Brunnichia cirrhosa* (red vine) (Hedges, 1994) ตลอดจนอยู่ในเมล็ดถั่วเหลืองและเศษซากพืชที่เป็นโรค Prathuangwong, (1990) รายงานว่าเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนดำรงชีวิตอยู่ในเศษซากพืชที่เป็นโรคได้นานถึง 3-7 เดือน และเป็นโรคที่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญ โดยเชื้อจะแพร่ระบาดโดยอาศัยเมล็ด (seed bone) (เชษฐพันธ์, 2529; Nemlienko and Kulik, 1960) หรือเศษซากพืชที่เป็นโรคที่ไม่สลายตัวอยู่บนผิวดิน (Teresehenko, 1978)

ในเขตพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองฝักสดภาคกลางพบการระบาดของโรคใบจุดนูน 49-75 เปอร์เซ็นต์ในช่วงเดือนกันยายน – ตุลาคม ยังเป็นที่มีความชื้นสูงและอุณหภูมิสูง ส่วนภาคเหนือพบการระบาดรุนแรงน้อยกว่า โดยในฤดูแล้งช่วงปลายฝนพบการระบาด ประมาณ 0.1-4.7 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูฝนมีการระบาดรุนแรงเพิ่มขึ้นโดยในระยะต้นกล้าพบการระบาด 0.1-6.3 เปอร์เซ็นต์ ในระยะติดดอกถึงระยะพัฒนาเมล็ดประมาณอาจพบรุนแรง 0.8-92.1 โดยทั่วไปการควบคุมโรคใบจุดนูนทำโดยใช้พันธุ์ต้านทานและพ่น ด้วยสารคอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ 2-3 ครั้งทุก 7 วัน ในระยะที่เลี้ยงต่อการระบาด แต่ไม่ควรใช้ต่อเนื่องเพราะเชื้อจะต้านทานง่าย และต้องใช้ร่วมกับวิธีเขตกรรมอื่น ๆ สุทธฤดี และคณะ, 2552 ครั้งแรกในระยะฝักอ่อน ซึ่งนิยมพ่นในช่วงเช้าหรือเย็น

การควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีววิธี (biological control) คือ การนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ชนิดหนึ่งหรือมากกว่า ตลอดจนพันธุกรรมหรือผลผลิตจากพันธุกรรม ที่มีอยู่ทั่วไปตามบริเวณผิวพืชส่วนเหนือดิน (Munk vald และ Marois, 1993) บริเวณราก และดินรอบราก (Larkin *et al.*, 1989) ที่มีความสามารถในการแข่งขัน (competition) ทางด้านแหล่งแร่ธาตุอาหาร และแหล่งที่อยู่อาศัย การเป็นปรสิต (parasite) รวมถึงการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่น ซึ่งถือว่าเป็นกลไกที่สำคัญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มาใช้ในการควบคุมโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมี (นิพนธ์, 2546) ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำวิธีการในการควบคุมโรคโดยวิธีชีววิธีมาใช้ควบคุมโรคสำคัญๆ ของพืชหลายชนิดรวมทั้งถั่วเหลืองด้วย เช่น Betagnolli *et al.* (1996) ได้ทำการควบคุมโรครากเน่า (root rot) ของถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 และเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ Th008 ที่สามารถผลิตสาร extracellular enzyme ออกมาทำลายเส้นใยของเชื้อโรคดังกล่าวได้ นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคของพืชหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียสายพันธุ์คุณภาพที่คณะวิจัย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้รวบรวมและศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับคุณสมบัติการเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมโรคและส่งเสริมสุขภาพพืชหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Paenibacillus papuli* SW01/4 จากผิวใบถั่วเหลือง (สุพจน์ และสุคฤดี, 2544 ; สุคฤดี และคณะ, 2548; Prathuangwong and Kasem, 2003) *Pseudomonas fluorescens* SP007s และ *Bacillus subtilis* SP009s จากผิวใบกะหล่ำดอก (วิลารรณ และคณะ, 2549) *Serratia macescens* SPt360 และ *B. cereus* SPt245 จากดินป่า *P. aeruginosa* Spd155 จากเมล็ดสัก (Phiriyaprasath *et al.*, 2002) *B. licheniformis* Spd20 จากเมล็ดงา และ *Bacillus* sp. (YP04, YP28, KP96 และ KP25) จากผิวใบข้าวโพด (นันทิยา, 2551 ; พรภิมล, 2551) และ *B. amyloliquefaciens* KPS46 จากดินแปลงถั่วเหลือง (สุพจน์ และสุคฤดี, 2544) ซึ่งจากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสำคัญของถั่วเหลืองและถั่วเหลืองฝักสด โดยการใช้เชื้อสดและการพัฒนาสูตรสำเร็จพร้อมใช้ (ชัยสิทธิ์ และสุคฤดี, 2548; สุคฤดี และคณะ, 2549) โดยสามารถควบคุมโรคใบจุดบนที่เกิดจาก *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ และโรคสำคัญอื่น ๆ ของถั่วเหลืองที่เกิดจากราและไวรัสได้ นอกจากนี้ยังส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำความต้านทานโรคสำคัญของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ได้แก่ ข้าวโพด งา สัก กระจับเตพา หน้าวัว และพืชตระกูลกะหล่ำ ชื่อ *Paenibacillus papuli* SW01/4 ให้ผลควบคุมโรคได้ดีในเรือนทดลองและมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้สารเคมี copper

hydroxide และ streptomycin ส่งเสริมการเจริญของระบบราก และพบว่าเชื้อ *S. marcescens* SPT360 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้หลากหลายทั้งพืชป่า ได้แก่ สัก กระถินเทพา รวมทั้งถั่วเหลืองด้วย (สมใจ, 2547) โดยสามารถลดความรุนแรงของโรครากเน่าโคนเน่าและกล้าเน่า damping-off ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* และ *Sclerotium rofsii* ของถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *P. fluorescens* SP007s ที่แยกจากดินรอบรากของกะหล่ำดอก มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และมีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดกะหล่ำดอก (วิลาวรรณ์, 2551) และการใช้ควบคุมโรคขอบใบทองที่เกิดจาก *X. campestris* pv. *campestris* ทั้งการใช้ในรูปแบบเชื้อสดและสูตรสำเร็จ (นลินา, 2554) ซึ่งกลไกหลักของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เหล่านี้นอกจากจะช่วยในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแล้วเชื่อดังกล่าวยังมีกลไกที่โดดเด่นในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณผลผลิตพืชต่าง ๆ ได้สูงอีกด้วย โดยมีการศึกษาพบว่า การเจริญเติบโตของพืชมีความสัมพันธ์กับการผลิตสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ IAA และ GA (ณัฐยา และคณะ, 2550 ; วิลาวรรณ์, 2549 ; Buensanteai *et al.*, 2008) ทั้งนี้โดยทั่วไปการใช้แบคทีเรียจะใช้แบบเชื้อแบบเดี่ยว โดยการใช้แบคทีเรียดังกล่าวเป็นการใช้แบบเชื้อเดี่ยว แต่มีรายงานว่าใช้เชื้อผสมในการควบคุมโรค โดยการใช้ *Pseudomonas chlororaphis* PA23 และ *Bacillus subtilis* BSCBE4 สามารถชักนำความต้านทานในระดับชีวเคมีที่มีปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการชักนำภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้น ประกอบด้วย phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase, polyphenol oxidase, phenol และลดการเกิดโรครากเน่าโคนที่เกิดจาก *Pythium aphanidermatum* ของพริกไทย (Nakkeeran *et al.*, 2006) ทั้งนี้มีรายงานของ Ruth *et al.*, 2002 ที่รายงานว่าการผสมระหว่างยีสต์ (*Pichia guilhermondii*) และ *Bacillus mycoides* สามารถยับยั้งโรคผลเน่าของสตอร์เบอร์รี่ที่เกิดจากเชื้อ *Botrytis cinerea* ได้ดีกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว

กลไกการชักนำความต้านทานของพืช และการส่งเสริมการเจริญเติบโต

การชักนำให้พืชมีกลไกในการปกป้องตัวเองและมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค (defense mechanism) เป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีต่อพืชและการควบคุมโรคซึ่งถือเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สำคัญ โดยเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารโปรตีนชักนำสามารถกระตุ้นกระบวนการปกป้องตัวเองจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคด้วยวิธีการต่างๆ ทั้งในระดับสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และ โมเลกุล (Buensanteai *et al.*, 2008) เช่น การกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา oxidative burst ซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ

ชีวเคมี โดยก่อให้เกิดการสะสมของ phytoalexins และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานของพืช (PR-proteins) เช่น เอนไซม์ chitinase และเอนไซม์ β -1,3-glucanase การชักนำความต้านทานของพืชที่เกิดจากการกระตุ้นของเชื้อเป็นความสัมพันธ์ของเชื้อกับพืชอาศัย เป็นกระบวนการจดจำ (recognition) ของพืชต่อเชื้อ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประจุไฟฟ้า (ion fluxes exchange) ที่ชั้นพลาสมาเมมเบรน ก่อให้เกิดการแตกตัวของออกซิเจนและมีการสร้าง nitric oxide และสารพวก reactive oxygen species (ROSs) ได้แก่ superoxide และ hydrogen peroxide ก่อให้เกิดการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงโปรตีนปกป้องตนเองของพืช ประกอบด้วยเอนไซม์ MAPK superfamily kinase เอนไซม์ superoxide dismutase เอนไซม์ NADPH oxidase เอนไซม์ lipoxygenase เอนไซม์ glucosyl transferase นอกจากนี้ยังพบว่าการสะสมของสารตัวกลางและเอนไซม์ของกระบวนการ phenolic accumulation pathway ประกอบด้วยเอนไซม์ peroxidase เอนไซม์ polyphenol oxidase เอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase สาร salicylic acid และสาร benzoic acid (Van Loon and Van Strien, 1999) ซึ่ง signal molecule จะส่งสัญญาณตัวกลางให้พืชเกิดความต้านทานทั้งระบบ (systemic acquired resistance : SAR และ induced systemic resistance : ISR) อย่างไรก็ตามกลไกที่เกี่ยวข้องโดยตรงต่อการปกป้องพืชจากเชื้อโรค และการชักนำภูมิคุ้มกันต้านทาน แล้วยังมีผลโดยอ้อมต่อการชักนำการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางสรีรวิทยา และโมเลกุล โดยเชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตด้วย นอกจากนี้กลไกจะช่วยเพิ่มพูนการทำหน้าที่ของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (growth regulators) ได้แก่ การกระตุ้นการสังเคราะห์สารออกซิน ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ยังมีรายงานพบในกลุ่ม *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Serratia Paenibacillus*, *Azospirillum* และ *Glucomacetobacter* เชื้อเหล่านี้จะมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืช สามารถเข้าสู่รากพืชได้โดยตรงและอ้อมแล้วไปมีผลต่อการกระตุ้นกระบวนการ defense mechanisms ต่าง ๆ ภายในพืช (Suzuki *et al.*, 2003) Somers *et al.*, 2005 ปัจจุบันมีรายงานว่าแบคทีเรีย รา และสาหร่ายบางชนิดสามารถสังเคราะห์ออกซินธรรมชาติ (indole-3-acetic acid : IAA) ชนิดเดียวกับออกซินที่พบในพืช (Kang *et al.*, 2006; Mordukhova *et al.*, 2000) ส่งผลให้ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต และช่วยชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยการกระตุ้นกลไกการปกป้องตนเองให้พืชเกิดความต้านทานทั้งระบบ Buensanteai *et al.*, 2008 และ Araujo *et al.*, 2005

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคพืช

การนำเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติมาใช้ในการควบคุมโรคพืชมีข้อจำกัดที่ต้องศึกษา เนื่องจากเมื่อนำจุลินทรีย์ไปใช้ในแปลงปลูกมีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องกับความสำเร็จของการใช้ทั้งปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพ การพัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์จึงเป็นอีกขั้นตอนหรือกระบวนการสำคัญที่จะสามารถส่งเสริมให้การนำจุลินทรีย์สายพันธุ์คุณภาพไปปรับใช้ในระบบการผลิตพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีคุณสมบัติในการลดและ/หรือชะลอการเจริญของเชื้อในสูตรผลิตภัณฑ์ และ/หรือกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ทันที ประกอบด้วยต้องรักษาหรือคงความมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ประสิทธิภาพของสูตรผลิตภัณฑ์ที่ดีขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการประกอบด้วย

- 1) ปัจจัยทางด้านชนิดและโครงสร้างของเซลล์ที่มีความแตกต่างกันระหว่างแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์
- 2) ความเข้ากันได้ระหว่างสารพาหรือสารผสมกับแบคทีเรียปฏิชีวนะซึ่งต้องไม่มีผลต่อผนังเซลล์ ไม่มีผลต่อการผลิตสารที่เป็นประโยชน์และไม่ลดหรือทำลายประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิชีวนะในการควบคุมโรค (Burgess, 1998)
- 3) กลไกของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคในสภาพธรรมชาติ
- 4) การเลือกใช้วัสดุหรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นส่วนประกอบของอาหารสำหรับเพิ่มปริมาณเซลล์และ/หรือพัฒนาสูตรสำเร็จอยู่ในรูปที่สามารถจัดการได้ง่าย เช่น การเก็บรักษาและการขนส่ง

การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ (microbial formulation) คือ การนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพไปผสมกับวัสดุหรือส่วนประกอบอื่นๆ เช่น สารอินทรีย์และ/หรืออินินทรีย์ที่ไม่มีผลต่อการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของเชื้อ โดยวัสดุประสงค์หลักเพื่อรักษาความมีชีวิตคงประสิทธิภาพ เพิ่มคุณภาพ และ ความง่ายและสะดวกต่อการใช้ ทั้งนี้ส่วนผสมและอัตราส่วนผสมตลอดจนสภาพการเก็บรักษา เป็นปัจจัยที่สำคัญในการรักษา หรือยืดอายุเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ (Stein *et al.*, 1996) การเก็บผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ยังคงมีชีวิต จะต้องคำนึงถึงการลดกิจกรรมของเซลล์ และผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ต้อง

อยู่ในสภาพที่ปลอดภัย ไม่มีการปนเปื้อนหรือการถ่ายเทเข้าออกของอากาศตลอดจนไม่เกิดสภาพความชื้นผันแปร ขั้นตอนการพัฒนาการผลิตสูตรผลิตภัณฑ์ จำเป็นต้องมีการศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องในทุกขั้นตอนและต้องเป็นไปตามขั้นตอน (อมรรัตน์, 2547) ทั้งนี้ขั้นตอนและกระบวนการในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จะประกอบด้วย

1. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียปฏิภักษ์เป้าหมาย

แบคทีเรียที่จะนำมาพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จสายพันธุ์เชื้อต้องผ่านการคัดเลือก และทดสอบประสิทธิภาพที่ชัดเจนแล้ว ทั้งนี้ในระดับห้องปฏิบัติการ เรือนทดลอง และสภาพไร่ มีการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับการเจริญและพัฒนาการในสภาพการใช้จริง และมีการยืนยันการไม่เป็นเชื้อสาเหตุโรคคนหรือด้วยวิธีการที่เป็นมาตรฐานและยอมรับได้จากหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

2. ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

ส่วนประกอบของอาหารและสภาวะการเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปจะประกอบด้วยแหล่งของธาตุอาหาร 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ให้พลังงาน ได้แก่ แหล่งคาร์บอน กลุ่มส่งเสริมประสิทธิภาพ ได้แก่ แหล่งไนโตรเจน และกลุ่มธาตุอาหารต่างๆ ได้แก่ วิตามิน และธาตุอาหารต่าง ๆ (สมใจ, 2550)

2.1) แหล่งคาร์บอน (carbon source) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและการดำรงของจุลินทรีย์ พบว่า โดยทั่วไป glucose จะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด สำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แต่ในขณะเดียวกันก็ทำให้เกิด carbon catabolite refulation ซึ่งเป็นลักษณะที่กลูโคสมีผลขัดขวางการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ วิธีการแก้ปัญหานี้ เช่น การใช้แหล่งคาร์บอนสองชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (Iwai and Omura, 1982) จากรายงานของ Sandrin *et al.*, 1990 พบว่า การผลิตสารร่วมกันของสารประเภท lipopeptide คือ surfactin และ Iturin A จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ATCC 21332 ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อรา แบคทีเรียสามารถผลิตสาร lipopeptide ได้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ โดยสารตั้งต้นที่ดี คือ L-amino acid ซึ่งเป็นลักษณะที่ amino acid หมุนในทิศทางซ้ายของแนวราบแสงโพลาไรซ์ และใช้ sucrose, fructose และ glucose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี พบว่าผลผลิตที่ได้ของ surfactin 110 ml/liter/absorbance unit และ ปริมาณ Itruin A

39 ml/liter/absorbance unit ดังนั้นชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และชนิดของสารปฏิชีวนะที่ผลิต ซึ่งการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า น้ำตาลชนิดที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้อย่างช้าๆ จะให้ผลผลิตของสารปฏิชีวนะสูง (Hu and Demain, 1979) การผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนหลายชนิด หรือที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน สามารถให้การผลิตสารปฏิชีวนะได้มากกว่าการผลิตในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวได้ เช่น การผลิตจากอาหารที่มีหรือร่วมกันเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ปริมาณการผลิตได้มากกว่าการใช้กลูโคสอย่างเดียว (Aldwin *et al.*, 1990)

2.2) แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) การเปลี่ยนแปลงชนิด และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ เนื่องจากการผลิตสารปฏิชีวนะมีการควบคุมโดย nitrogen metabolite ซึ่งการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะสามารถถูกกวดการสร้างได้โดย แอมโมเนีย และชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ใช้ได้เร็ว แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสารปฏิชีวนะ (Aharonowitz, 1980) นอกจากนั้นกรดอะมิโนไนโตรเจนจะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด และทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี เช่น การผลิต gramicidin S พบว่าจุลินทรีย์ต้องการกรดอะมิโน 5 ชนิดเพื่อการเจริญเติบโต ขณะที่การเติม phenylalanine สามารถกระตุ้นการผลิต gramicidin S โดยทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นเพื่อเปลี่ยนแปลงเป็น D-phenylalanine (Katz and Demain, 1977)

2.3) แหล่งธาตุอาหาร มีความสำคัญ จึงจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์และต้องเพิ่มธาตุเหล่านี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยตรง ดังนี้

(2.3.1) อนินทรีย์ฟอสเฟต (inorganic phosphate) ถ้าอนินทรีย์ฟอสเฟตมากในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเร่งการใช้แหล่งอาหารคาร์บอน แหล่งอาหารไนโตรเจนและขบวนการหายใจ เป็นผลให้เกิดการเจริญดี แต่การผลิตสารปฏิชีวนะจะลดลง (Weinberg, 1974)

(2.3.2) ธาตุรองที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace metals) โลหะหลายชนิดจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็น Co-factor ในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ ได้แก่ Fe Co Mn Mg Zn Cr Cu และ Mo สำหรับ Mn Fe Zn และ Mg มักจะมีบทบาทสำคัญในการผลิตสาร secondary metabolites (Weinberg, 1970)

(2.3.3) เกลืออนินทรีย์ (inorganic salts) ที่นิยมใช้กันทั่วไป เพื่อเพิ่มสารปฏิชีวนะ คือ sodium chloride โดย Okami *et al.* (1975) พบว่าการผลิต aplasmomycin จาก Streptomyces จะดีที่สุดเมื่อมี sodium chloride 1.0-3.0 เปอร์เซ็นต์

2.4) ชนิดของสารปกป้องเซลล์ (cell protectant) และสารเพิ่มประสิทธิภาพที่ใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

การพัฒนาการผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โดยทั่วไปมีเป้าหมายหลัก 2 ประการคือ คงความมีชีวิตของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เหล่านี้ และการเสริมหรือกระตุ้นกลไกของจุลินทรีย์ เมื่อมีการใช้ในสภาพแวดล้อม ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์จึงต้องควรเลือกสารที่มีประสิทธิภาพประกอบด้วย

2.4.1) สารพา (carrier)

สามารถแบ่งเป็นสารอินทรีย์ เช่น vermiculite clay calcium sulphate และ mineral soil และสารอินทรีย์ เช่น น้ำมันพืช จีเลอ รำข้าวสาลี เป็นต้น โดยทั่วไปสารพามีลักษณะเป็นสารเฉื่อย และทำหน้าที่เป็นตัวพาเชื้อจุลินทรีย์ให้กระจายตัวอย่างทั่วถึงเมื่อนำสูตรสำเร็จไปใช้งาน สารพาที่เป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ จากการทดลองของ Fravel *et al.* (1995) พบว่าสารอินทรีย์ เช่น ข้าวโพด กากถั่วเหลือง รำข้าวสาลี จะมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน เท่ากับ 96.6, 25.4 และ 21.1 ตามลำดับ ซึ่งมีผลต่อการดำรงชีวิตรอดของเชื้อหลังการทำแห้งและพบว่าการผลิตสูตรสำเร็จ เชื้อ *Talaromyces flavus* เมื่อใช้ซังข้าวโพดสารพาปริมาณเชื้อรอดชีวิตสูงกว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลืองหรือรำข้าวสาลี หลุยส์ (2551) รายงานว่าการพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท CMs026 และ PAOs044 ใช้สารพา 4 ชนิดคือ dolomite talcum powder hyflo supercell และ diatomaceous earth พบว่าสารพาชนิด dolomite มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ

2.4.2) สารเสริมประสิทธิภาพ (Adjuvant)

ในกระบวนการผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมสารเสริมประสิทธิภาพเซลล์เพื่อป้องกันปฏิปักษ์ของโปรตีนและเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่นการใช้ alpha-trehalose-borate เพื่อป้องกัน *Lactobacillus acidophilus* ในระหว่างกระบวนการทำผลิตแบบแช่แข็ง โดย trehalose มีประสิทธิภาพเป็นสาร

ป้องกันเซลล์ที่ดัดนิยมาใช้ในอุตสาหกรรม นอกจากนี้ borate ช่วยป้องกันเอนไซม์จากการถูกทำลาย และเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่ trehalose จากรายงาน Abadias *et al.* (2001) ศึกษาการเติมหางนม 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นสารป้องกันเซลล์ในกระบวนการทำแห้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อยีสต์ *Candida sake* โดยช่วยให้เชื้อมีชีวิตรอด 28.9 เปอร์เซ็นต์

2.5) สภาพของการเลี้ยงเชื้อที่สำคัญในการผลิตสาร secondary metabolites ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

2.5.1) ความเป็นกรด-ด่างในอาหาร ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญ และการผลิตสารปฏิชีวนะ การรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างในอาหาร ทำได้โดยการเติมสารเคมีที่เป็น buffering agent เช่น CaCO_3 , K_2HPO_4 หรือ NaHCO_3 (Iwai *et al.*, 1973)

2.5.2) ระดับของอุณหภูมิ โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะจะคงที่ที่อุณหภูมิหนึ่งตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุด แต่อุณหภูมิของการเจริญจะผันแปรในช่วงกว้าง (Iwai and Omura, 1982)

2.5.3) ปริมาณของออกซิเจน จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ ส่วนมากต้องการออกซิเจนในการเจริญ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำนั้นต่ำมาก จึงจำเป็นต้องมีการให้อากาศในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (Tuffile and Pinho, 1970)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน และแบคทีเรียปฏิปักษ์

1.1 แหล่งที่มาของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน และแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* สายพันธุ์ No.12-2 สาเหตุโรคใบจุดนูนและแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์คุณภาพของภาควิชาโรคพืชจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46, *Paenibacillus pabuli* SW01/4, *Serratia marcescens* SPt360 และ *Pseudomonas fluorescens* SP007s จากตู้เก็บรวบรวมเชื้อ (culture collection) ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เก็บด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส โดยนำเชื้อทั้งหมดแต่ละสายพันธุ์มาทำการเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) โดยวิธี cross streak ปุ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง ทำการ subculture ซ้ำ 1-2 ครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเพื่อยืนยันชั้นต้นว่าเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรค และแบคทีเรียปฏิปักษ์เป้าหมาย ก่อนนำไปทดสอบคุณสมบัติเพื่อยืนยันสายพันธุ์ต่อไป

1.2 การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการเพื่อการจำแนกสายพันธุ์

1.2.1 การศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดนูน และแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้จากข้อ 1.1 มาทดสอบเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* บนอาหาร yeast extract dextrose calcium carbonate agar (YDCA) และบนอาหาร NA เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร

และทำการทดสอบคุณสมบัติการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายติดตามเชื้อ (antibiotic marker) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์บนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ และความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ tetracycline,

streptomycin, ampicillin และ rifampicin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 5 µg/มิลลิลิตร และเมื่อเจริญได้จะทำการย้ายไปทดสอบต่อบนอาหารที่ผสมสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดที่เพิ่มระดับความเข้มข้นของสารเป็น 10, 20, 30, 50, 100 และ 150 µg/มิลลิลิตร ทำการ subculture เชื้อ เลี้ยงซ้ำบนอาหารที่ผสมสารปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้ 2-3 ครั้ง และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในระดับห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ wildtype

1.2.2 การทดสอบคุณสมบัติการติดสีแกรม และคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค และแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดมาทดสอบคุณสมบัติการติดสี (Gram's stain) และรูปร่างเซลล์ ตามวิธีการของ Schaad (1988) โดยเลี้ยงเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* และแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. amyloliquefaciens* KPS46, *P. pabuli* SW01/4, *S. marcescens* SPt360 และ *P. fluorescens* SP007s บนอาหารแข็ง NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop และ โคโลนีเดี่ยวของเชื้อมากระจาย (smear) ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่ผ่านการลนไฟมาเชื้อและทำลายคราบมันแล้ว fixed เซลล์ ด้วยการลนผ่านเปลวไฟประมาณ 1-2 ครั้ง จากนั้นหยดสาร Crystal violet ให้ทั่วบริเวณรอย smear ปล่อยให้แห้ง 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้งแล้วล้างออกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 10 วินาที ตามด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นหยดสาร Safanin-O บริเวณที่เกลี่ยเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 15-30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้ง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลัง 1,000 เท่า บันทึกผลการติดสีแกรม ลักษณะรูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ ถ้าติดสีม่วงของ Crystal violet จะเป็นแกรมบวก แต่ถ้าติดสีแดงของ Safanin-O จะเป็นแกรมลบ

สำหรับคุณสมบัติทางชีวเคมีกรณีเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ทดสอบโดยการเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA อายุ 24-36 ชั่วโมง นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การใช้ออกซิเจน การเกิดปฏิกิริยา catalase, indole production, nitrate reduce to nitrite, urea hydrolysis, starch hydrolysis, levan formation, lipolytic activity test (Tween 80), citrate utilization และ gelatin hydrolysis (Gerhardt, 1981) รวมทั้งคุณสมบัติการทำปฏิกิริยาการเกิดกรดกับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ คือ cellobiose, fructose, glucose, dextrose, mannitol, sorbitol, maltose และ dulcitol

สำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือการทดสอบการใช้ออกซิเจน การเกิดปฏิกิริยา catalase production, motility, starch hydrolysis, levan formation, lipolytic activity test (Tween 80), salt tolerance, endospore forming, potato soft rot, citrate utilization, gelatin hydrolysis และ oxidase test (Gerhardt, 1981) นำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบข้างต้นทั้งในลักษณะการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อเปรียบเทียบกับข้อมูลเฉพาะของสายพันธุ์ที่มีรายงาน เพื่อใช้ประกอบการยืนยันสายพันธุ์

1.2.3 การทดสอบการเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines*

1.2.3.1 การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนใบยาสูบ

เตรียม cell-suspension ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบนอายุ 24 ชั่วโมง ที่เลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) โดยนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ และปรับความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (มีปริมาณ cell-suspension ประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร) จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาแบบพลาสติกขนาดเล็ก (1-2 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อ ฉีด suspension ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ที่เตรียมประมาณ 1 มิลลิลิตร ไล่ฟองอากาศออก นิด (infiltrate) เข้าสู่เนื้อใบของยาสูบ (*Nicotina tabacum*) อย่างช้า ๆ ค้านใต้ใบ โดยไม่ใส่เข็มฉีดยา ใบยาสูบจะมีลักษณะชุ่มน้ำ หลังจากนั้นประมาณ 30 นาที ใบยาสูบจะกลับสู่สภาพปกติ บันทึกรูปโดยถ้าเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชจะเกิดอาการตายของเซลล์บนใบยาสูบ (necrotic lesion) ทำให้เห็นเป็นแผลสีน้ำตาลรอบบริเวณที่ฉีดเชื้อภายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังฉีด cell-suspension เชื้อสาเหตุโรค

1.2.3.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนต้นถั่วเหลือง

นำ cell-suspension เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *glycines* ที่เตรียมเช่นเดียวกับวิธีข้างต้นตามข้อ 1.2.3.1 มาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค โดยปลูกเชื้อลงบนต้นถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์อ่อนแอ (No.75) โดยพ่น cell-suspension ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 O.D. (ประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร) ผสมสารเสริมประสิทธิภาพในการยึดติดใบ (0.1 เปอร์เซ็นต์ tension) พ่นลงบนต้นถั่วเหลืองอายุ 30 วัน ที่ปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว ด้วยเครื่องพ่นมือ (hand

spray) 20 มิลลิลิตร/ต้น เก็บรักษาต้นพืชทดสอบในสภาพอุณหภูมิปกติ โดยให้ความชื้นสูงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และคลุมด้วยถุงพลาสติก ตรวจสอบลักษณะอาการ โรค และความรุนแรง หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน

2. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนใน ห้องปฏิบัติการ

เลี้ยงเชื้อแยกกันระหว่าง *X. axonopodis* pv. *glycines* และแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ คือ *B. amyloliquifaciens* KPS46, *P. pabuli* SW01/4, *S. marcescens* SPT360 และ *P. fluorescens* SP007s ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของ suspension เชื้อทั้งสองด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.2 O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ใช้ micropipette ดูด suspension เชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในขวดที่บรรจุอาหาร NA ที่หลอมอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อปล่อยให้แห้งผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง ใช้ micropipette ดูด cell-suspension แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมข้างต้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองกลมเบอร์ 1 (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรที่อบฆ่าเชื้อแล้ว วางกระดาษกรองลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA ผสมเชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ข้างต้นจานละ 4 จาน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบบริเวณใส (clear inhibition zone) รอบแผ่นกระดาษหลังปลูกเชื้อไปแล้ว 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)} = \frac{\text{ความกว้างบริเวณยับยั้งทั้งหมด} - \text{ความกว้างของโคโลนี}}$$

2

3. การศึกษาการเจริญร่วมกันของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด และการยับยั้งเชื้อโรคใบจุดบน

3.1 การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว

ย้ายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ที่เจริญบนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 1 โคลินีลในอาหารเหลว NB ปริมาตร 20 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ใน flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อเขย่าเพื่อเพิ่มอากาศที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.2 O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใช้ micropipette คูด cell-suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในสภาพอุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที นำ cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่ 0, 6, 12, 24, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง มาทำการตรวจสอบจำนวนประชากรเชื้อด้วยวิธี dilution plate count โดยคูด cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อที่ระดับ 10^{-7} , 10^{-8} และ 10^{-9} เท่า คูด cell-suspension ที่ได้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ที่แบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ต้านทานได้จากการศึกษาในข้อ 1.2 (ตารางที่ 1) กระจายให้ทั่วผิวน้ำอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารและนำมาคำนวณเป็นค่า cfu/มิลลิลิตร

3.2 การศึกษาการเจริญร่วมกันของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์บนอาหารแข็ง

3.2.1 การทดสอบด้วยวิธี dual culture

เตรียม cell-suspension แบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกสายพันธุ์ได้แก่

B. amyloliquefaciens KPS46, *P. pabuli* SW01/4, *S. marcescens* SPt360 และ *P. fluorescens* SP007s โดยนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง เตรียมเป็น cell-suspension โดยปรับความขุ่นให้มีค่าเท่ากับ 0.2 O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และใช้ loop ปลอดเชื้อจุ่ม cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ขีดเป็นแนวตรงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อในลักษณะคู่ขนาน โดยมีระยะห่างของรอยขีดเชื้อทดสอบคู่ขนาน 1 เซนติเมตร บ่มเชื้อไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ประเมินลักษณะการเจริญของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เป็นคู่ขนานกันในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อประเมินแนวโน้มการเจริญร่วมกันได้

3.2.2 การทดสอบด้วยวิธี agar diffusion

ใช้ micropipette ดูด cell-suspension แบบที่เรียกปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ที่ปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 0.2 O.D. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในขวดบรรจุอาหาร NA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (แยกแต่ละเชื้อ) ที่หลอมเหลวมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันและเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะหลุมบนผิวหน้าอาหารจำนวน 4 จุด จากนั้นใช้ micropipette ดูด cell-suspension ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทดสอบต่างสายพันธุ์ที่เตรียมตามขั้นตอนข้างต้นปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมที่เตรียมแต่ละหลุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ประเมินความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ที่อยู่ในหลุมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผสมในอาหารทดสอบโดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้ น้ำกลั่นนี้้งฆ่าเชื้อหยดลงในหลุมทดสอบแทน

3.2.3 การทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion

เลี้ยงเชื้อแยกกันระหว่างแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเตรียม cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 3.2.1 ดูด cell-suspension เชื้อแต่ละสายพันธุ์ 1 มิลลิลิตร เติมลงในอาหาร NA ที่หลอมเหลวอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ใช้ micropipette ดูด cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ที่เตรียมข้างต้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองกลมเบอร์ 1 (paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ใช้คีบคีบ (forceps) คีบกระดาษกรองที่มีเชื้อปฏิปักษ์วางลงบนจานอาหาร NA ทดสอบให้มีระยะห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประเมินลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละคู่ทดสอบ

3.3 การศึกษาการเจริญร่วมกันของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ในอาหารเหลว และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน

3.3.1 การเตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์และการทดสอบการเจริญร่วมกันในอาหารเหลว

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ต่าง ๆ คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46, *P. pabuli* SW01/4, *S. marcescens* SPt360 และ *P. fluorescens* SP007s มาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่

ผสมสารปฏิชีวนะที่เชื้อแต่ละชนิดสามารถต้านทานได้ จากการทดสอบในข้อ 1.2.1 และบ่มเชื้อที่สภาพอุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) นาน 24 ชั่วโมง และย้ายเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะจำนวน 1 loop มาแยกเลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที นาน 16-18 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของ cell- suspension เท่ากับ 0.2 O.D. (10^7 - 10^8 cfu/มิลลิลิตร) ตามวิธีการในข้อ 3.1 จากนั้นใช้ micropipette ปลอดเชื้อดูด cell- suspension ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์เพื่อทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันในลักษณะ คู่ผสม 2 สายพันธุ์ ผสม 3 สายพันธุ์ และผสม 4 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยว การผสมเชื้อเพื่อเลี้ยงร่วมกัน ปฏิบัติโดยการผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกันคือ 1:1, 1:1:1 และ 1:1:1:1 ในการเลี้ยงผสมแบบคู่ผสม 2 เชื้อ 3 เชื้อ และ 4 เชื้อ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) อัตราการผสมเชื้อเริ่มต้นจะผสมใน microtube ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร และนำไปผสมลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนประชากรเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยกรรมวิธีผสมหลายสายพันธุ์และแบบเดี่ยวด้วยวิธี dilution plate count โดยดูด cell-suspension เชื้อจาก flask เลี้ยงเชื้อแต่ละ flask ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อที่ 3 ระดับการเจือจางคือ 10^{-7} , 10^{-8} และ 10^{-9} เท่า จากนั้นดูด cell-suspension ที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะที่เชื้อแต่ละชนิดต้านทานได้ กระจาย (spread) ให้ทั่วผิวน้ำอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนโคโลนีเชื้อที่เจริญบนอาหารและนำมาคำนวณเป็นค่า cfu/มิลลิลิตร เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่เจริญบนอาหาร ทั้งวิธีการเลี้ยงแบบเดี่ยวและแบบผสม เปรียบเทียบสภาวะการเลี้ยงแต่ละกรรมวิธี

ตารางที่ 1 อัตราส่วนการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบสายพันธุ์เดี่ยวและแบบผสมหลายสายพันธุ์
ในอาหารเหลว NB

คู่ผสมที่	สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ^{1/}	อัตราส่วนผสม ^{2/} (v/v)
1	KPS46	1
2	SP007s	1
3	SW01/4	1
4	SPt360	1
5	KPS46+SP007s	1:1
6	KPS46+SW01/4	1:1
7	KPS46+SPt360	1:1
8	SP007s+SW01/4	1:1
9	SP007s+SPt360	1:1
10	SW01/4+SPt360	1:1
11	KPS46+SP007s+SW01/4	1:1:1
12	KPS46+SP007s+SPt360	1:1:1
13	SP007s+SW01/4+SPt360	1:1:1
14	KPS46+SPt360+SW01/4	1:1:1
15	KPS46+SP007s+SW01/4+SPt360	1:1:1:1

^{1/} สายพันธุ์เชื้อปฏิปักษ์ KPS46 = *B. amyloliquefaciens*, SW01/4 = *P. pabuli*, SPt360 = *S.*

marcescens และ SP007s = *P. fluorescens*

^{2/} cell suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 0.2 O.D. ($\sim 10^7 - 10^8$ cfu/ มิลลิลิตร) ส่วนผสมจะมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิลิตร ในหลอด microtube

3.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสมหลายสายพันธุ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน

คัดเลือกกลุ่มผสมและอัตราส่วนผสมแบคทีเรียปฏิชีวนะต่างสายพันธุ์ที่สามารถเจริญร่วมกันได้ตามวิธีการข้อ 3.3.1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงเชื้อแยกกันระหว่าง *X. axonopodis* pv. *glycines* และเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์กลุ่มผสมแบบ 2 สายพันธุ์ ผสม 3 สายพันธุ์ และผสม 4 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์แบบเดี่ยว โดยผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกันดังรายละเอียดในตารางที่ 1 ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ cell-suspension เชื้อที่เลี้ยงแต่ละลักษณะมาปรับค่าความขุ่นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.2 O.D. จากนั้นใช้ micropipette คูด cell-suspension เชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในขวดที่บรรจุอาหาร NA ที่หลอมอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อปล่อยให้แห้งให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง ใช้ micropipette คูด suspension แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์กลุ่มผสมและสายพันธุ์เดี่ยวที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองกลมเบอร์ 1 (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรที่อบฆ่าเชื้อแล้ว วางกระดาษกรองลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA ผสมเชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมไว้จานละ 4 จาน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง ตรวจสอบบริเวณใส (clear inhibition zone) รอบแผ่นกระดาษกรอง เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งของแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์แบบเดี่ยวและแบบผสมที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อโรคเป้าหมาย

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสมหลายสายพันธุ์ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดและการวิเคราะห์ปริมาณสาร indole -3- acetic acid (IAA)

3.4.1 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด

เตรียม cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ต่าง ๆ ตามวิธีการในข้อ 3.3.2 ใช้แบบเชื้อเดี่ยวและแบบผสม โดยผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกันดังรายละเอียดในตารางที่ 1

จากนั้นนำ cell-suspension ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาคลุกเมล็ดถั่วเหลืองฝักสด พันธุ์ No.75 ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย clorox 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที และล้างออกด้วย น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ คลุกเมล็ดถั่วเหลือง 30 กรัม คลุกให้ทั่วผิวเมล็ดปล่อยให้เมล็ดแห้ง จากนั้นนำไป เพาะโดยวางเมล็ดบนกระดาษขึ้น (blotter method) ในจานเลี้ยงเชื้อ (ดิยากร และคณะ, 2551) โดยใช้ ปากคีบ forceps ปลอดภัยเมล็ดถั่วเหลือง วางลงบนกระดาษเพาะเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่วางอยู่ใน จานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 10 เมล็ด/จานเลี้ยงเชื้อ เติมน้ำให้ชุ่มกระดาษเพาะประมาณ 3-5 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเติมน้ำให้ความชื้นทุกวันปริมาณเท่ากันทุกจานทดสอบ (2-3 มิลลิลิตร) และประเมินอัตราการงอกเมล็ด จำนวนรากแขนง ความสูงของลำต้น ความยาวราก และ น้ำหนักสดลำต้นที่อายุ 7 วันเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่คลุกเมล็ดด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณ indole-3-acetic acid (IAA) ที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ผลิต ในอาหารเลี้ยง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์แบบเดี่ยว และแบบเชื้อผสม โดยผสม cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ปรับค่าความขุ่นที่ 0.2 O.D. ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันตาม วิธีการข้อ 3.3.1 (ตารางที่ 2) นำส่วนผสม cell-suspension เชื้อ 1 มิลลิลิตร เติมลงในอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่สภาพอุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีแสง (dark condition) นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละ สายพันธุ์แบบเดี่ยว และแบบเชื้อผสมที่เลี้ยงในอาหาร NB มาตกตะกอนแยกเซลล์แบคทีเรียด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Salkowski's reagent (sigma) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 535 นาโนเมตร ด้วย spectrophotometer รุ่น EC1011 ประเมินผลโดยใช้หลักการความเข้มของสีที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร indole-3-acetic acid กับกรด sulfuric (colorimeter) คำนวณปริมาณสาร indole-3-acetic acid เปรียบเทียบกับสาร มาตรฐานที่ความเข้มข้นที่ระดับ 0-50 μg /มิลลิลิตร

3.5 การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมต่อการเพิ่ม ปริมาณ และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน

นำคู่ผสมแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 สายพันธุ์คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่อัตราผสม 1:1 ซึ่งผ่านการทดสอบในข้อ 3.3 และพบว่ามีการขยายตัวของแบคทีเรียปฏิปักษ์สูงสุดในการเลี้ยงแบบผสม รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนได้ดีที่สุด มาหาสัดส่วนที่เหมาะสมที่สามารถชักนำให้ประชากรเชื้อทั้ง 2 ชนิดสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้มากกว่าอัตราส่วนเดิม โดยเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ทดสอบแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของ cell- suspension เท่ากับ 0.2 O.D. (10^8 cfu/มิลลิลิตร) เป็นค่าตั้งต้น จากนั้นใช้ micropipette ปลอดเชื้อ ดูด cell-suspension ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ผสมที่เตรียมไว้ปริมาณข้างต้น 1 มิลลิลิตร เติมนลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน flask 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง 28-30 องศาเซลเซียส ที่ 48 ชั่วโมง ดูด cell-suspension เชื้อจาก flask แต่ละ flask มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อที่ 3 ระดับการเจือจางคือ 10^{-7} 10^{-8} และ 10^{-9} เท่า ดูด cell-suspension ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะที่เชื้อแต่ละชนิดต้านทานได้ spread plate ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะที่เชื้อแต่ละชนิดต้านทานได้ คำนวณเป็นค่า cfu/มิลลิลิตร เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนด้วยวิธี paper disc ตามวิธีการข้อ 3.3.2

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการครอบครองผิวใบถั่วเหลือง และการผลิตสารยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนบนผิวใบถั่วเหลือง

4.1 การศึกษาประชากรแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนบนผิวใบถั่วเหลือง

ศึกษาการมีชีวิตรอดของประชากรแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบสายพันธุ์เดี่ยวและแบบสายพันธุ์ผสม และเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนบนผิวใบถั่วเหลือง โดยการพ่น cell-suspension ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการชักนำให้ต้านทานสารปฏิชีวนะจากวิธีการข้อ 1.2.1 ซึ่งปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 0.2 O.D. ลงบนต้นถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ No.75 อายุ 14 วัน ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้น 24 ชั่วโมง แยกต้นถั่วเหลืองที่ผ่านการพ่นด้วย cell- suspension แบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์เป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 พ่นเฉพาะ cell-suspension แบคทีเรียปฏิปักษ์ และชุดการทดลองที่ 2 พ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์และตามด้วยการปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines*

สาเหตุโรคใบจุดนูนที่ปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 0.2 O.D. (10^8 cfu/มิลลิลิตร) หลังจากพ่นเชื้อปฏิบัติการ 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายต้นถั่วเหลืองที่ผ่านการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนไปเก็บรักษาไว้ในสภาพธรรมชาติ สุ่มเก็บตัวอย่างใบถั่วเหลืองทั้ง 2 ชุดการทดลองหลังทำการปลูกเชื้อที่ 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 และ 168 ชั่วโมง มาตรวจสอบประชากรเชื้อที่ผิวใบ โดยสุ่มเก็บใบถั่วเหลืองต้นละ 3 ใบ จากระดับต่างๆ คือ ใบบน ใบกลาง และใบล่าง นำตัวอย่างใบถั่วเหลืองที่เก็บมาทดสอบด้วยวิธีตัดแปลง leaf wash technique โดยใส่ใบถั่วเหลืองลงในกล่องพลาสติกที่บรรจุน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 20 มิลลิลิตร ที่ผสมสารลดแรงตึงผิว (0.1 เปอร์เซ็นต์ tension) 1 หยดแช่ทิ้งไว้ประมาณ 15-30 นาที บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เพื่อให้แบคทีเรียละลายเคลื่อนที่ออกมาออกมามีอยู่ในน้ำ และใช้เป็น stock suspension ทำการเจือจางความเข้มข้นของน้ำล้างใบที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-3} เท่า ใช้ micropipette ดูดน้ำล้างใบแต่ละความเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะที่เชื้อแต่ละชนิดต้านทานได้ spread plate ให้ทั่วผิวน้ำอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวน โคโลนีที่เจริญบนอาหารและนำมาคำนวณเป็นค่า cfu/มิลลิลิตร

4.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติการในการผลิตสารยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนถั่วเหลืองในสภาพห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง

4.2.1 การทดสอบความสามารถการผลิตสารยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc

นำน้ำล้างใบถั่วเหลืองที่ผ่านการพ่นด้วยเชื้อปฏิบัติการและเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีการข้อ 4.1 มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค *X. axonopodis* pv. *glycines* โดยนำน้ำล้างใบที่เตรียมเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 4.1 มากรองด้วย sterile syringe filter ขนาด 0.45 ไมโคร และนำสารกรองที่ได้ไปหยดบนกระดาษกรอง และวางบนผิวน้ำอาหาร NA ที่ผสมเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ตรวจสอบการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) บนผิวน้ำอาหาร ทดสอบ เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้ง เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพผลิตสารยับยั้งเชื้อเป้าหมายได้ดีที่สุด

4.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำล้างใบในการควบคุมโรคใบจุดนูนในสภาพเรือนทดลอง

นำสารน้ำล้างใบถั่วเหลืองที่ผ่านการฟ้นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์แบบเดี่ยวและแบบผสมที่เตรียมไว้ข้างต้น (ตามวิธีการข้อ 4.1) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ฟ้นลงบนต้นถั่วเหลืองที่อายุ 14 วัน หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* (10^8 cfu/มิลลิลิตร) ลงบนต้นถั่วเหลืองปริมาณ 20 มิลลิลิตร/ต้น ประเมินการเกิดโรคใบจุดนูนที่ 7 และ 14 วันหลังปลูกเชื้อ โดยนำกระดาษกึ่งแข็งขนาด 4X7 เซนติเมตร เจาะรูเป็นวงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร จำนวน 9 ช่อง ที่ปรากฏจุดแผลคำนวณความรุนแรงของโรคตามสมการ (ชัยสิทธิ์, 2531) และวิเคราะห์ข้อมูล ค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 15

$$\text{ความรุนแรงของโรค (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนช่องที่ปรากฏจุดแผล} \times 100}{\text{จำนวนช่องทั้งหมดที่ปรากฏบนใบ (9 ช่อง)}}$$

5. การจำแนกชนิดสาร secondary metabolites ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบผสม โดยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC)

5.1 การศึกษาชนิดและสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตสาร secondary metabolites ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม

ทำการทดสอบชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสาร secondary metabolite ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโรคใบจุดนูนได้ดีที่สุด โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้แก่ nutrient glucose broth (NGB), malt-yeast extract broth (MY), King's medium B (KB) และ Luria Bertani broth (LB) และเลี้ยงแยกกันระหว่าง *X. axonopodis* pv. *glycines* สายพันธุ์ No.12-2 และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม โดยย้ายเชื้อแต่ละชนิดที่เจริญบนอาหาร NA อายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 1 loop ลงในอาหารเหลวแต่ละชนิดปริมาณ 20 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่อง refrigerator centrifuge ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งและเก็บตะกอนเซลล์มาละลายด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับค่าความขุ่นของ cell-suspension เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จะได้ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร ใช้ micropipette คูด cell-suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม ปริมาตร 1

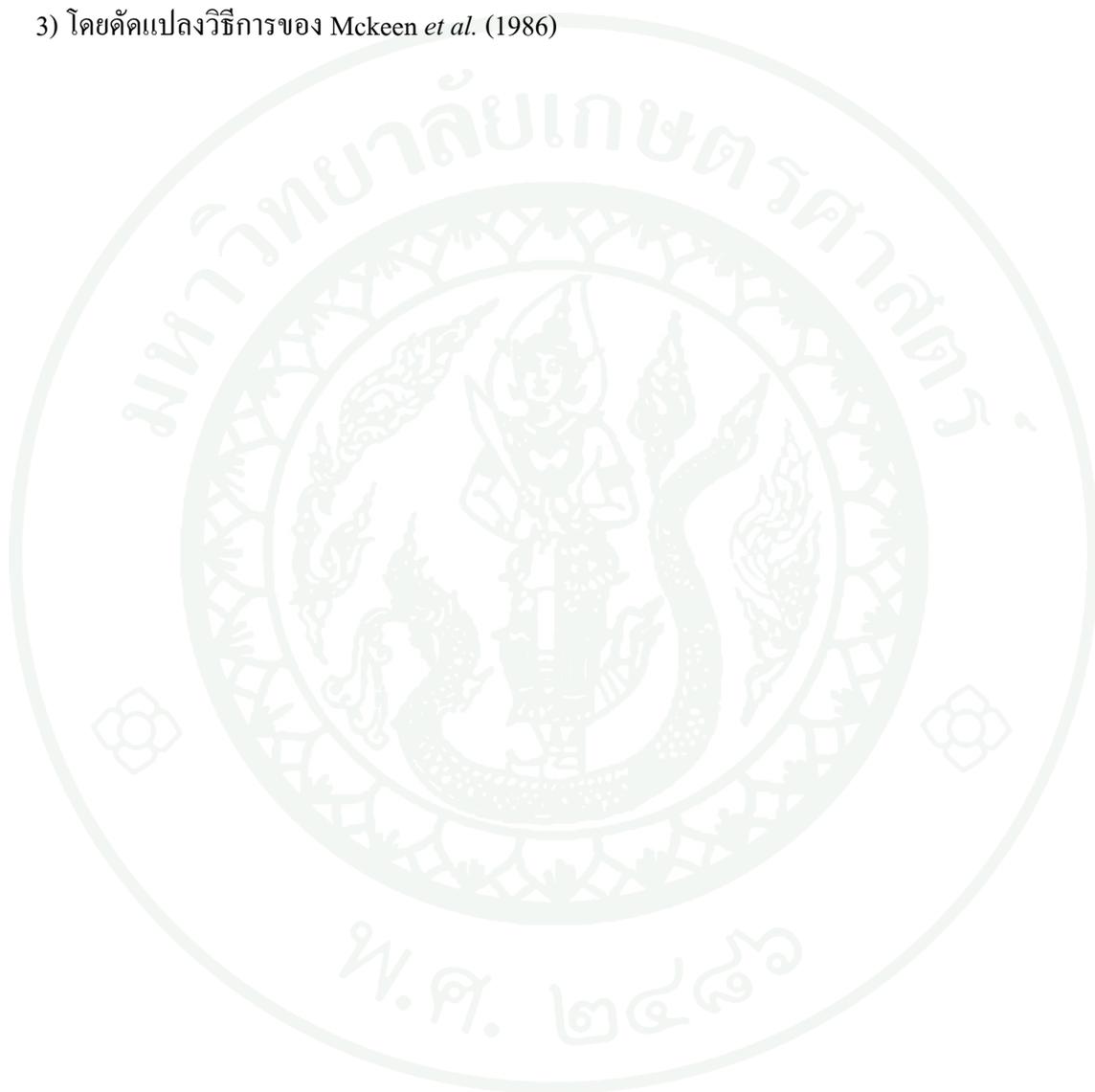
มิลลิลิตรเติมลงในอาหารเหลวแต่ละชนิดปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่อง refrigerator centrifuge ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้มากรองเซลล์แบคทีเรียที่เหลือนำด้วย sterilized syringe filter (0.45 ไมโคร; satorius stedim biotech) 1 ครั้ง นำสารกรองที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อโรคใบจุดบนด้วยวิธี agar diffusion โดยนำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดบนที่เตรียมไว้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในอาหาร NA ที่หลอมอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมลงไปให้เข้ากันและเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ ปล่อยให้แห้งให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นเจาะหลุมโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้วบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA ผสมเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนที่เตรียมไว้ หยดสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงในอาหารต่างชนิดที่ได้ จากการเตรียมข้างต้นปริมาณ 30 ไมโครลิตร ลงในหลุมแต่ละหลุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง หลังปลูกเชื้อไปแล้ว 48 ชั่วโมง ตรวจสอบบริเวณยับยั้งบนผิวหน้าอาหารทดสอบโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณส่วนใส ส่วนกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อหยดแทนสารกรองคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่กระตุ้นการเจริญ และการสร้าง secondary metabolite ที่แสดงผลบริเวณยับยั้งดีและ/หรือกว้างที่สุดเพื่อศึกษาทดลองในข้อ 5.2 ต่อไป (รัชฎาวรรณ และสุฤดี, 2548)

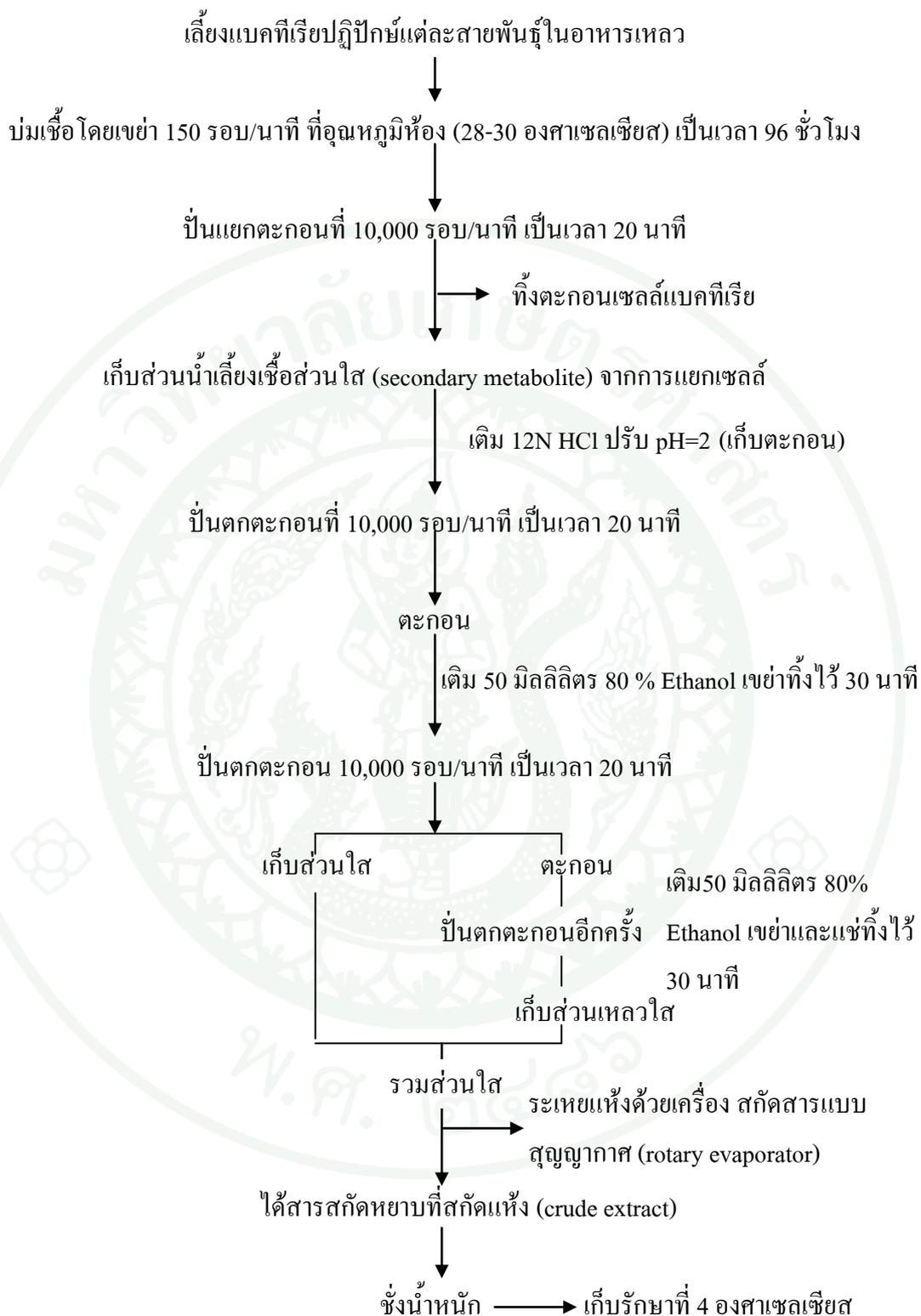
5.2 การสกัดสาร secondary metabolites อย่างหยาบ และการทดสอบประสิทธิภาพของสาร secondary metabolites ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบน

5.2.1 การสกัดสาร secondary metabolites อย่างหยาบจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมข้างต้นตามข้อ 5.1 เลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้าย cell-suspension เชื้อปฏิปักษ์แบบเดี่ยวและเชื้อผสมปริมาณ 2 มิลลิลิตร เติมน้ำลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมที่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน flask ปลอดเชื้อขนาด 500 มิลลิลิตร (โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละคู่ผสมปริมาตรรวม 1 ลิตร) นำสารละลายเชื้อย้ายลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ flask ใหม่ที่บรรจุอาหาร แต่ละ flask ทำการเลี้ยงเชื้อต่อบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 150 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเก็บส่วนใสที่ได้มาปรับ pH เท่ากับ 2 ด้วย

12 N HCl จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นแยกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที สกัดสารจากตะกอนที่ได้ด้วย 80% Ethanol นำไปปั่นแยกตะกอน และเก็บส่วนใสที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งรวมกัน นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator หาน้ำหนักแห้งของสาร secondary metabolites ที่ได้จากนั้นละลายสารด้วย 80 % Ethanol เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3) โดยดัดแปลงวิธีการของ Mckeen *et al.* (1986)





ภาพที่ 1 ภาพวิธีการสกัดสาร secondary metabolites จากเบคทีเรียปฏิชีวนะด้วยวิธีการดัดแปลงของ Mckeen *et al.* (1986)

5.3 การแยกสารสกัดหยาบ โดยวิธี Thin-layer chromatography (TLC)

5.3.1 การเตรียมแผ่น TLC แทงค์ TLC และระบบตัวทำละลาย

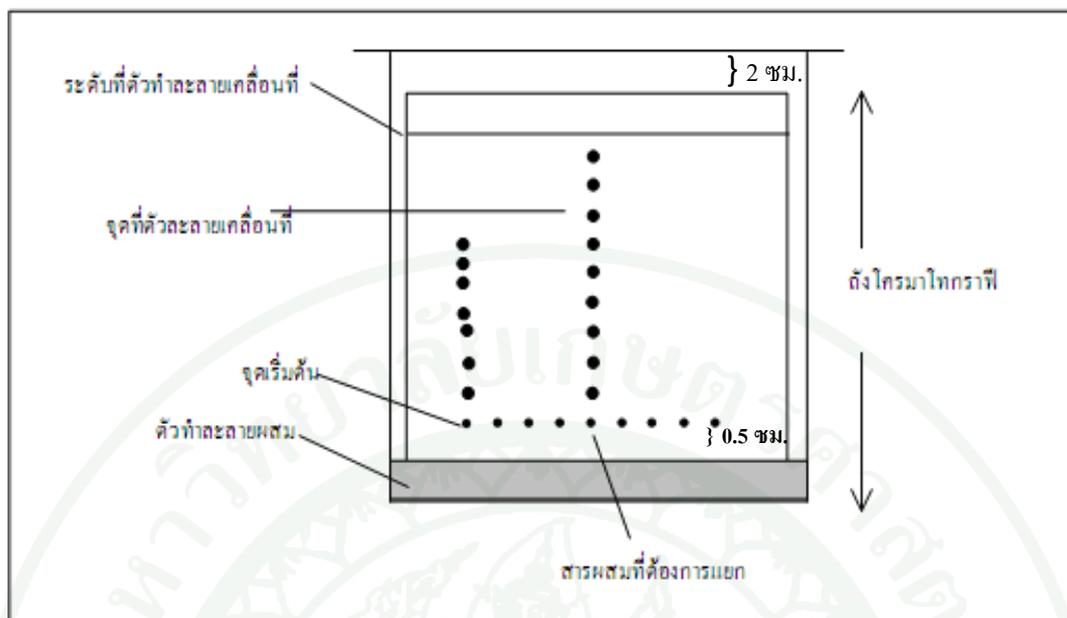
นำแผ่น TLC ชนิด plates sheet silica gel ยี่ห้อ (60 F 254 (Merck)) ขนาด 20X20 เซนติเมตร มาทำกรอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดน้ำออกจากเม็ดซิลิกา ในการเตรียมแทงค์ TLC โดยตัดกระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาดพับครึ่ง นำไปใส่ในแทงค์ TLC ซึ่งมีสารละลายทำการเขย่าเล็กน้อยทิ้งไว้ 30 นาที สำหรับตัวทำละลายเตรียมโดยใช้สาร $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (65 : 25 : 4) ในการแยกสารประกอบจากสาร secondary metabolites ในอัตราส่วนของสารที่ต้องการแยก ส่วนประกอบของสาร secondary metabolites ตามวิธีการรายงาน (Stahl, 1969)

5.3.2 วิธีการแยกสาร secondary metabolites

นำแผ่น TLC plate sheet silica gel ที่เตรียมได้จากข้อ 5.3.1 มาทำการหยดสาร secondary metabolites ในส่วนของ crude extract ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สกัดได้เป็นจุด (spot) โดยให้มีขนาดเล็กที่สุด โดยใช้ปิเปตรูเล็ก (micro haematocrit tubes) แล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำแผ่น TLC plates silica gel แต่ละแผ่น ไปอบในภาชนะที่อิมมัวด้วยสารละลายผสมในอัตราส่วน $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (65 : 25 : 4) โดยให้ส่วนปลายฐานของแผ่นที่แช่อยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร เมื่อสารละลายเคลื่อนที่มาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบน TLC plates silica gel ประมาณ 2 เซนติเมตร (ภาพที่ 4) นำมาทำให้แห้ง แล้วนำมาตรวจสอบแถบของสารที่เคลื่อนที่ผ่านตัวกลาง silica gel โดยส่องดูภายใต้เครื่อง short-wave UV light ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ต่อจากนั้นทำการวัดระยะที่สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ได้บนแผ่น TLC คำนวณหาค่า R_f ของสาร secondary metabolites ที่แยกแต่ละชนิด ตามสมการดังนี้ (Stahl, 1969)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}$$

เปรียบเทียบตำแหน่ง และจำนวนแถบของสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC ที่มาจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบเชื้อเดี่ยว และแบบเชื้อผสมหลายสายพันธุ์



ภาพที่ 2 แสดงตำแหน่งการวางและขั้นตอนการแยกสาร secondary metabolites โดยวิธี Thin-layer chromatography

5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารที่แยกสกัดได้จากแถบ TLC ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน

ทำการชุดซิติกาเจลบริเวณที่เป็นแถบซึ่งเห็นจากภายใต้เครื่อง short-wave UV light ที่ 254 นาโนเมตร ทำการชั่งซิติกาเจล 0.01 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอด microtube จากนั้นเติม 80% ethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อเป็นการชะล้างสารสกัดออกจากซิติกาเจลละลายให้สารอิมิตัว และนำไปทำการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนซิติกาเจลด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกสาร secondary metabolites ด้านบน

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้ จากแถบที่แยกจากแผ่น TLC ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนด้วยวิธี agar diffusion โดยตรวจสอบการเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน โดยการนำเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* อายุ 24 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA เตรียม cell- suspension ให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.2 (10^8 cfu/ml) ผสมในขวดบรรจุอาหาร NA ที่หลอมด้วยอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 มิลลิตร ผสมลงให้เข้ากันและเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ ปล่อยให้แห้ง ให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นเจาะ

หลุมโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ทนไฟมาเชื่อมบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ผสมเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนที่เตรียมไว้ จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้จากแต่ละแถบที่แยกได้จากแผ่น TLC ที่เตรียมข้างต้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละหลุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบบริเวณยับยั้งบนผิวหน้าอาหารทดสอบโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง ประเมินแถบสารที่แยกได้จากแต่ละตัวอย่างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเป้าหมาย

6. การพัฒนาสูตรสำเร็จเชื้อปฏิปักษ์แบบผสมหลายสายพันธุ์ และการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบจุดนูนถั่วเหลือง

6.1 การพัฒนาสูตรอาหารเพิ่มปริมาณเชื้อปฏิปักษ์แบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม

6.1.1 การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์แบบเดี่ยวและแบบผสมที่เจริญในอาหารเหลว NB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน flask ขนาด 100 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนที่ต่างกันในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมที่คัดเลือกจากวิธีการข้อ 3.5 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 0.2 O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง specphotometer ใช้ micropipette ดูดตัวอย่าง cell-suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารดัดแปลงที่พัฒนาต่อไป

6.1.2 การศึกษาส่วนผสมและอัตราส่วนที่เหมาะสมของอาหารเพิ่มปริมาณ

คัดเลือกส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ใช้ทดแทนสารเคมีในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ กากน้ำตาลวินัส (vinasses) ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และกากถั่วเหลืองที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนที่เหมาะสมของส่วนผสมดังกล่าวที่มีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ได้แก่ การใช้อัตราส่วนกากน้ำตาลวินัส : กากถั่วเหลืองเท่ากับ 0:10, 1.25:10, 2.5:10, 5:10, 10:10, 10:1.25, 10:2.5, 10:5 และ 10:0 (กรัม : กรัม) ในปริมาตรน้ำ 1 ลิตร เปรียบเทียบกับสูตรอาหารอาหารดัดแปลง MS medium (ซัยลิวซ์ และสุคฤดี, 2548) และอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไปคือ NB โดยอาหารแต่ละชนิดที่เตรียมต้องผ่านการฆ่าเชื้อ

ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำ cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม (จากวิธีการข้อ 3.5) ผสมและเลี้ยงในอาหารเหลว NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นที่ 0.2 O.D. ใช้เป็นเชื้อตั้งต้น ใช้ micropipette คูด cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมในอาหารเลี้ยงตัดแปลงปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมอัตราส่วนต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ NB และ MS medium (ซัลลิทรี และสตูดี้, 2548) ที่บรรจุใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ตรวจสอบจำนวนประชากรเชื้อที่ 6, 12, 18, 24, และ 30 ชั่วโมง ด้วยวิธี plate count technique บนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ที่แบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ต้านทานได้

6.1.3 ศึกษาสภาพการเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตัดแปลง VS medium ที่มีส่วนผสมที่ประกอบด้วย กากน้ำตาลวินเนส : กากถั่วเหลือง อัตราส่วนที่ดีที่สุดจากข้อ 6.1.2 และมีการปรับค่ากรด-ด่าง เริ่มต้น โดยการใช้ 1 N HCL และ 1 N NaOH ปรับ ที่ระดับ 5, 6, 7, และ 8 ในอาหาร VS medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ปรับปริมาณธาตุคาร์บอนและไนโตรเจนเหมาะสม เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ในสภาพอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม เริ่มต้นที่เลี้ยงในอาหาร NB ปรับค่าความขุ่นของเชื้อที่ 0.2 O.D. ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (10^8 cfu/ มิลลิลิตร) ตรวจสอบปริมาณเซลล์ด้วยวิธี plate count technique บนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ที่แบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ต้านทานได้

6.1.4 การศึกษาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเซลล์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ตามวิธีการข้อ 6.1.1 และ 6.1.2 ในอาหาร VS medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ปรับปริมาณธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน และระดับ pH ที่เหมาะสมตามข้อมูลในข้อ 6.1.3 โดยเลี้ยงเชื้อในสภาพอุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที เก็บตัวอย่าง cell-suspension เชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเซลล์ด้วยวิธี plate count technique บนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ที่แบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ต้านทานได้

6.2 การพัฒนาสูตรสำเร็จผลิตภัณฑ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสมหลายสายพันธุ์

6.2.1 การเตรียมเชื้อ

นำ cell-suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ คือ *P. fluorescens* SP007s และ *B. amyloliquefaciens* KPS46 ที่เลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาทิจ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้ micropipette ดูด cell-suspension เชื้อแต่ละสายพันธุ์มาผสมกันในหลอดที่ปลอดเชื้อใหม่ในอัตราส่วนตามกรรมวิธีเลี้ยงเชื้อผสมข้อ 3.5 ทำการบ่มเชื้อต่อใน flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเพิ่มปริมาณ VS medium ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาทิจ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาทิจ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ และนำไปปรับความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้ได้ 0.9 O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (ซึ่งจะมีปริมาณของเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 10^{13} cfu/ มิลลิลิตร) นำ cell-suspension ที่เตรียมไว้ไปผสมกับสารพาในกระบวนการผลิตสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมชนิดผงตามวิธีการข้อ 6.2.2

6.2.2 การเตรียมส่วนผสมสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดผง

สารอาหารและสารพาสำหรับการเตรียมผลิตภัณฑ์สูตรสำเร็จประกอบด้วยผงคาโอลิน (kaolin) และผงทัลคัม (talcum) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และน้ำตาลทราย (ปั่นละเอียดเป็นผงแป้ง), ซิลิกาไดออกไซด์ (SiO_2), คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส (CMC), แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3), สารละลายธาตุเหล็ก ($\text{Fe}_3\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และสารเพิ่มประสิทธิภาพการแพร่กระจายในระหว่างที่ละลายในน้ำ (deshecofix) ในอัตราส่วนต่าง ๆ ตามรายละเอียดตารางที่ 2 เพื่อใช้ในการผสมสูตรสำเร็จผลิตภัณฑ์ชนิดผง

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบและอัตราส่วนผสมสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดผงที่ใช้ในการศึกษา

สูตร	ส่วนประกอบ	อัตราส่วน
1.	Talcum	100
2.	Kaolin	100
3.	CaCO ₃	100
4.	Silicon	100
5.	Talcum + น้ำตาลทราย	80:20
6.	Kaolin + น้ำตาลทราย	80:20
7.	Talcum + น้ำตาลทราย + CMC	70:15:15
8.	Kaolin + น้ำตาลทราย + CMC	70:15:15
9.	Talcum + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃	70:10:7.5:7.5
10.	Kaolin + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃	70:10:7.5:7.5
11.	Talcum + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄	70:10:5 :5:5
12.	Kaolin + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄	70:10:5:5:5
13.	Talcum + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄ + deshecofix	70:15:5:4:3:3
14.	Kaolin + น้ำตาลทราย +CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄ + deshecofix	70:15:5:4:3:3
15.	Talcum + น้ำตาลทราย + silicon +CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄ + deshecofix	70:15:5:5:1:2:2
16.	Kaolin + น้ำตาลทราย + silicon +CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄ + deshecofix	70:15:5:5:1:2:2

6.2.3 การผสมสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดผง

เตรียมสารอาหารเลี้ยงเชื้อ สารพา และสารเพิ่มประสิทธิภาพจากวิธีการข้อ 6.2.2 ผสมกับเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมตามอัตราส่วนที่ศึกษาในวิธีการข้อ 3.5 ในส่วนของอัตราน้ำน้ำหนักส่วนประกอบข้างต้นดังกล่าวรวม 1,000 กรัม และผสม cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่เตรียมจากวิธีการข้อ 6.2.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน และกระจายตัวในสารพา (ภายในสภาพห้องที่ปลอดเชื้อ) จากนั้นนำไปอบลดความชื้นด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เหลือ

ความชื้นประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ นำผงสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบ่งใส่ถุงพลาสติกปริมาณ
ถุงละ 1 กรัม ปิดผนึกถุงให้แน่นเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส)

6.2.4 การประเมินผล

ประเมินผลโดยการตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเชื้อของแบคทีเรียปฏิชีวนะ
หลังผสมสารพา และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยวิธี plate count technique ติดต่อกันทุกเดือน
12 เดือน โดยนำสูตรสำเร็จ 1 กรัม ผสมลงในน้ำ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทำการเจือจางที่ระดับ
 10^{-6} 10^{-7} และ 10^{-8} นำสารแขวนลอยที่ได้ไป spread บนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะที่เชื้อแต่ละ
ชนิดด้านทานได้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร และ
แปลงค่าเป็นหน่วย cfu/มิลลิลิตร

การทดสอบคุณสมบัติของสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม
ทางด้านการกระจายตัวในน้ำ โดยการนำสูตรสำเร็จแต่ละสูตรมาจับเวลา ตรวจสอบความสามารถ
ในการละลายและกระจายตัวแขวนลอยในน้ำหลังผสมในน้ำทันที โดยแบ่งการประเมินออกเป็น 4
ระดับ

ระดับที่ 1 สารพากระจายตัวในน้ำสม่ำเสมอ และไม่ตกตะกอนทันทีได้ภายใน
1-5 นาที (ประสิทธิภาพดีที่สุด)

ระดับที่ 2 สารพากระจายตัวและแขวนลอยในน้ำสม่ำเสมอภายใน 5 -10 นาที
ไม่ตกตะกอน (ประสิทธิภาพดี)

ระดับที่ 3 สารพากระจายตัวและแขวนลอยในน้ำได้สม่ำเสมอภายใน 11-30
นาที และไม่ตกตะกอน (ประสิทธิภาพปานกลาง)

ระดับที่ 4 สารพากระจายตัวและแขวนลอยในน้ำได้สม่ำเสมอภายใน 31-60
นาที ไม่ตกตะกอน (ประสิทธิภาพพอใช้)

6.3 การทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสมหลายสาย
พันธุ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุและควบคุมโรคใบจุดบนกล้วย

6.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในระดับห้องปฏิบัติการ

6.3.1.1 การทดสอบด้วยวิธี agar diffusion

ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสมหลายสายพันธุ์ในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดบน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ 150 รอบ/นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของ cell-suspension ของเชื้อสาเหตุด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.2 O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตร) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ใช้ micropipette คูด cell-suspension เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดบนที่เตรียมไว้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทลงในขวดบรรจุอาหาร NA ที่หลอมด้วยอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมลงให้เข้ากันและเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ ปล่อยให้แห้งทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นเจาะหลุมโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร NA ผสมเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนที่เตรียมไว้ นำสูตรสำเร็จแต่ละสูตรมาละลายน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อจำนวน 1 กรัม:น้ำ 99 มิลลิลิตร (มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีจำนวนประชากรของเชื้อด้วยวิธี dilution plate count ที่ 4.5×10^{13} cfu/มิลลิลิตร) โดยใช้ micropipette คูดในปริมาณ 30 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละหลุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง หลังปลูกเชื้อไปแล้ว 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดบริเวณยับยั้งบนผิวหน้าอาหารทดสอบ เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้ง

6.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในสภาพเรือนทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ completely random design (CRD) โดยปลูกถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ No.75 ในกระถางผสมดินสำเร็จขนาด 8 นิ้ว ดูแลจนอายุพืชทดสอบ 14 วัน นำมาทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคพืชภายใต้สภาพเรือนทดลองภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยนำสูตรสำเร็จที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* เปรียบเทียบกับสูตรสำเร็จแบคทีเรีย ISR-P (SP007s) และ ISR-B (KPS46) ซึ่งเป็นสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะของภาควิชาโรคพืช

คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยนำสูตรสำเร็จสูตรใหม่มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดนูน ในสภาพเรือนทดลอง ตามกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่น 3 ครั้งที่อายุถั่วเหลือง 14 21 และ 28 วัน ด้วยสูตรสำเร็จ ISR-P (SP007s)

กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่น 3 ครั้งที่อายุถั่วเหลือง 14 21 และ 28 วัน ด้วยสูตรสำเร็จ ISR-B (KPS46)

กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่น 3 ครั้งที่อายุถั่วเหลือง 14 21 และ 28 วัน ด้วยสูตรสำเร็จที่ได้จากการพัฒนาสูตรสำเร็จในข้อ 6.2

กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่น 3 ครั้งที่อายุถั่วเหลือง 14 21 และ 28 วัน ด้วย cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ SP007s

กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่น 3 ครั้งที่อายุถั่วเหลือง 14 21 และ 28 วัน ด้วย cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ KPS46

กรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่น 3 ครั้งที่อายุถั่วเหลือง 14 21 และ 28 วัน ด้วย cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม KPS46+ SP007s

กรรมวิธีที่ 7 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่นสารเคมีด้วยสารเคมีที่มีส่วนผสม copper hydroxide 3 ครั้งที่อายุถั่วเหลือง 14 21 และ 28 วัน

กรรมวิธีที่ 8 กรรมวิธีควบคุมด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ

วิธีการปฏิบัติโดยเตรียมสูตรสำเร็จชนิดผงแต่ละสูตรละลายน้ำตามอัตราส่วนสูตรสำเร็จ 20 กรัม ต่อน้ำ 80 ลิตร ผสมให้ละลายกับน้ำเป็นเนื้อเดียวกัน พ่นสูตรสำเร็จเมื่อต้นถั่วเหลืองฝักสดอายุที่ 14, 21 และ 28 วัน ด้วยเครื่องพ่นมือประมาณ 20 มิลลิลิตรต่อต้น หลังจากนั้นปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนลงบนต้นถั่วเหลืองโดยพ่น cell-suspension เชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน (ความเข้มข้น 10^8 cfu/มิลลิลิตร) ลงบนต้นถั่วเหลืองที่อายุ 35 วัน เปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมโรคกับกรรมวิธีการคลุกเมล็ดและการพ่นด้วย cell-suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพียงอย่างเดียว กรรมวิธีควบคุมด้วยสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (copper hydroxide) และกรรมวิธีควบคุมที่ใช้ น้ำกลั่นแทนสูตรสำเร็จ ประเมินการเกิดและความรุนแรงของโรคใบจุดนูนที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อ และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด (ความสูงต้น ความยาวราก และจำนวนรากแขนง) ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน และวิเคราะห์ข้อมูลและค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 15

6.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในสภาพไร่

วางแผนการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) บนพื้นที่แปลงปลูกขนาด 1 ไร่ ที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา พื้นที่ 3.5 X10 ตารางเมตร ให้น้ำแบบพ่นฝอยทุก 1 สัปดาห์ กำจัดวัชพืชโดยการพ่นสารเคมีก่อนงอก 1 ครั้ง (10 ซีซี: น้ำ 1 ลิตร) และใช้แรงงานถนอมมือ กรรมวิธีในการทดลองประกอบด้วย กรรมวิธี ๑ ละ 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้พื้นที่ ขนาด 3.5X10 ตารางเมตร โดยคลุกเมล็ดถั่วเหลืองฝักสด ร่วมกับพ่น 3 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่น 3 ครั้งที่อายุ 15, 22 และ 29 วัน ด้วยสูตรสำเร็จ ISR-B (KPS46)

กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่น 3 ครั้งที่อายุ 15, 22 และ 29 วัน ด้วยสูตรสำเร็จ ISR-P (SP007s)

กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดร่วมกับพ่น 3 ครั้งที่อายุ 15, 22 และ 29 วัน ด้วยสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม KPS46 + SPO07s

กรรมวิธีที่ 4 กรรมวิธีควบคุม (คลุกเมล็ดและพ่นด้วยน้ำเปล่า)

กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและพ่นด้วย copper hydroxide

วิธีการปฏิบัติโดยเตรียมสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะชนิดผงละลายน้ำ ตามอัตราส่วนการใช้คลุกเมล็ดก่อนปลูกอัตรา 5 กรัมต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม และพ่นสูตรสำเร็จ อัตราส่วน 20 กรัม:น้ำ 80 ลิตร ต่อพื้นที่ 1 ไร่ จำนวน 3 ครั้ง เมื่อต้นถั่วเหลืองฝักสดอายุ 15, 22 และ 29 วัน ประเมินการเกิดและความรุนแรงของโรคที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อ การส่งเสริมการเจริญเติบโต (ความสูงต้น จำนวนข้อ จำนวนกิ่ง ความกว้างฝัก ความยาวฝัก และความหนาฝัก) และผลผลิต (น้ำหนักรวม น้ำหนักฝักดี และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักฝักดี) ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน และวิเคราะห์ข้อมูลและค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 15

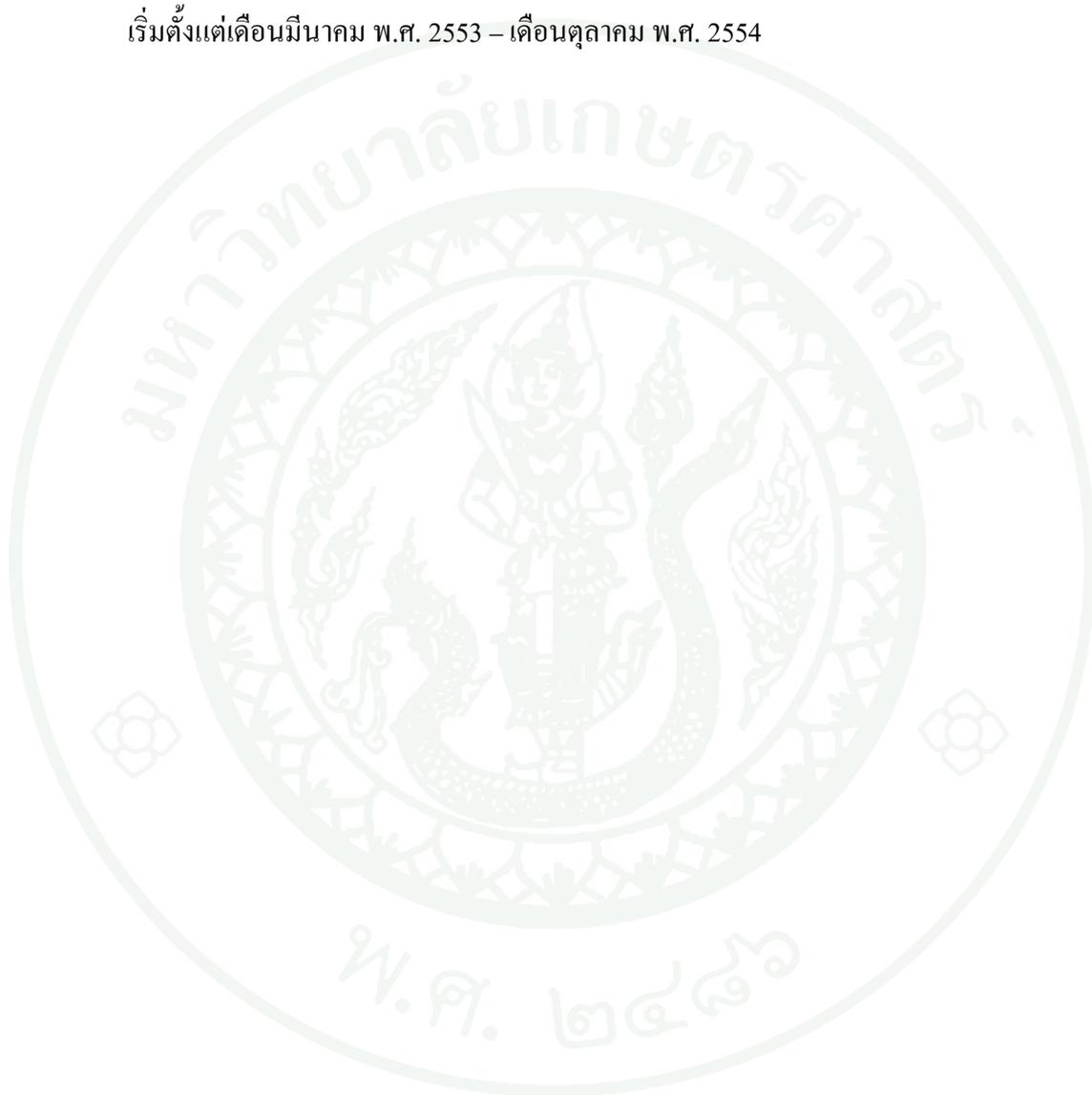
7. สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการและเรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

2. ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อําเภopakช่อง จังหวัดนครราชสีมา

8. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2553 – เดือนตุลาคม พ.ศ. 2554



ผลและวิจารณ์

ผล

1. สายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน และแบคทีเรียปฏิปักษ์

1.1 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดนูนถั่วเหลือง

จากการนำเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สายพันธุ์ No.12-2 จากแหล่งเก็บเชื้อ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาทำการ cross streak บนอาหาร NA พบว่าเชื้อมีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ขอบกลมเรียบ ผิวนูนยกตัวจากผิวหน้าอาหาร และเมื่อเลี้ยงบนอาหาร YDCA มีโคโลนีลักษณะกลม เข้มเป็นมัน สีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 3) ตรงตามลักษณะที่มีการรายงานมาก่อน (Thowthampitak *et al.*, 2008)

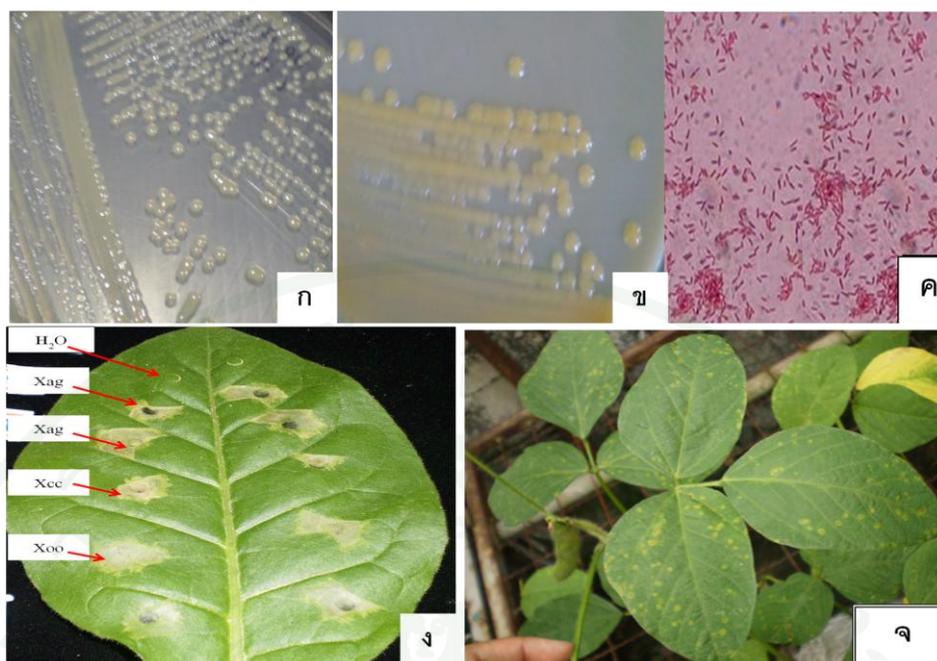
การศึกษาคูสมบัติทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน พบว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สายพันธุ์ No.12-2 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จากการทดสอบ Gram's reaction ลักษณะเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะเป็นท่อนตรง เรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-33 องศาเซลเซียส ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ย่อยสลายแป้งได้จากการทดสอบปฏิกิริยา starch hydrolysis สร้าง enzyme catalase ไม่สร้าง urease ไม่รีดิวซ์ nitrate สามารถย่อย gelatin ได้ ให้ผลในการทดสอบปฏิกิริยา levan formation มีลักษณะโคโลนีนูนเข้มมากกว่าปกติ การทดสอบ lipolytic activity บนอาหาร Tween 80 และ citrate ให้ผลเป็นบวก และให้ผลการทดสอบ indole production, sorbitol, manitol และ maltose เป็นลบ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถใช้ น้ำตาล glucose, sucrose, dextrose, cellobiose และ fructose ได้ (ตารางที่ 3)

1.1.1 คุณสมบัติการเป็นเชื้อสาเหตุโรคและทดสอบความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* No.12-2

ผลการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลันของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* No.12-2 บนต้นยาสูบพบว่า เชื้อดังกล่าวชักนำให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลันบนใบยาสูบ โดยเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง หลังฉีด cell-suspension โดยอาการเริ่มแรกพบว่าใบยาสูบมีลักษณะฉ่ำน้ำ และหายไปภายในครึ่งชั่วโมง ต่อมาเกิดอาการเซลล์ตายเป็นแผลสีน้ำตาลชัดเจนภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับการใช้ cell-suspension ของ *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) และ *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) (ภาพที่ 3)

1.1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนถั่วเหลือง

จากการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับถั่วเหลืองฝักสดโดยการปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* No.12-2 ลงบนต้นถั่วเหลืองพันธุ์ No.75 อายุ 14 วัน และประเมินผลการเกิดโรคที่ 4 และ 7 วัน หลังปลูกเชื้อ พบว่า เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว สามารถชักนำให้ต้นถั่วเหลือง เริ่มเกิดโรคในวันที่ 4 และพัฒนาการเกิดโรควันที่ 7 ลักษณะแผลมีลักษณะนูน แผลจุดมีสีน้ำตาลกลางแผล รอบแผลมี halo เป็นวงเหลือง ล้อมรอบ และหลังจากนำมาแยกเชื้อใหม่ (reisolation) ได้เชื้อชนิดเดิมและเมื่อปลูกเชื้อลงบนพืชอีกครั้ง (reinoculate) พบว่าต้นพืชทดสอบเกิดอาการโรคใบจุดนูนเช่นเดิม จึงยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* No.12-2 สาเหตุโรคใบจุดนูน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 โคโลนีของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* No.12-2 (Xag) บนอาหาร NA มีสีเหลือง ผิวขอบเรียบยกตัวนูนจากผิวหน้าอาหาร (ก) และการเจริญบนอาหาร YDCA พบว่ามีโคโลนีลักษณะกลม เข้มเป็นมัน สีเหลืองอ่อน (ข) เซลล์แบคทีเรียติดสีแดงของ Safanin-o เมื่อทดสอบด้วยวิธี Gram's stain (ค) เชื้อสามารถชักนำให้เกิดปฏิกิริยา HR บนใบยาสูบภายในเวลา 24 ชั่วโมง (ง) และก่อให้เกิดอาการโรคใบจุดนูนบนใบถั่วเหลืองทดสอบหลังปลูกเชื้อ 7 วัน (จ)

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดนูนถั่วเหลือง

ลักษณะทดสอบ	ปฏิกิริยาของเชื้อ <i>X.axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> No.12-2 ^{1/}
Gram's stain	G-
Oxygen relationship	+
Catalase production	+
Starch hydrolysis	+
Urea hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	+
Levan forming	+
Lipolytic activity (Tween 80)	+
Citrate utilization	+
Indole production	-
Nitrate reduction	-
Carbon utilization:	
Glucose	+
Sucrose	+
Dextrose	+
Cellobiose	+
Dulcitol	-
Sorbitol	-
Manitol	-
Maltose	-
Fructose	+

^{1/} + = positive reaction คือ เกิดปฏิกิริยา , - = negative reaction คือ ไม่เกิดปฏิกิริยา

G- = Gram negative

1.2. คุณสมบัติของแบคทีเรียปฏิปักษ์และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดนูน

1.2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B.amyloliquefaciens* KPS46, *P. papuli* SW01/4, *S. marcescens* SPt360 และ *P. fluorescens* SP007s มา cross streak บนอาหาร NA และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว cross streak บนอาหาร NA ซ้ำ 2-3 ครั้ง ได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน โดย *B.amyloliquefaciens* KPS46 มีลักษณะโคโลนี สีขาว ผิวด้าน รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก *P. papuli* SW01/4 มีลักษณะโคโลนีสีขาวคล้ายนมข้น ผิวมัน นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ *S. marcescens* SPt360 มีลักษณะโคโลนีสีแดง กลม นูน มันวาว ขอบเรียบ และ *P. fluorescens* SP007s มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองน้ำตาล รูปร่างไม่แน่นอน ผิวขรุขระเล็กน้อย ขอบหยัก (ตารางที่ 4 และภาพที่ 4) (สุพจน์, 2545 ; สมใจ, 2547; วิลาวรรณ, 2551)

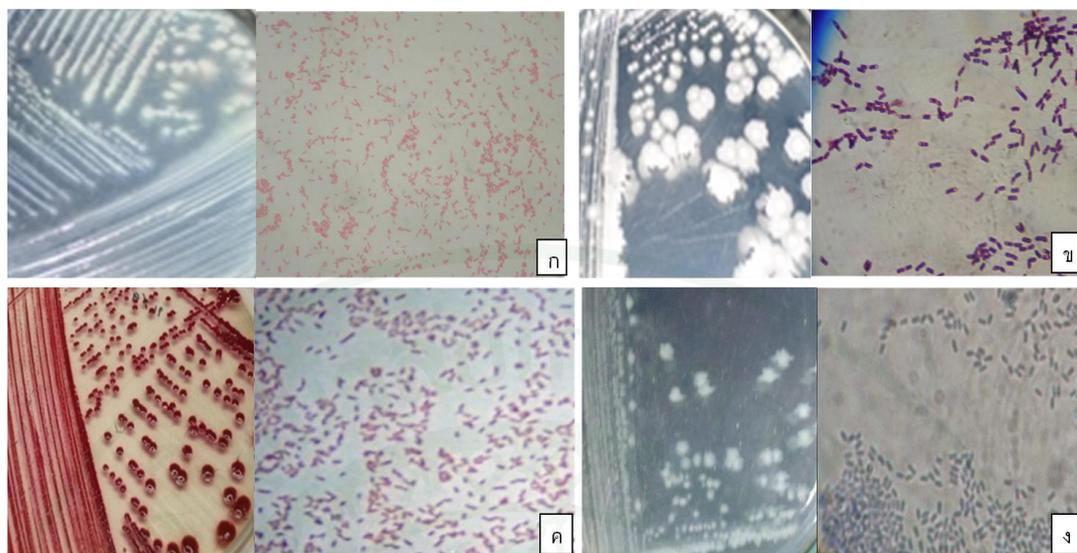
เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติในการติดสีแกรม พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s และ *S.marcescens* SPt360 ติดสีแดงของ Safanin-O แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B.amyloliquefaciens* KPS46 และ *P.pabuli* SW01/4 ติดสีม่วงของ Crystal violet แสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (ภาพที่ 4)

การตรวจสอบรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 มีเซลล์แบบท่อน รูปร่างมีขนาดเล็กบริเวณกลางเซลล์ และ *P. pabuli* SW01/4 มีเซลล์แบบท่อนยาวเรียงกันเป็นสาย *P. fluorescens* SP007s มีรูปร่างเป็นท่อนตรงหรือเป็น curved rods และ *S.marcescens* SPt360 มีรูปร่างเป็นท่อนตรง มีขนาดเล็ก ส่วนการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียพวกใช้ออกซิเจน (aerobe) ยกเว้น *S. marcescens* SPt360 เป็น facultative anaerobe และทุกสายพันธุ์ ไม่สร้าง endospore ยกเว้น *B.amyloliquefaciens* KPS46 ที่สร้าง endospore ทุกสายพันธุ์เคลื่อนที่ได้ในอาหารทดสอบและสามารถผลิต catalase และ gelatin (ยกเว้น *P. pabuli* SW01/4) สามารถย่อยแป้ง ทนเกลือได้ 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเกิดปฏิกิริยา lipolytic activity ได้ นอกจากนี้พบว่า *P. pabuli* SW01/4 และ *P. fluorescens* SP007s

ให้ผลทดสอบ levan formation เป็นบวก โดยโคโลนีนุ่มเข้มนกว่าปกติและเฉพาะ *P. fluorescens* SP007s เกิดปฏิกิริยา oxidase test เป็นบวก โดยทุกสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ pectinase ย่อยมันฝรั่ง (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์สายพันธุ์คุณภาพที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏ์	ลักษณะโคโลนี	อ้างอิง
<i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46	สีขาว ด้าน รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก	สุพจน์, 2545
<i>P. pabuli</i> SW01/4	สีขาวคล้ายนมข้น ลักษณะโคโลนีรี ผิวมัน ยกตัวจากผิวอาหารเล็กน้อย ขอบเรียบ	สุพจน์, 2545
<i>S. marcescens</i> SPt360	สีแดง กลม นูน มันวาว ขอบเรียบ	สมใจ, 2547
<i>P. fluorescens</i> SP007s	สีเหลืองน้ำตาล รูปร่างไม่แน่นอนผิว ขรุขระเล็กน้อย ขอบหยัก	วิลารรรณ์, 2551



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีและรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียปฏิชีวนะ; *Pseudomonas fluorescens* SP007s (ก), *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 (ข), *Serratia marcescens* SPt360 (ค) และ *Paenibacillus pabuli* SW01/4 (ง) บนอาหาร NA

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4 สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ลักษณะทดสอบ	แบคทีเรียปฏิปักษ์ ^{1/}			
	KPS46 ^{2/}	SW01/4 ^{2/}	SP007s ^{2/}	SPT360 ^{2/}
Gram's stain	G+	G+	G-	G-
Oxygen relationship				
Aerobe	+	+	+	+/-
Motility	+	+	+	+
Catalase production	+	+	+	+
Endospore forming	+	-	-	-
Citrate utilization	-	-	+	-
Starch hydrolysis	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	-	+	+
Salt tolerance (NaCl)				
5%	+	+	+	+
7%	+	+	+	+
Levan forming	-	+	+	-
Lipolytic activity	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	+	-
Potato soft rot	-	-	-	-

^{1/} G+ = Gram positive, G- = Gram negative, + = positive reaction, - = negative reaction และ

+/- = facultative aerobe

^{2/} KPS46= *Bacillus amyloliquefaciens*, SW01/4=*Paenibacillus papuli*, SP007s= *Pseudomonas fluorescens* และ SPT360 = *Serratia marcescens*

1.2.2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่างสายพันธุ์ในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารปฏิชีวนะเพื่อการยืนยันสายพันธุ์

การทดสอบและยืนยันสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ คือ

B. amyloliquefaciens KPS46, *P. pabuli* SW01/4, *S. marcescens* SP1360 และ *P. fluorescens* SP007s โดยการเลี้ยงบนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะต่างชนิด และต่างความเข้มข้น พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. amyloliquefaciens* KPS46 เจริญบนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ tetracycline ที่ระดับ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ streptomycin ที่ระดับ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วน *P. pabuli* SW01/4 เจริญบนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ tetracycline ที่ระดับ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ rifampicin ที่ระดับ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร *S. marcescens* SP1360 เจริญบนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin ที่ระดับ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ ampicillin ที่ระดับ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ *P. fluorescens* SP007s เจริญบนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ระดับ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ rifampicin ที่ระดับ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ผ่านการทดสอบการเจริญบนอาหารที่ผสมสารปฏิชีวนะมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ด้วยวิธี paper disc diffusion เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม (wild type) ผลปรากฏว่าประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคยังคงเดิม จึงนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้บนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ และความเข้มข้นดังกล่าวมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ในการทดลองต่อไป โดยค่าเหล่านี้หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อปฏิชีวนะนั้นได้ (minimal inhibition concentration :MIC) จึงจัดเป็น antibiotic resistance marker ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละชนิดที่ควบคุมโดยยีนที่อยู่บน plasmid ของแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสุทธดี และคณะ (2555) (ตารางที่ 6)

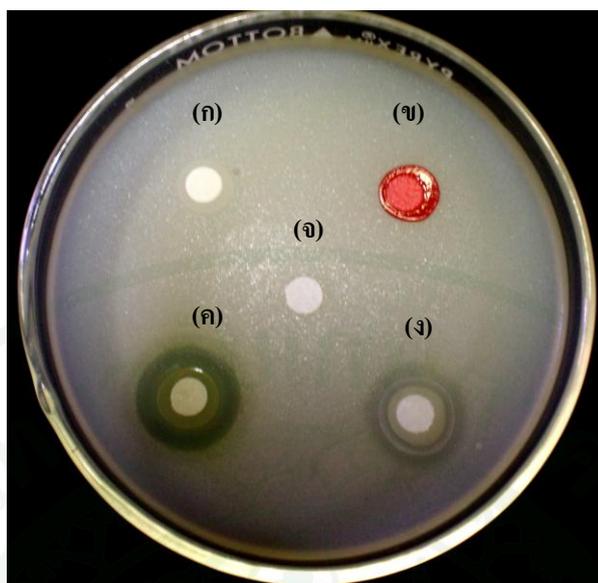
ตารางที่ 6 การต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่างสายพันธุ์

แบคทีเรียปฏิชีวนะ ^{1/}	สารปฏิชีวนะ (µg/ml)
KPS46	Tetracycline (10 µg/ml), Streptomycin(5 µg/ml)
SW01/4	Tetracycline (20 µg/ml), Rifampicin (20 µg/ml)
SP007s	Amplicilin (150 µg/ml), Rifampicin(150 µg/ml)
SPT360	Streptomycin(10µg/ml), Amplicilin (150 µg/ml)

^{1/}KPS46 = *Bacillus amyloliquefaciens*, SW01/4 = *Paenibacillus pabuli*, SP007s= *Pseudomonas fluorescens* และ SPT360 = *Serratia marcescens*

2. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46, *P. pabuli* SW01/4, *S. marcescens* SPT360 และ *P. fluorescens* SP007s มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดนูนของถั่วเหลืองด้วยวิธี paper disc พบว่าหลังจากบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง แบคทีเรียปฏิชีวนะทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อเป้าหมายได้โดยแบคทีเรีย *P. fluorescens* SP007s สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ดีที่สุด สามารถผลิตสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งและมีบริเวณการยับยั้งกว้างที่สุดเท่ากับ 1.3 เซนติเมตร รองลงมา คือแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* KPS46 *P. pabuli* SW01/4 และ *S. marcescens* SPT360 ที่มีบริเวณยับยั้งกว้างเท่ากับ 1.2 0.6 และ 0.5 เซนติเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 7 และภาพที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการหยดกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งไม่ให้ผลการยับยั้งเชื้อโรค แสดงให้เห็นว่ากลไกการผลิตสารปฏิชีวนะ และการแข่งขันโดยตรงของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เป็นกลไกหลักของเชื้อในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน



ภาพที่ 5 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *X.axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดนูนของแบคทีเรีย
 ปฏิบัติต่างสายพันธุ์จากการทดสอบด้วยวิธี paper disc ได้แก่ *P. pabuli* SW01/4 (ก),
S. marcescens SPt360 (ข), *P. fluorescens* SP007s (ค), *B. amyloliquefaciens* KPS46 (ง)
 และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (จ)

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะต่างสายพันธุ์ในการผลิตสารยับยั้งเชื้อ
X. axonopodis pv. *glycines* เมื่อทดสอบด้วยวิธี paper disc

สายพันธุ์แบคทีเรียปฏิชีวนะ	บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร) ^{1/}
<i>B. amyloliquefaciens</i> KPS46	1.2a
<i>P. papuli</i> SW01/4	0.6b
<i>S. marcescens</i> SPt360	0.5c
<i>P. fluorescens</i> SP007s	1.3a

^{1/} ตัวอักษรของข้อมูลในตารางที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับ (P=0.05) Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

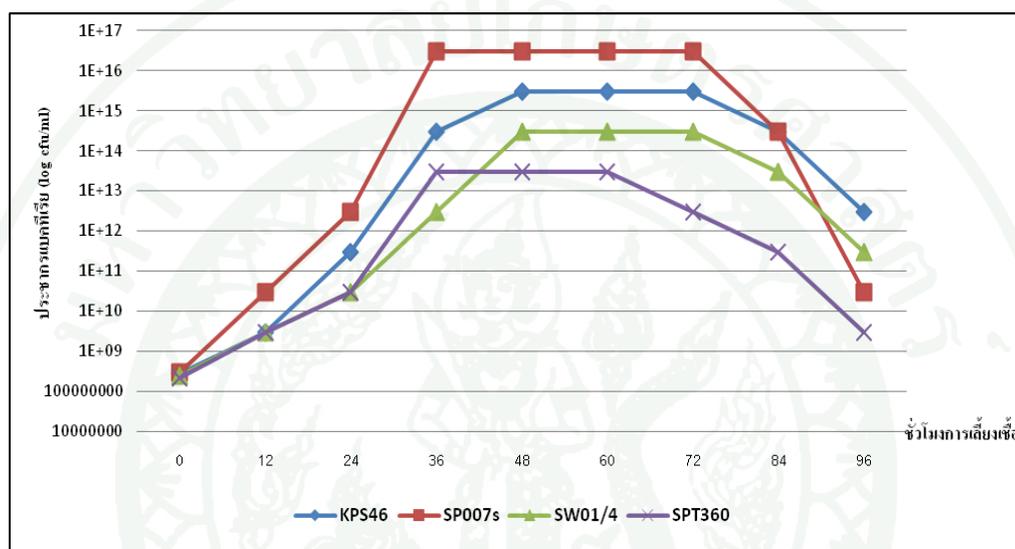
3. การเจริญร่วมกันของแบคทีเรียปฏิชีวนะต่างสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อโรคใบจุดหนูน

3.1 อัตราการเจริญของแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลว

ผลการศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ

B. amyloliquefaciens KPS46 *P. papuli* SW01/4 *S. marcescens* SPt360 และ *P. fluorescens* SP007s เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว NB และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที โดยจากการนำ cell-suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 4 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 0 6 12 24 36 48 60 72 84 และ 96 ชั่วโมง มาตรวจสอบปริมาณประชากรด้วยวิธี dilution plate count ผลปรากฏว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์มีการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ต่างกัน แบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s มีอัตราการเจริญเร็วที่สุด สามารถเจริญเข้าสู่ที่ระยะ log phase ที่อายุการบ่มเชื้อ 12-24 ชั่วโมง และระยะ stationary phase ที่ 36-72 ชั่วโมง ซึ่งมีประชากรเชื้อเฉลี่ย เท่ากับ 1×10^{16} cfu/มิลลิลิตร รองลงมาคือแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 สามารถเข้าสู่การเจริญระยะ stationary phase ที่ 48-72 ชั่วโมง ซึ่งมีประชากรเชื้อเฉลี่ย เท่ากับ 1×10^{15} cfu/มิลลิลิตร ส่วน *P. papuli* SW01/4 สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ lag phase ที่ 0-12 ชั่วโมง ระยะ log phase ถึงระยะ stationary phase ที่ 24-60 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อซึ่งประชากรเชื้อเฉลี่ย เท่ากับ 1×10^{14} cfu/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากการทดลอง

ชี้ให้เห็นว่าอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณธ์ *S. marcescens* SP1360 มีการเจริญเติบโตช้าที่สุดซึ่งมีประชากรเชื้อเฉลี่ย เท่ากับ 1×10^{13} cfu/มิลลิลิตร และพบว่าอายุการเลี้ยงมีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อทั้ง 4 ชนิด เมื่อเลี้ยงในอาหารและสภาพการเลี้ยงเดียวกัน และแบคทีเรียปฏิบัณธ์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีอัตราการเจริญลดลงจากการบ่มเชื้อที่ 84-96 ชั่วโมง (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 อัตราการเจริญของแบคทีเรียปฏิบัณธ์ *P. fluorescens* SP007s, *B. amyloliquefaciens* KPS46, *P. papuli* SW01/4 และ *S. marcescens* SP1360 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB มีอายุการเลี้ยง 96 ชั่วโมง

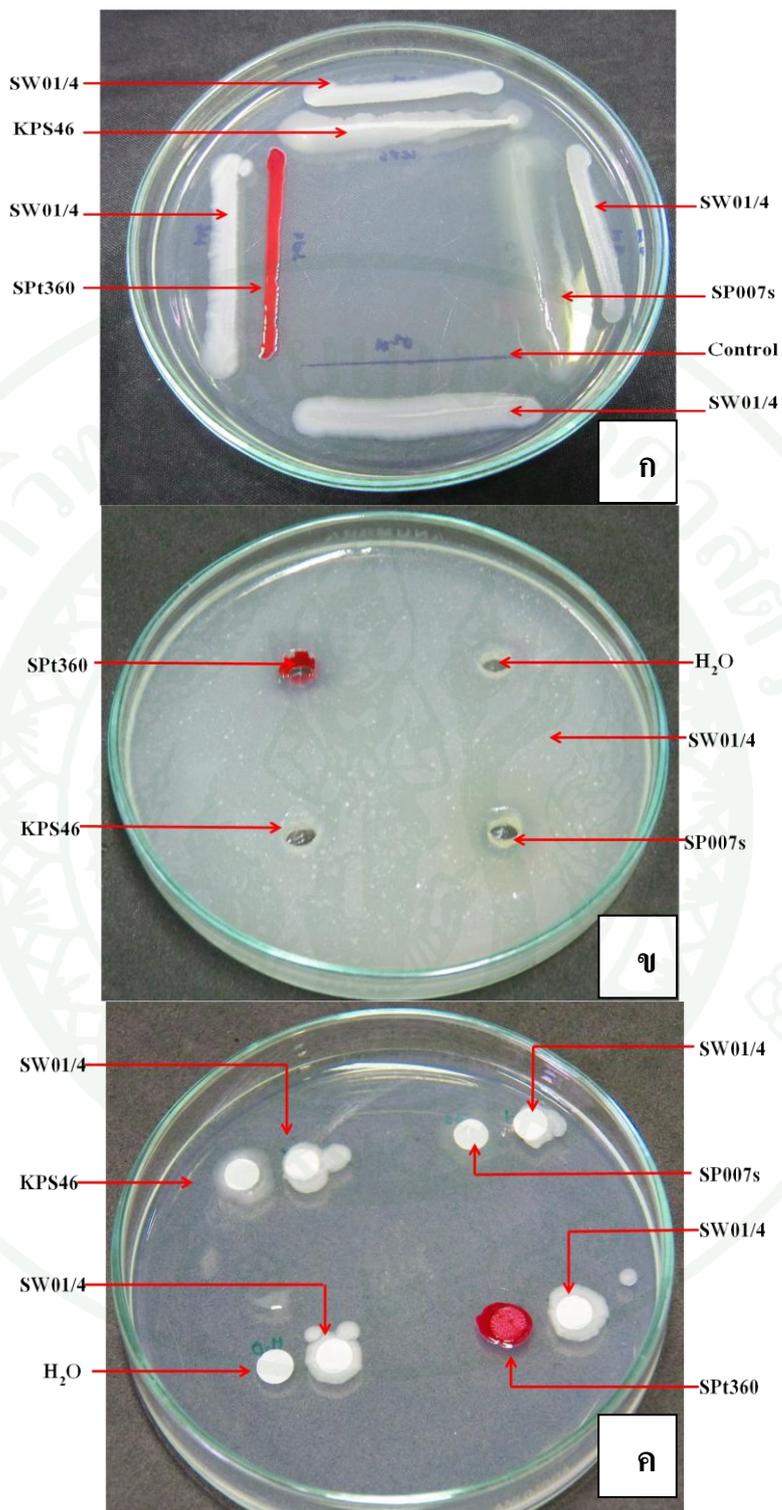
3.2 การเจริญร่วมกันของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์บนอาหารทดสอบ

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ คือ *B.amyloliquefaciens* KPS46 *P. papuli* SW01/4 *S. marcescens* SPt360 และ *P. fluorescens* SP007s มาทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันบนอาหาร NA ด้วยวิธี dual culture, agar diffusion และ paper disc diffusion พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์มีความสามารถเจริญร่วมกันได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนคู่ผสม โดย *B.amyloliquefaciens* KPS46 สามารถเจริญร่วมกับเชื้อ *P. papuli* SW01/4, *S. marcescens* SPt360 และ *P. fluorescens* SP007s ได้ ในขณะที่เชื้อ *P. fluorescens* SP007s ไม่สามารถเจริญร่วมกับเชื้อ *P. papuli* SW01/4 ได้ ส่วนเชื้อ *P. papuli* SW01/4 สามารถเจริญร่วมกันกับ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *S. marcescens* SPt360 ได้ และ *S. marcescens* SPt360 สามารถเจริญร่วมได้กับเชื้อ *B.amyloliquefaciens* KPS46 *P. papuli* SW01/4 และ *P. fluorescens* SP007s โดยการเจริญร่วมกันได้ของเชื้อจะเป็นในลักษณะการเจริญแข่งขันแต่ไม่มีการคลุมทับกัน แต่การเจริญที่ไม่สามารถเจริญร่วมกันได้จะเป็นในลักษณะการเจริญแข่งขันคลุมทับและมีการผลิตสารออกมาขยับยั้งซึ่งกันและกัน (ตารางที่ 8 และ ภาพที่ 7)

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่างสายพันธุ์ในการเจริญร่วมกันบนผิวหน้าอาหาร NA ด้วยวิธีการต่างๆ

วิธีทดสอบ	สายพันธุ์แบคทีเรีย	ความสามารถในการเจริญร่วมกัน ^{1/}		
		KPS46	SW01/4	SP007s
Dual culture	KPS46	+	+	+
	SW01/4	+	+	-
	SP007s	+	-	+
	SPt360	+	+	+
Agar diffusion	KPS46	+	+	+
	SW01/4	+	+	-
	SP007s	+	-	+
	SPt360	+	+	+
Paper disc diffusion	KPS46	+	+	+
	SW01/4	+	+	-
	SP007s	+	-	+
	SPt360	+	+	+

^{1/} + = สามารถเจริญร่วมกันได้, - = ไม่สามารถเจริญร่วมกันได้



ภาพที่ 7 แสดงประสิทธิภาพการเจริญร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการบนอาหาร NA โดยวิธีการ dual culture (ก) agar diffusion (ข) และ paper disc diffusion (ค)

3.3 การเจริญร่วมกันของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ในอาหารเหลว และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน

3.3.1 ประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ที่เจริญร่วมกันในอาหารทดสอบ

การศึกษาจำนวนประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ที่เลี้ยงแบบผสมในอาหารเหลว NB ในลักษณะ คู่ผสม 2 สายพันธุ์ ผสม 3 สายพันธุ์ และผสม 4 สายพันธุ์ และเปรียบเทียบกับเชื้อแบบเดี่ยว โดยตรวจสอบจำนวนประชากรเชื้อด้วยวิธี dilution plate count หลังเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์เมื่อเลี้ยงแบบผสมในอาหารเหลวมีจำนวนประชากรที่มีชีวิตรอดแตกต่างกัน และมีประชากรต่ำกว่าการเลี้ยงแบบเดี่ยว (*P. pabuli* SW01/4) และแบคทีเรียปฏิปักษ์บางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญและมีชีวิตรอดได้ แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมคู่ แบบผสม 2 สายพันธุ์ (อัตราส่วน 1:1) ที่เจริญร่วมกันได้ดีที่สุด ที่อายุการเลี้ยง 24 ชั่วโมง คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s โดยมีจำนวนประชากรเชื้อที่ตรวจสอบได้ เท่ากับ 2×10^{10} cfu/มิลลิลิตร และ 2×10^{12} cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากประชากรเริ่มต้นเท่ากับ 1×10^8 cfu/มิลลิลิตร ส่วนกรรมวิธีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม 3 สายพันธุ์ที่เจริญร่วมกันได้ดีที่สุดคือ การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 *P. fluorescens* SP007s และ *S. marcescens* SPT360 โดยมีจำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เฉลี่ยเท่ากับ 1×10^{10} , 2×10^{11} และ 2×10^{10} cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ และการเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม 4 สายพันธุ์ (อัตราส่วน 1:1:1:1) ที่อายุการเลี้ยง 24 ชั่วโมง ที่เจริญร่วมกันได้ดีที่สุดคือ การเลี้ยงแบคทีเรียระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46, *P. fluorescens* SP007s, *S. marcescens* SPT360 และ *P. pabuli* SW01/4 ที่มีจำนวนประชากรเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.5×10^9 และ 2×10^9 และ 1×10^9 และ 0 cfu/มิลลิลิตรตามลำดับ ที่อายุการเลี้ยง 24 ชั่วโมง ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยวพบว่า ประชากรของเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะสูงกว่าการเลี้ยงแบบผสมโดย *B. amyloliquefaciens* KPS46 มีจำนวนประชากรเฉลี่ยเท่ากับ 3×10^{11} cfu/มิลลิลิตร *P. fluorescens* SP007s มีจำนวนประชากรเฉลี่ยเท่ากับ 3×10^{12} cfu/มิลลิลิตร *S. marcescens* SPT360 มีจำนวนประชากรเฉลี่ยเท่ากับ 2×10^{10} cfu/มิลลิลิตร และ *P. pabuli* SW01/4 มีจำนวนประชากรเฉลี่ยเท่ากับ 2×10^{10} cfu/มิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่า การนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์มาเลี้ยงร่วมกันในอาหาร NB มีผลต่อความสามารถในการเจริญร่วมกันแตกต่างกันและขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เชื้อทดสอบ

3.3.2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสมหลายสายพันธุ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสมเชื้อต่างสายพันธุ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนด้วยวิธี paper disc พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะคู่ผสม 2 สายพันธุ์ อัตราส่วน 1:1 ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนได้ดีที่สุด โดยมีความกว้างบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.4 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างจากการผสมเชื้อในอัตราส่วนอื่น ๆ อย่างชัดเจน ($P=0.05$) ส่วนแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม 3 สายพันธุ์ อัตราส่วน 1:1:1 ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s และ *S. marcescens* SPt360 และระหว่าง *P. fluorescens* SP007s และ *S. marcescens* SPt360 และ *P. pabuli* SW01/4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนได้ดีทัดเทียมกัน โดยมีความกว้างบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 0.8 เซนติเมตร นอกจากนี้พบว่ากรรมวิธีการเลี้ยงแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม 4 สายพันธุ์ อัตราส่วน 1:1:1:1 ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 *P. fluorescens* SP007s *S. marcescens* SPt360 และ *P. pabuli* SW01/4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนต่ำสุดมีความกว้างบริเวณยับยั้งเท่ากับ 0.6 เซนติเมตร ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยว คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 *P. fluorescens* SP007s *S. marcescens* SPt360 และ *P. pabuli* SW01/4 มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.2 1.3 1.2 และ 1.1 เซนติเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะคู่ผสม 2 สายพันธุ์ ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม 3 สายพันธุ์ และผสม 4 สายพันธุ์ ซึ่งจากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่าการเลี้ยงเชื้อแบบผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนได้ดีกว่าการเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์แบบเชื้อเดี่ยว ที่มีขนาดบริเวณยับยั้งแคบกว่าซึ่งอาจเป็นผลมาจากการผลิตสารที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น หรืออาจเป็นการชักนำให้เชื้อผลิตสารชนิดใหม่เพิ่มเติม และการใช้เชื้อผสมมากเกินไปมีผลต่อประสิทธิภาพในการเจริญ และการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อโรค ซึ่งถือเป็นกลไกหลักของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคพืชเชื้อสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 9 ประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่างสายพันธุ์ที่เลี้ยงแบบเดี่ยวและแบบผสมในอาหารเหลว NB และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ

Xanthomonas axonopodis pv. *glycines*

ลำดับ	กลุ่มผสมเชื้อปฏิชีวนะและอัตราส่วนผสม ^{1/}	ประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ (cfu/มิลลิลิตร)				บริเวณยับยั้ง (ซม.) ²
		KPS46	SW01/4	SP007s	SPt360	
1	KPS46	3X10 ¹¹	-	-	-	1.2b
2	SP007s	-	-	3X10 ¹²	-	1.3ab
3	SPt360	-	-	-	2X10 ¹⁰	1.2b
4	SW01/4	-	2X10 ¹⁰	-	-	1.1c
5	KPS46+SP007s (1:1)	2X10¹⁰	-	2X10¹²	-	1.4a
6	KPS46+SPt360 (1:1)	1X10 ¹⁰	-	-	1.5X10 ¹⁰	0.6f
7	KPS46+SW01/4 (1:1)	2X10 ¹¹	1X10 ¹¹	-	-	1.0c
8	SP007s+SPt360 (1:1)	-	-	3X10 ¹¹	2X10 ¹⁰	0.8d
9	SP007s+SW01/4 (1:1)	-	0	3X10 ¹²	-	0.6f
10	SPt360+SW01/4 (1:1)	-	1X10 ¹⁰	-	2X10 ¹⁰	0.7e
11	KPS46+SP007s+SPt360 (1:1:1)	1X10 ¹⁰	-	2X10 ¹¹	2X10 ¹⁰	0.8d

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับ	กลุ่มผสมเชื้อปฏิปักษ์และอัตราส่วนผสม ^{1/}	ประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (cfu/มิลลิลิตร)				บริเวณยับยั้ง (ซม.) ^{2/}
		KPS46	SW01/4	SP007s	SPt360	
12	KPS46+SP007s+SW01/4 (1:1:1)	1X10 ¹⁰	0	2X10 ¹¹	-	0.7
13	SP007s+SPt360+SW01/4 (1:1:1)	-	1X10 ¹⁰	2X10 ¹¹	1X10 ¹⁰	0.8
14	KPS46+SPt360+SW01/4 (1:1:1)	2X10 ¹⁰	1X10 ¹⁰	-	1X10 ¹⁰	0.6
15	KPS46+SP007s+SPt360+SW01/4 (1:1:1:1)	0.5X10 ⁹	0	2X10 ⁹	1X10 ⁹	0.6
16	กรรมวิธีควบคุม (อาหาร NB)	0	0	0	0	0

^{1/} cell suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ แต่ละสายพันธุ์ที่ปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 10⁸ cfu/มิลลิลิตร และเมื่อผสมกันจะใช้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิลิตร และตรวจนับประชากรเชื้อที่ 24 ชั่วโมงหลังเลี้ยงเชื้อ

^{2/} ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* เมื่อทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion.; ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติ (P=0.05) เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range test (DMRT)

3.4 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสมหลายสายพันธุ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด และการผลิตสาร Indole- 3- acetic acid (IAA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด โดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมกลุ่มผสม 2 สายพันธุ์ ผสม 3 สายพันธุ์ ผสม 4 สายพันธุ์ และแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวมาทดสอบที่มีประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโต พบว่ากรรมวิธีควบคุมเมล็ดถั่วเหลืองด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะกลุ่มผสม 2 สายพันธุ์ ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 1:1 มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดได้สูงสุด โดยมีความสูงต้นเท่ากับ 11.4 เซนติเมตร ความยาวราก 23.2 เซนติเมตร จำนวนรากแขนง 31 ราก และน้ำหนักสด 0.6 กรัม ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมแบบ 3 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดได้สูงสุดคือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 *P. fluorescens* SP007s และ *P. pabuli* SW01/4 อัตรา 1:1:1 มีความสูงต้น เท่ากับ 7.6 เซนติเมตร ความยาวราก 10.5 เซนติเมตร จำนวนรากแขนง 25 ราก และน้ำหนักสด 0.6 กรัม ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม 4 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดได้ คือ การผสมเชื้อระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 *P. fluorescens* SP007s *S. marcescens* SPt360 และ *P. pabuli* SW01/4 อัตราส่วน 1:1:1:1 มีความสูงต้น เท่ากับ 6.8 เซนติเมตร ความยาวราก 10.6 เซนติเมตร จำนวนรากแขนง 27 ราก และน้ำหนักสด 0.5 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 10) แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมกลุ่มผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดได้ดีกว่าอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสม 3 และ 4 สายพันธุ์ และกรรมวิธีควบคุมเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ และที่น่าสนใจพบว่ากลุ่มผสมดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมด้านการเจริญเติบโตในทุกดัชนีชี้วัดได้ดีกว่าการใช้เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s แบบสายพันธุ์เดี่ยว ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการผสมเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถชักนำให้เชื้อผลิตสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ดีกว่าการเลี้ยงแบบเดี่ยว และการเลี้ยงร่วมกับกลุ่มผสมเชื้อสายพันธุ์อื่น ที่อาจมีผลในการยับยั้งกันเอง และสารที่เชื้อผลิตมีผลโดยตรงต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้อย่างเพียงพอและเหมาะสม

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณ indole -3- acetic acid (IAA) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต Indole -3- acetic acid (IAA) ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมแบบคู่ผสม 2 สายพันธุ์ ผสม 3 สายพันธุ์ ผสม 4 สายพันธุ์ และแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยวด้วยวิธี Salkowski assay เพื่อประเมินหาความสัมพันธ์ในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากการทดลองในข้อ 3.4.1 ซึ่งพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์คู่ผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 1:1 มีประสิทธิภาพการผลิตสาร indole-3-acetic acid (IAA) ได้ดีที่สุดมีปริมาณเท่ากับ 0.201 μg IAA / ปริมาณสารทดสอบ 1 มิลลิลิตร ซึ่งสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตด้านลำต้นของถั่วเหลืองฝักสดในข้อ 3.4.1 ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม 3 สายพันธุ์ คือระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 *P. fluorescens* SP007s และ *P. pabuli* SW01/4 อัตราส่วน 1: 1:1 มีปริมาณ IAA รองลงมาเฉลี่ยเท่ากับ 0.179 μg IAA / ปริมาณสารทดสอบ 1 มิลลิลิตร และ แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม 4 สายพันธุ์ ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 *P. fluorescens* SP007s *S. marcescens* SPT360 และ *P. pabuli* SW01/4 อัตราส่วน 1:1:1:1 มีปริมาณ IAA ที่ตรวจพบได้เท่ากับ 0.165 μg IAA / ปริมาณสารทดสอบ 1 มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการผลิตสาร indole-3-acetic acid ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงแบบเดี่ยวคือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 *P. fluorescens* SP007s *S. marcescens* SPT360 และ *P. pabuli* SW01/4 เท่ากับ 0.115 0.125 0.106 และ 0.158 μg IAA / ปริมาณสารทดสอบ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 8) จากผลการทดลองแสดงว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์คู่ผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s สามารถผลิตสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ปริมาณมากที่สุด และเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าการเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์แบบเดี่ยว โดยปริมาณการผลิต IAA ที่เชื้อผลิตมีความสอดคล้อง กับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด โดย IAA มีผลต่อการเจริญของราก และเมื่อรากมีการเจริญดีทำให้มีผลต่อการตั้งธาตุอาหารอย่างเต็มที่และส่งผลให้ส่วนลำต้นพัฒนาการเจริญดีตามไปด้วย และการเลี้ยงเชื้อร่วมกันหลายสายพันธุ์ (3 และ 4 สายพันธุ์) อาจมีผลต่อการแสดงออกการผลิตสารปลดปล่อย (protein secretion) บางชนิดด้วย

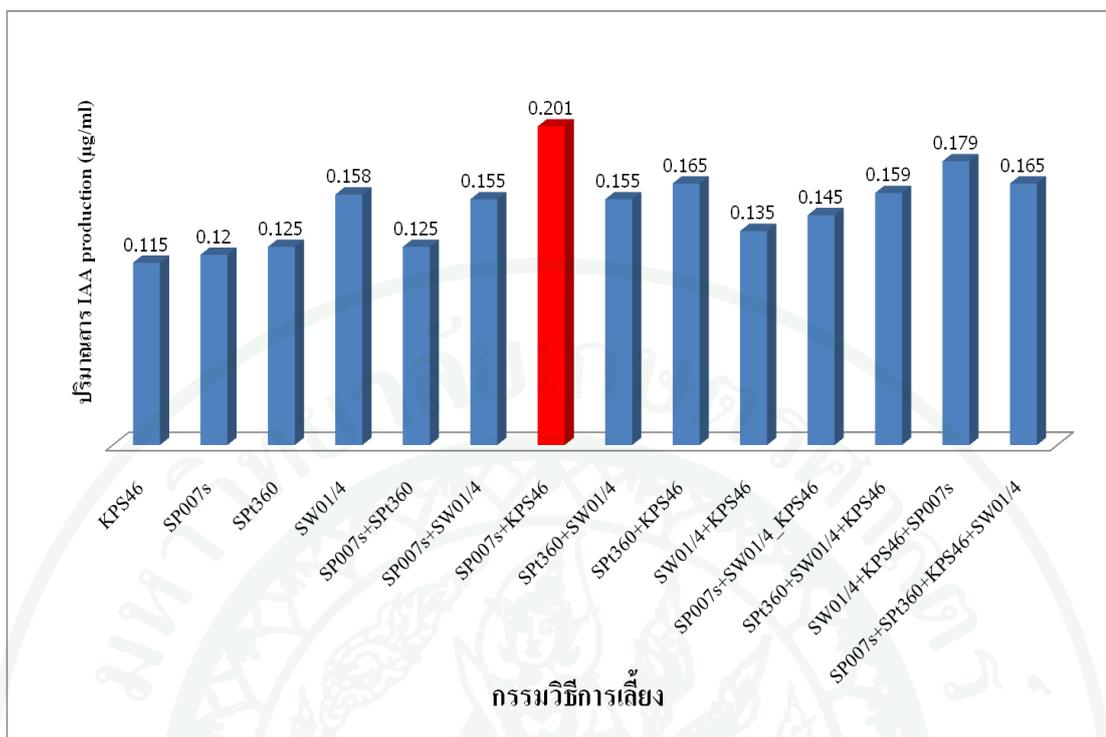
ตารางที่ 10 คุณสมบัติของแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบสายพันธุ์เดี่ยวและแบบผสมในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด

กรรมวิธีการใช้เชื้อปฏิชีวนะ ^{1/}	อัตราการเจริญเติบโต ^{2/}			
	ความยาวราก (ซม.)	สูงต้น (ซม.)	จำนวนรากแขนง (ราก)	นน.สด (กรัม)
1. KPS46	18.1 f	5.1 p	29.8 c	0.5 b
2. SP007s	21.8 c	7.1 f	28.6 f	0.5 b
3 SPt360	18.5 e	6.7 h	21.8	0.6 a
4. SW01/4	20.0 d	5.3 o	30.0 b	0.5 b
5. SP007s+SPt360	16.3 g	6.5 i	21.6 j	0.6 a
6. SP007s+SW01/4	22.2 b	10.5 b	28.8 e	0.5 b
7. SP007s+KPS46	23.2 a	11.4 a	31.2 a	0.6 a
8. SPt360+SW01/4	11.8 h	9.2 c	26.8 g	0.6 a
9. SPt360+KPS46	10.5 j	6.2 j	29.2 d	0.6 a
10. SW01/4+KPS46	10.5 j	5.4 n	20.8 l	0.5 b
11. SP007s+SPt360+KPS46	10.6 i	9.8 d	14.2 m	0.6 a
12. SP007s+SW01/4+KPS46	10.5 j	5.8 l	22.4 i	0.5 b
13. SPt360+SW01/4+KPS46	10.6 i	5.9 k	21.4 k	0.6 a
14. SW01/4+KPS46+SP007s	10.5 j	7.9 e	24.6 h	0.6 a
15. SP007s+SPt360+KPS46+SW01/4	10.6 i	6.8 g	26.6 g	0.5 b
16. Control ^{3/}	8.6 k	5.7 m	8.8 n	0.4 c
CV (%)	35.3	27.3	25.4	6.4

^{1/}กรรมวิธีการใช้เชื้อปฏิชีวนะคือการคลุกเมล็ดอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร/เมล็ด 30 กรัม; โดยการใช้เชื้อแบบเดี่ยว (ตามกรรมวิธีที่ 1-4) และแบบผสม (ตามกรรมวิธีที่ 5-15) KPS46 = *B. amyloliquefaciens* KPS46, SP007s=*P. fluorescens* SP007s, SPt360 =*S. marcescens* SPt360 และ SW01/4= *P. pabuli* SW01/4

^{2/}ตัวอักษรของข้อมูลในตารางที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น (P=0.05) เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range test (DMRT)

^{3/}กรรมวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อคลุกเมล็ดถั่วเหลืองฝักสดแทนการใช้ cell-suspension



ภาพที่ 8 ปริมาณ indole-3-acetic acid (IAA) ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงแบบสายพันธุ์เดี่ยวและแบบผสมหลายสายพันธุ์ในอาหารเหลว NB บ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง ; ตัวเลขแสดงปริมาณสาร IAA (µg / มิลลิลิตร)

3.5 อัตราผสมที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณและประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุด บนของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมด้านการควบคุมโรคใบจุดบน โดยการใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่นำมาผสมในอัตราส่วนที่ต่างกัน ปริมาตรสุดท้าย 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร รวมอัตราส่วนผสมทั้งหมด 9 อัตราส่วน เปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบสายพันธุ์เดี่ยว และกรรมวิธีควบคุมโดยการใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (ตารางที่ 11) ผลปรากฏว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผสมเชื้อ 2 สายพันธุ์ คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 : *P. fluorescens* SP007s คืออัตราส่วนที่ 9:1 ซึ่งจากการเลี้ยงเชื้อและตรวจสอบประชากรเชื้อหลังผสมเชื้อ 24 ชั่วโมง พบว่าการผสมในอัตราส่วนดังกล่าวไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อซึ่งกันและกัน โดยพบว่ามีจำนวนประชากรของ *B. amyloliquefaciens* KPS46 เฉลี่ย 2.4×10^{12} cfu/มิลลิลิตร และจำนวนประชากรของ *P. fluorescens* SP007s เฉลี่ย 2.3×10^{12} cfu/มิลลิลิตร ที่ 24 ชั่วโมงหลังเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำการตรวจนับด้วยวิธี dilution plate count บนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ต้านทานได้ ทั้งนี้ค่าตั้งต้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ในอาหารมีค่าเฉลี่ยประมาณ 2.5×10^8 และ 1.7×10^8 cfu/ มิลลิลิตร อัตราส่วนผสมที่มีประสิทธิภาพรองลงมา คือ สัดส่วน 8:2 (*B. amyloliquefaciens* KPS46 : *P. fluorescens* SP007s) มีจำนวนประชากรของ *B. amyloliquefaciens* KPS46 เฉลี่ย 2.2×10^{11} cfu/มิลลิลิตร และจำนวนประชากรของ *P. fluorescens* SP007s เฉลี่ย 2.4×10^{12} cfu/มิลลิลิตร ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ในสัดส่วน 5:5 พบว่ามีจำนวนประชากร *B. amyloliquefaciens* KPS46 เฉลี่ย เท่ากับ 1.1×10^{11} cfu/มิลลิลิตร และ *P. fluorescens* SP007s เท่ากับ 2.0×10^{12} cfu/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบสายพันธุ์เดี่ยว *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่มีจำนวนประชากรเฉลี่ย 2.6×10^{11} และ 3.0×10^{12} cfu/มิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าอัตราส่วนที่ปรับใหม่ในการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s 9:1 มีประชากรเฉลี่ยของเชื้อเพิ่มสูงขึ้นและดีกว่าการใช้อัตรา 1:1 เมื่อเลี้ยงสภาวะและเวลาเดียวกัน

เมื่อนำ cell-suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่ผ่านการทดสอบสัดส่วนการผสมที่เหมาะสมมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ด้วยวิธี paper disc

diffusion พบว่าหลังจากบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง cell-suspension ของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ คู่ผสม 2 สายพันธุ์ที่สัดส่วน 9:1 มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ดีที่สุดโดยมีขนาดความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.6 เซนติเมตร รองลงมา คือ แบคทีเรีย ปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่สัดส่วน 5:5 และเชื้อเดี่ยวแบคทีเรียปฏิชีวนะ *P. fluorescens* SP007s ที่มีบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ โรคเท่ากับ 1.4 และ 1.3 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่สัดส่วน 8:2 และ 1:9 มีบริเวณยับยั้งการ เจริญของเชื้อสาเหตุโรค เท่ากับ 1.2 เซนติเมตร และพบว่าการใช้ที่สัดส่วนผสมของ *B. amyloliquefaciens* KPS46 : *P. fluorescens* SP007s เท่ากับ 9:1 มีความสามารถในการชักนำเชื้อ ดึงกล่าวผลิตสารยับยั้งได้ดีกว่าการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s แบบเดี่ยว ที่มีขนาดบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 1.2 และ 1.3 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 11) และให้ผลดีกว่าการใช้เชื้อปฏิชีวนะคู่ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 1:1 จากการทดลองในข้อ 3.3.2 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 11 อัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนในห้องปฏิบัติการ

กรรมวิธีการเลี้ยงเชื้อ ปฏิชีวนะ ^{1/}	จำนวนประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ (cfu/มิลลิลิตร)		บริเวณยับยั้ง (ซม.) ^{2/}
	KPS46	SP007s	
1.KPS46 (1)	2.6 X 10 ¹¹	-	1.2d
2.SP007s (1)	-	3.0 X 10 ¹²	1.3c
3. KPS46+SP007s (5:5)	1.1 X 10 ¹⁰	2.0 X 10 ¹²	1.4b
4. KPS46+SP007s (6: 4)	1.9 X 10 ¹¹	2.7 X 10 ¹²	1.0f
5. KPS46+SP007s (7: 3)	1.9 X 10 ¹¹	2.4 X 10 ¹²	1.0f
6. KPS46+SP007s (8: 2)	2.2 X 10 ¹¹	2.4 X 10 ¹²	1.2d
7. KPS46+SP007s (9:1)	2.4 X 10 ¹²	2.3 X 10 ¹²	1.6a
8. KPS46+SP007s (4:6)	1.7 X 10 ¹⁰	2.0 X 10 ¹³	1.1e
9. KPS46+SP007s (3:7)	1.5 X 10 ¹⁰	2.4 X 10 ¹³	1.0f
10. KPS46+SP007s (2:8)	1.2 X 10 ⁹	1.9 X 10 ¹⁴	1.0f
11. KPS46+SP007s (1:9)	0.9 X 10 ⁹	2.1 X 10 ¹⁴	1.2d
12. Control	0	0	0g

^{1/} KPS46 = *B. amyloliquefaciens* KPS46, SP007s = *P. fluorescens* SP007s ; cell suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ที่ปรับค่าความขุ่นเท่ากับ 10⁸ cfu/มิลลิลิตร และเมื่อผสมจะใช้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิลิตร ตรวจสอบจำนวนเซลล์เมื่อบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง บนอาหารที่ผสมสารปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ต้านทานได้

^{2/} ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติ (P=0.05) เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range test (DMRT)

4. ประสิทธิภาพการเจริญครอบครองใบถั่วเหลืองของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และการผลิตสารยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน

4.1 จำนวนประชากรแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนบนผิวใบถั่วเหลือง

การตรวจสอบติดตามอัตราการรอดชีวิตและการครอบครองผิวใบถั่วเหลืองของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่ใช้แบบสายพันธุ์เดี่ยว และสายพันธุ์ผสมในอัตราส่วนเท่ากับ 9:1 พบว่าอัตราการรอดชีวิต และการครอบครองผิวใบมีความผันแปรแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อและรูปแบบการใช้ โดยประชากรของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่ใช้พ่นใบถั่วเหลืองแบบเดี่ยวมีปริมาณประชากรที่ตรวจสอบที่ 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกับการใช้แบบเชื้อผสม (เมื่อพิจารณาแต่ละสายพันธุ์) โดยระยะเวลาตรวจสอบเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมงหลังพ่นเชื้อ พบว่ามีประชากรเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 เท่ากับ 5.0×10^3 cfu/มิลลิลิตร เมื่อพ่นแบบเชื้อเดี่ยว ในขณะที่ *B. amyloliquefaciens* KPS46 ที่พ่นพร้อมกับ *P. fluorescens* SP007s มีประชากรเท่ากับ 2.2×10^3 cfu/มิลลิลิตร พ่นเช่นเดียวกับประชากรของ *P. fluorescens* SP007s ที่เริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมงหลังพ่นเชื้อ พบว่ามีประชากร SP007s เท่ากับ 6.2×10^3 cfu/มิลลิลิตร เมื่อพ่นแบบเชื้อเดี่ยว ในขณะที่การใช้ *P. fluorescens* SP007s พ่นพร้อมกับ *B. amyloliquefaciens* KPS46 มีประชากรเท่ากับ 3.0×10^3 cfu/มิลลิลิตร อย่างไรก็ตามประชากรเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นจาก 6 12 และ 24 ชั่วโมง และหลังจากพ่นที่ 48 72 และ 96 ชั่วโมง ประชากรของเชื้อปฏิปักษ์มีแนวโน้มลดลงอีกครั้ง และเพิ่มขึ้นเมื่อตรวจสอบที่ 120 และ 168 ชั่วโมง แสดงถึงความผันแปรของประชากรบนใบพืชที่อาจเป็นผลจากสภาพแวดล้อมที่ผิวใบพืช

ทั้งนี้เมื่อพิจารณาแล้วอาจแสดงให้เห็นว่าเป็นไปตามวงจรชีวิตของเชื้อ และสภาพแวดล้อมที่ส่งผลต่อความแปรปรวนของประชากรเชื้อที่ระยะเวลาต่าง ๆ และกระบวนการเพิ่มปริมาณของเชื้อในสภาพธรรมชาติ ที่ระยะเวลาการตรวจสอบประชากรเชื้อที่ 24 ชั่วโมง พบว่ากรรมวิธีการพ่นเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s แบบเชื้อเดี่ยวมีประชากรเชื้อบนผิวใบถั่วเหลืองเท่ากับ 6.1×10^3 และ 7.5×10^3 cfu/มิลลิลิตร ในขณะที่กรรมวิธีการพ่นแบบผสมเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 มีประชากรเชื้อ 3.3×10^3 cfu/มิลลิลิตร และ 4.3×10^3 cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราการเจริญ

ของ *B. amyloliquefaciens* KPS46 จะช้ากว่า *P. fluorescens* SP007s ถึงแม้ในกรรมวิธีการใช้แบบ เชื้อผสมที่มีการปรับใช้อัตราส่วน 9:1 (*B. amyloliquefaciens* KPS46 : *P. fluorescens* SP007s) แล้ว แสดงให้เห็นว่า *P. fluorescens* SP007s มีประสิทธิภาพในการเจริญดีกว่า *B. amyloliquefaciens* KPS46 เมื่อใช้ร่วมกัน และเมื่อตรวจสอบประชากรเชื้อที่ 72 ชั่วโมง พบว่าปริมาณประชากรเชื้อ แบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ทั้งแบบการใช้เชื้อเดี่ยวและ เชื้อผสมมีอัตราการรอดชีวิตในระยะใกล้เคียงกันคือ ประชากร *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่พ่นแบบเชื้อเดี่ยวเท่ากับ 2.4×10^3 cfu/มิลลิลิตร และ 2.6×10^3 cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีการใช้แบบผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 มีประชากรเชื้อ 2.0×10^3 cfu/มิลลิลิตร และ 2.7×10^3 cfu/มิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งเป็นไปได้ว่าช่วงเวลาดังกล่าวเป็นสภาวะคงตัวที่เชื้อปฏิปักษ์สามารถปรับตัวครอบครองใบถั่ว เหลืองได้ และเมื่อตรวจประชากรเชื้ออีกครั้งที่ 168 ชั่วโมงหลังพ่นหรือประมาณ 6 วัน พบว่าที่ผิว ใบถั่วเหลืองมีประชากรเชื้อเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในทุกกรรมวิธี กรรมวิธีการพ่นเชื้อเดี่ยวมี *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s เท่ากับ 4.4×10^3 cfu/มิลลิลิตรและ 6.3×10^3 cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีการพ่นแบบผสมมีประชากร *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s เท่ากับ 4.3×10^3 และ 4.6×10^3 cfu/ มิลลิลิตร ตามลำดับ

ส่วนการตรวจสอบติดตามอัตราการรอดชีวิตและครอบครองผิวใบถั่วเหลืองของเชื้อ แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมและสายพันธุ์เดี่ยวร่วมกับการปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* บนใบถั่วเหลืองฝักสด พบว่าอัตราการรอดชีวิตและการครอบครองผิวใบมีความแตกต่างกัน โดย พบว่าประชากรของเชื้อสายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 ที่ใช้พ่นใบถั่วเหลืองร่วมกับการปลูกเชื้อสาเหตุโรคราที่ตรวจสอบที่ 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มีจำนวนประชากรของเชื้อที่ตรวจสอบในช่วงเวลาเริ่มต้นมีจำนวนประชากรเฉลี่ยของ *B. amyloliquefaciens* KPS46 เท่ากับ 1.9×10^6 2.2×10^6 2.6×10^4 3.5×10^6 และ 2.7×10^5 cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีจำนวนประชากรเฉลี่ยของ *P. fluorescens* SP007s เท่ากับ 2.1×10^5 2.7×10^5 3.1×10^5 3.9×10^5 และ 3.0×10^4 cfu/มิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีพ่นเชื้อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* อย่างเดียวมีจำนวนประชากรเริ่มต้น 5.7×10^5 cfu/มิลลิลิตร แต่พบว่าประชากรเชื้อ แบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์มีการลดลงและเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลาเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 12) โดยมีการยึดเกาะและมีชีวิตอยู่ที่ผิวใบถั่วเหลืองแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคราใบจุดนูนในช่วงท้ายของ การทดสอบที่ 168 ชั่วโมง ซึ่งพบว่ามีจำนวนประชากรเชื้อหลังปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์

คู่ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 และแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยวคือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s เฉลี่ยเท่ากับ 3.6×10^3 3.8×10^3 5.0×10^3 และ 5.4×10^3 cfu/มิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ในช่วงท้ายมีจำนวนประชากรเฉลี่ยเท่ากับ 0.6×10^2 cfu/มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าเชื้อปฏิปักษ์แสดงให้เห็นว่าเชื้อปฏิปักษ์มีศักยภาพในการแข่งขันด้านแหล่งที่อยู่กับเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งผลการทดลองโดยกรรมวิธีปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนเพียงอย่างเดียวเพื่อคูนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* บนใบถั่วเหลือง ผลปรากฏว่าจากปริมาณเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* เริ่มต้นที่ 5.7×10^2 cfu/มิลลิลิตร พบว่าปริมาณเชื้อสาเหตุมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อสิ้นสุดการตรวจนับปริมาณเชื้อครั้งสุดท้ายที่ 168 ชั่วโมง ปริมาณที่ตรวจสอบได้เท่ากับ 2.4×10^2 cfu/มิลลิลิตร และพบว่าปริมาณเชื้อมีความผันแปรไม่สม่ำเสมอคือช่วงแรกของการตรวจสอบที่ 6 12 24 และ 48 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อสาเหตุโรคและมีแนวโน้มลดลงที่ 72 -168 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

4.2 ประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนใบถั่วเหลือง

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* โดยการใช้ น้ำล้างใบที่มีการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนผิวใบด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่ากรรมวิธีที่ใช้น้ำล้างใบของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์คู่ผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 ที่พ่นลงบนใบ 168 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อก่อโรคใบจุดบนได้ดี โดยตรวจพบบริเวณยับยั้งกว้างเท่ากับ 0.5 เซนติเมตร รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ใช้น้ำล้างใบของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยวคือ *P. fluorescens* SP007s และ *B. amyloliquefaciens* KPS46 ยับยั้งได้บริเวณกว้างเท่ากับ 0.4 และ 0.3 เซนติเมตรตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวทั้งการใช้แบบเดี่ยวและแบบผสมสามารถผลิตสารยับยั้งบนผิวใบพืชได้แต่อาจมีปริมาณที่เจือจางกว่าการเลี้ยงในอาหารทดสอบจึงเห็นผลในการยับยั้งน้อยกว่า ส่วนกรรมวิธีที่ใช้น้ำล้างใบของแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามด้วยการปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ผลปรากฏว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ลดลงเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลจากสภาวะการแข่งขันของเชื้อที่ผิวใบและประชากรของเชื้อที่ส่งผลต่อการผลิตสารลดลง อย่างไรก็ตามพบว่ากรรมวิธีที่ใช้น้ำล้างใบของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์คู่ผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ

P. fluorescens SP007s อัตราส่วน 9:1 และแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวคือ *P. fluorescens* SP007s มีประสิทธิภาพยับยั้งได้บริเวณกว้างเท่ากับ 0.2 เซนติเมตร รองลงมาคือแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 ยับยั้งได้บริเวณกว้างเท่ากับ 0.1 เซนติเมตร เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* เพียงอย่างเดียวในการทดสอบ ที่ไม่พบการเกิดบริเวณยับยั้ง (ตารางที่ 12) จึงแสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำล้างใบที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดียวและกลุ่มผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 สามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ ทั้งนี้ประสิทธิภาพการผลิตสารยับยั้งบนผิวใบจะขึ้นอยู่กับจำนวนประชากรเชื้อและสภาวะกระตุ้น รวมทั้งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อโรคได้จริงบนใบพืช ซึ่งได้มีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

ทั้งนี้จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการใช้น้ำล้างจากใบถั่วเหลืองที่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดียวและกลุ่มผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 ต่อประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคใบจุดบนถั่วเหลือง โดยการพ่นน้ำล้างใบลงบนใบถั่วเหลืองที่อายุ 14 21 และ 28 วัน และตามด้วยการปลูกเชื้อสาเหตุโรค พบว่ากรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์กลุ่มผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคใบจุดบนหลังจากการปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้โดยมีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 80.8 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดียว *P. fluorescens* SP007s และ *B. amyloliquefaciens* KPS46 สามารถทำให้ถั่วเหลืองฝักสดเกิดโรคใบจุดบนหลังจากการปลูกเชื้อมีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 81.7 และ 84.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมโดยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อความรุนแรงของโรคเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ตามหลังด้วยการปลูกเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* พบว่ากรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์กลุ่มผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 และกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดียวคือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s พ่นลงบนต้นถั่วเหลืองฝักสดทำให้มีความรุนแรงโรคเพิ่มขึ้นเท่ากับ 90.2 92.6 และ 91.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* เพียงอย่างเดียวที่มีระดับความรุนแรงเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะเป็นส่วนหนึ่งในการควบคุมโรคแต่จากการทดลอง พบว่าสามารถควบคุมโรคได้ ซึ่งเป็นผลจากระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ใบมีน้อยรวมทั้งกลไก

การควบคุมโรคในสภาพธรรมชาติจำเป็นต้องใช้กลไกอื่นร่วมด้วย เช่น การเจริญแข่งขันและการชักนำภูมิคุ้มกันโรคของพืช



ตารางที่ 12 ประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมบนใบถั่วเหลืองฝักสดหลังปลูกเชื้อที่ระยะเวลาต่างกัน และประสิทธิภาพของน้ำล้างใบต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน

กรรมวิธี ^{1/}	ประชากรเชื้อแบคทีเรีย/น้ำหนักใบ 1 กรัม (cfu/มิลลิลิตร) ^{2/}									บริเวณยับยั้ง (ซม.) ^{3/}
	ระยะเวลาหลังปลูกเชื้อ (ชั่วโมง)									
	0	6	12	24	48	72	96	120	168	
พ่นเฉพาะแบคทีเรียปฏิชีวนะ										
KPS46	5.0 X10 ³	5.2 X10 ³	5.9 X10 ³	6.1 X10 ³	4.4 X10 ³	2.4 X10 ³	2.7 X10 ³	3.8 X10 ³	4.4 X10 ³	0.3 c
SP007s	6.2 X10 ³	6.8 X10 ³	7.1 X10 ³	7.5 X10 ³	5.3 X10 ³	2.6 X10 ³	3.0 X10 ³	4.8 X10 ³	5.3 X10 ³	0.4 b
KPS46+SP007s										0.5 a
: KPS46	2.2 X10 ³	2.7 X10 ³	3.0 X10 ³	3.3 X10 ³	2.2 X10 ³	2.0 X10 ³	2.3 X10 ³	3.5 X10 ³	4.3 X10 ³	
: SP007s	3.0 X10 ³	3.6 X10 ³	3.9 X10 ³	4.3 X10 ³	3.1 X10 ³	2.7 X10 ³	2.9 X10 ³	4.0 X10 ³	4.6 X10 ³	
น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0f
พ่นแบคทีเรียปฏิชีวนะและเชื้อสาเหตุโรค										
KPS46 -Xag										0.1e
:KPS46	4.2 X10 ⁴	4.5 X10 ⁴	4.8 X10 ⁴	5.0 X10 ⁴	4.2 X10 ⁴	3.4 X10 ⁴	3.6 X10 ³	4.3 X10 ³	5.0 X10 ³	
:Xag	3.2 X10 ³	3.7 X10 ³	3.9 X10 ³	4.0 X10 ³	3.1 X10 ²	2.6 X10 ²	2.2 X10 ²	2.0 X10 ²	1.5 X10 ²	

ตารางที่ 12 (ต่อ)

กรรมวิธี ^{1/}	ปริมาณประชากรของเชื้อแบคทีเรีย ($\times 10^2$ cfu/มิลลิลิตร) ^{2/}										บริเวณยับยั้ง (ซม.) ^{3/}
	ระยะเวลาหลังปลูกเชื้อ (ชั่วโมง)										
	0	6	12	24	48	72	96	120	168		
SP007s -Xag											0.2 d
:SP007s	5.3×10^4	5.7×10^4	5.9×10^4	6.0×10^4	5.0×10^4	4.2×10^3	4.5×10^3	4.8×10^3	5.4×10^3		
:Xag	3.1×10^3	3.1×10^3	3.3×10^3	3.4×10^3	2.5×10^3	2.2×10^2	2.0×10^2	1.3×10^2	1.1×10^2		
KPS46+SP007s -Xag											0.2 d
: KPS46	1.9×10^6	2.2×10^6	2.6×10^6	3.5×10^6	2.7×10^5	2.0×10^5	2.4×10^3	2.9×10^3	3.6×10^3		
: SP007s	2.1×10^5	2.7×10^5	3.1×10^5	3.9×10^5	3.0×10^4	2.3×10^4	2.8×10^3	3.2×10^3	3.8×10^3		
: Xag	3.0×10^4	3.0×10^4	3.2×10^4	3.3×10^4	2.2×10^2	2.0×10^2	1.7×10^2	1.2×10^2	0.6×10^2		
Xag	5.7×10^5	6.2×10^5	6.7×10^5	7.0×10^5	5.2×10^3	4.7×10^3	2.9×10^2	2.6×10^2	2.4×10^2		0 f

^{1/} การทดลองมี 2 กรรมวิธีคือ KPS46+SP007s = ฟันเฉพาะ suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์; KPS46+SP007s - Xag = ปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนตามหลังการฟัน suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 24 ชั่วโมง

^{2/} การเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม KPS46 + SP007s ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1×10^8 cfu/มิลลิลิตร; การครอบครองพื้นที่ผิวใบถั่วเหลืองตรวจนับจำนวนเซลล์หลังปลูกเชื้อที่ 0-168 ชั่วโมง ด้วยวิธี leaf washing และ dilution plate count

^{3/} การผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรคใบจุดบนถั่วเหลืองของเชื้อปฏิปักษ์บนผิวใบตรวจสอบตัวอย่างใบที่อายุ 168 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ ;ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติ (P=0.05) เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range test (DMRT)

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพของน้ำล้างใบที่มีสารยับยั้งเชื้อก่อโรคใบจุดบนถั่วเหลืองที่ผลิตโดยเชื้อปฏิปักษ์บนผิวใบ

กรรมวิธีการใช้ ^{1/}	ความรุนแรงโรค (%) ^{2/}
พ่นเฉพาะ KPS46	84.9 c
พ่นเฉพาะ SP007s	81.7 b
พ่นเฉพาะ KPS46+SP007s	80.8 a
พ่นน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ	100.0 d
พ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรค	
KPS46 -Xag	92.6 b
SP007s -Xag	91.0 c
KPS46+SP007s -Xag	90.2 a
Xag	100.0 d

^{1/} การทดลองมี 2 กรรมวิธี: KPS46+SP007s = พ่นเฉพาะ suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์; KPS46+SP007s - Xag = ปลุกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลืองตามหลังการพ่น cell-suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 24 ชั่วโมง; KPS46 = *Bacillus amyloliquefaciens* SP007s = *Pseudomonas fluorescens* และ Xag = *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

^{2/} ประเมินการเกิดโรคที่ถั่วเหลืองอายุ 28 วัน; ตัวอักษรของข้อมูลในตารางที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น (P=0.05) เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range test (DMRT)

5. การจำแนกชนิดสาร secondary metabolites ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม โดยวิธี Thin - layer Chromatography (TLC)

5.1 ชนิดอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบผสมหลายสายพันธุ์และการผลิตสาร secondary metabolites

จากการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 และแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยวคือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด คือ NGB LB MY และ KB ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง และทำการแยกสาร secondary metabolites โดยการตกตะกอนเซลล์และกรองเซลล์แบคทีเรียออกด้วย sterile syringe filters (0.45 ไมโคร) ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ด้วยวิธี agar diffusion พบว่าอาหาร NGB มีประสิทธิภาพสูงสุดในกระตุ้นการผลิตสาร secondary metabolites ของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์คู่ผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s โดยมีความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 2.2 เซนติเมตร ส่วนอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร secondary metabolites ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescence* SP007s แบบเดี่ยวคือ อาหาร KB และอาหาร MY เหมาะต่อการผลิตสาร secondary metabolites ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 แบบเดี่ยว มีความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.9 และ 1.7 เซนติเมตรตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์จะมีความจำเพาะของการผลิตสารเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน อย่างไรก็ตามอาหาร NGB เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร secondary metabolites ของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์คู่ผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s (9:1) ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่น ๆ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด ต่อศักยภาพในการผลิตสาร secondary metabolites ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

สายพันธุ์แบคทีเรีย ^{1/}	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความกว้างบริเวณยับยั้ง ^{2/} (เซนติเมตร)
KPS46	NGB	1.5 b
	LB	0.7 d
	MY	1.7 a
	KB	1.2 c
SP007s	NGB	1.6 b
	LB	0.7 d
	MY	1.1 c
	KB	1.9 a
KPS46+SP007s (9:1)	NGB	2.2 a
	LB	0.8 d
	MY	1.3 c
	KB	1.4 b

^{1/} KPS46 = *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46, SP007s = *Pseudomonas fluorescens* SP007s

^{2/} ค่าเฉลี่ยของความกว้างบริเวณยับยั้งจากการทดลอง 4 ซ้ำ ตัวอักษรของข้อมูลในตารางที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น (P=0.05) เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range test (DMRT)

5.2 การสกัดสาร secondary metabolites อย่างหยาบ และการทดสอบประสิทธิภาพของสาร secondary metabolites ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน

5.2.1 ประสิทธิภาพสาร secondary metabolites ที่สกัดหยาบต่อการยับยั้งเชื้อโรคเป้าหมาย

การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสาร secondary metabolites ในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์คู่ผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s สัดส่วน 9:1 ในอาหาร NGB ประมาณ 1 ลิตร นาน 96 ชั่วโมง มีปริมาณการผลิตสาร secondary metabolites สูงสุด 1,322 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) ลักษณะสารที่ได้มีสีน้ำตาล และหนืด ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยวคือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 ในอาหาร MY มีปริมาณการผลิตสาร secondary metabolites ได้รองลงมาคือ 1,150 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) สารที่ได้มีลักษณะมีสีน้ำตาลเข้ม และหนืด และเชื้อปฏิปักษ์ *P. fluorescens* SP007s ในอาหาร KB มีปริมาณการผลิตสาร secondary metabolites ได้ 990 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) ลักษณะสารมีสีน้ำตาล และไม่หนืด นอกจากนี้สาร secondary metabolites ที่สกัดหยาบสามารถละลายได้ดีใน 80% Ethanol จากนั้นทำการเก็บสาร secondary metabolites ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน

การทดสอบประสิทธิภาพสาร secondary metabolites จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนของด้วยวิธี agar diffusion เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูน พบว่าสาร secondary metabolites ที่ผลิตจากเชื้อแต่ละชนิดมีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน และมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคต่างกัน รวมทั้งการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยว และแบบผสมมีผลต่อการผลิต และความเข้มข้นของสาร secondary metabolites ที่ได้ โดยสภาวะการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 ในอาหาร NGB มีระดับความเข้มข้นของสารสูงสุด โดยมีระดับความเข้มข้นที่ 20 µg/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.1 เซนติเมตร และยังให้ผลดีกว่าการเลี้ยงเชื้อ *P. fluorescens* SP007s แบบเดี่ยวที่สามารถทดสอบประสิทธิภาพได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ 30 µg/มิลลิลิตร

มีค่าบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.2 เซนติเมตร นอกจากนี้จากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า สภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยวและแบบผสมมีผลต่อการผลิตสารของเชื้อทดสอบ โดยพบว่า

B. amyloliquefaciens KPS46 เมื่อเลี้ยงแบบเดี่ยวสามารถผลิตสารทดสอบได้ดีกว่าการเลี้ยงผสม โดยพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร secondary metabolites มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้คือ 10 µg/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าบริเวณยับยั้งเท่ากับ 0.7 เซนติเมตร แต่เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับ *P. fluorescens* SP007s พบว่าให้ผลที่ต่างกัน (ตารางที่ 15) ทั้งที่เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 เมื่อเลี้ยงในสภาพเดี่ยวอาจมีการผลิตสารกลุ่มอื่นที่มีประสิทธิภาพร่วมกันในการยับยั้งเชื้อเป้าหมาย แต่เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *P. fluorescens* SP007s จะเกิดการยับยั้งการผลิตสารดังกล่าว

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของสาร secondary metabolites จากการสกัดหายับที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม และแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์เดี่ยวต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลืองฝักสด

ความเข้มข้นของสาร secondary metabolites ($\mu\text{g}/\text{มิลลิลิตร}$)	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)		
	เชื้อแบคทีเรีย ^{1/}		
	KPS46	SP007s	KPS46+SP007s
5	0	0	0
10	0.7	0	0
20	0.9	0	1.1
30	0.94	0.8	1.2
40	0.98	0.95	1.3
50	1.0	1.1	1.4
60	1.2	1.3	1.45
70	1.3	1.4	1.6
80	1.5	1.6	1.7
100	2.0	1.9	2.4
Control ^{2/}	0	0	0

^{1/} KPS46 = *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 แบบเดี่ยว, SP007s = *Pseudomonas fluorescens* SP007s แบบเดี่ยว และ KPS46+SP007s = การเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 และ *Pseudomonas fluorescens* SP007s

^{2/} การทดสอบโดยใช้ 80 % ethanol

5.3 การแยกสาร secondary metabolites โดย Thin-layer Chromatography (TLC) และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines*

การแยกสาร secondary metabolites ที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์คู่ผสมระหว่าง *B.amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s (อัตรา 9:1) บนแผ่น TLC ตามวิธีการข้อ 5.3.2 พบแถบที่แยกได้ของ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 ที่เลี้ยงร่วมกันในอาหาร NGB มีจำนวน 6 แถบที่ชัดเจน โดยมีค่า R_f ของแถบที่ 1-6 เท่ากับ 0.15, 0.21, 0.35, 0.37, 0.47 และ 0.82 ตามลำดับ ในขณะที่แถบที่แยกได้จาก *B. amyloliquefaciens* KPS46 ที่เลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยวในอาหาร NGB มีจำนวน 8 แถบ ค่า R_f ของแถบเท่ากับ 0.13, 0.25, 0.33, 0.37, 0.43, 0.54, 0.86 และ 0.90 ตามลำดับ และแถบที่แยกได้จาก *P. fluorescens* SP007s ที่เลี้ยงแบบเดี่ยวในอาหาร NGB มีจำนวน 6 แถบ ค่า R_f ของแถบที่ 1-6 เท่ากับ 0.16, 0.21, 0.33, 0.36, 0.4 และ 0.66 ตามลำดับ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 9)

โดยมีข้อสังเกตจากการแยกสารที่ได้จากเชื้อแต่ละชนิดและสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกัน คือ เชื้อแต่ละสายพันธุ์ คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s มีการผลิตสารที่แตกต่างกันในสภาวะการเลี้ยงในอาหารและสิ่งแวดล้อมเดียวกัน โดย *B.amyloliquefaciens* KPS46 มีชนิดสารที่แยกได้จาก แถบ TLC จำนวนมากกว่าชนิดสารที่แยกจาก *P. fluorescens* SP007s อย่างน้อย 2 กลุ่มคือ R_f ที่ 0.86 และ 0.90 และเมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารที่แยกได้ โดยการเลี้ยงเชื้อผสมสามารถผลิตชนิดสารได้ 6 กลุ่ม (6 แถบ) แต่มีแถบที่แตกต่างไปจากการเลี้ยงแบบเดี่ยวของ *B.amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s (ภาพที่ 9 และภาพที่ 10) โดยพบว่าเมื่อมีการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่าง *B.amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s แถบสารที่ตรวจสอบได้ที่ R_f 0.54 และ 0.66 ที่แยกออกจากการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยว *B.amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ตามลำดับไม่ปรากฏ แต่ปรากฏว่า แถบสารรวมออกมาใหม่ที่ R_f 0.82 แทน ซึ่งไม่พบแถบดังกล่าวในการเลี้ยง *P. fluorescens* SP007s แบบเดี่ยว แต่มีค่าใกล้เคียงกัน แถบสารที่พบในเชื้อ *B.amyloliquefaciens* KPS46 ที่แถบสารที่ 7 และ 8 ($R_f = 0.86$ และ 0.90 ตามลำดับ)

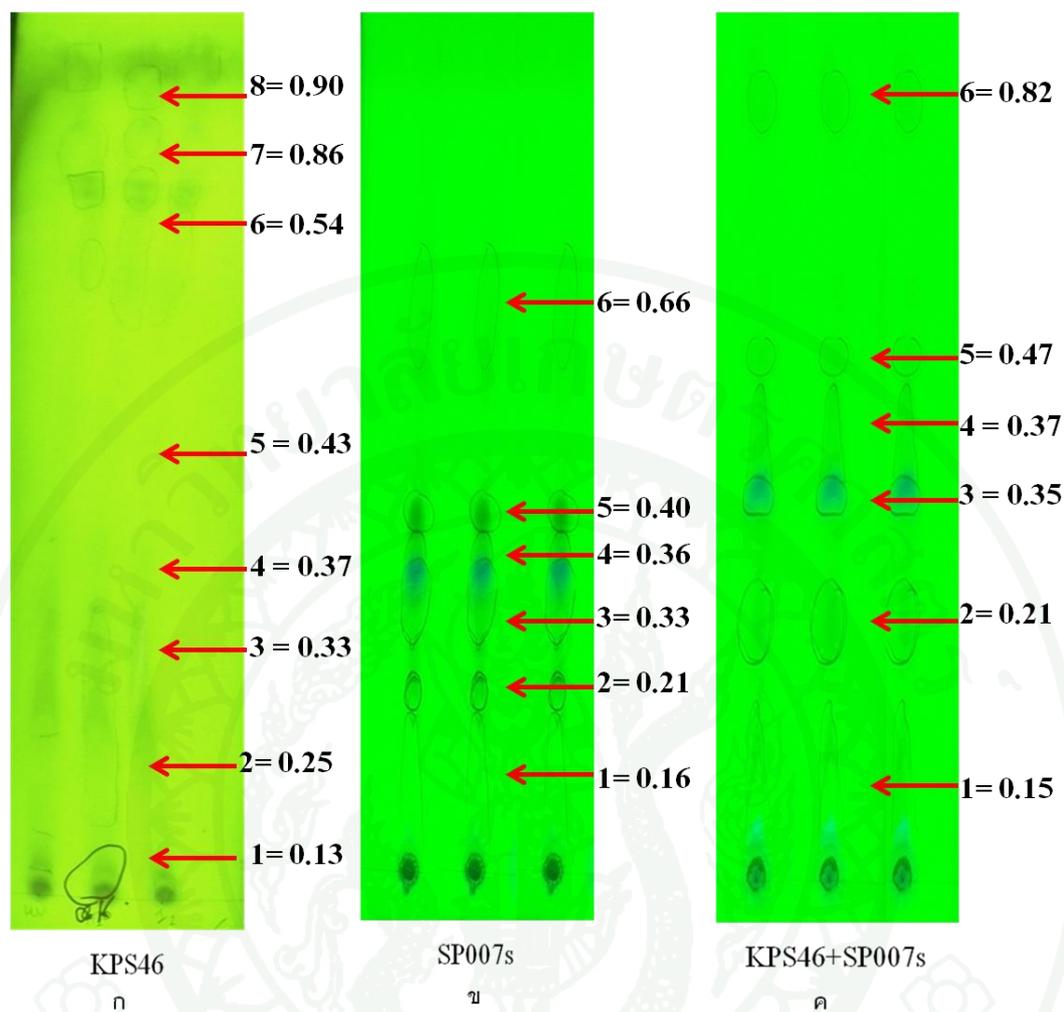
เมื่อทำการสกัดแถบสารแต่ละแถบล้างมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ด้วยวิธี agar diffusion พบว่าแถบสารที่ปรากฏมีทั้งคุณสมบัติ

การยับยั้งและไม่ยับยั้งเชื้อเป้าหมาย คือแถบสารที่ 1 ของ *B.amyloliquefaciens* KPS46, *P. fluorescens* SP007s และการเลี้ยงผสมระหว่าง *B.amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่ R_f 0.13 0.16 และ 0.15 ตามลำดับ ไม่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* แถบที่ 2 ที่ R_f 0.25 0.21 และ 0.21 มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ในทุกสภาวะการเลี้ยงแบบเดี่ยว และเชื้อผสม แถบที่ 3 ที่ R_f 0.33 0.33 และ 0.35 ให้ผลต่างกัน โดย R_f 0.33 (*B.amyloliquefaciens* KPS46) และ 0.33 (*P. fluorescens* SP007s) มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ แต่ที่ R_f 0.35 (*B.amyloliquefaciens* KPS46 + *P. fluorescens* SP007s) ยับยั้งไม่ได้ แถบที่ 4 ที่ R_f 0.37 0.36 และ 0.37 ตามลำดับ ให้ผลต่างกันโดยที่ R_f 0.37 (*B.amyloliquefaciens* KPS46) และ 0.37 (*B.amyloliquefaciens* KPS46 + *P. fluorescens* SP007s) มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ ส่วนที่ R_f 0.36 (*B.amyloliquefaciens* KPS46) ยับยั้งไม่ได้ แถบที่ 5 ที่ R_f 0.43 0.40 และ 0.47 ตามลำดับ ให้ผลต่างกันว่า R_f 0.43 (*B.amyloliquefaciens* KPS46) และ 0.40 (*P. fluorescens* SP007s) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* แต่ที่ R_f 0.47 (*B.amyloliquefaciens* KPS46 + *P. fluorescens* SP007s) ยับยั้งได้ แถบที่ 6 ที่ R_f 0.54 0.66 และ 0.82 ตามลำดับ ให้ผลต่างกันว่า R_f 0.54 (*B.amyloliquefaciens* KPS46) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* แต่ที่ R_f 0.66 (*P. fluorescens* SP007s) แถบที่ 7-8 ที่ R_f 0.86 และ 0.90 ตามลำดับของ *B.amyloliquefaciens* KPS46 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* และพบว่าแถบสารใหม่ที่ R_f 0.82 จากการเลี้ยงเชื้อผสม *B.amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสูงสุด มีบริเวณยับยั้งกว้าง 2.1 เซนติเมตร ซึ่งให้เห็นว่า เมื่อผสมเชื้อร่วมกันสามารถชักนำให้เกิดสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ได้ ซึ่งอาจเป็นผลจากการเจริญแข่งขันของเชื้อดังกล่าวในสภาวะอาหารจำกัดที่ทำให้เชื้อผลิตสารชนิดใหม่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมโรคพืช โดยสรุปคือ แถบที่ 2 3 และ 4 ของ *B.amyloliquefaciens* KPS46 สามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ แถบที่ 2 3 และ 6 ของ *P. fluorescens* SP007s สามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ และแถบที่ 2 4 5 และ 6 ของการเลี้ยงเชื้อผสมสามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ (ตารางที่ 16)

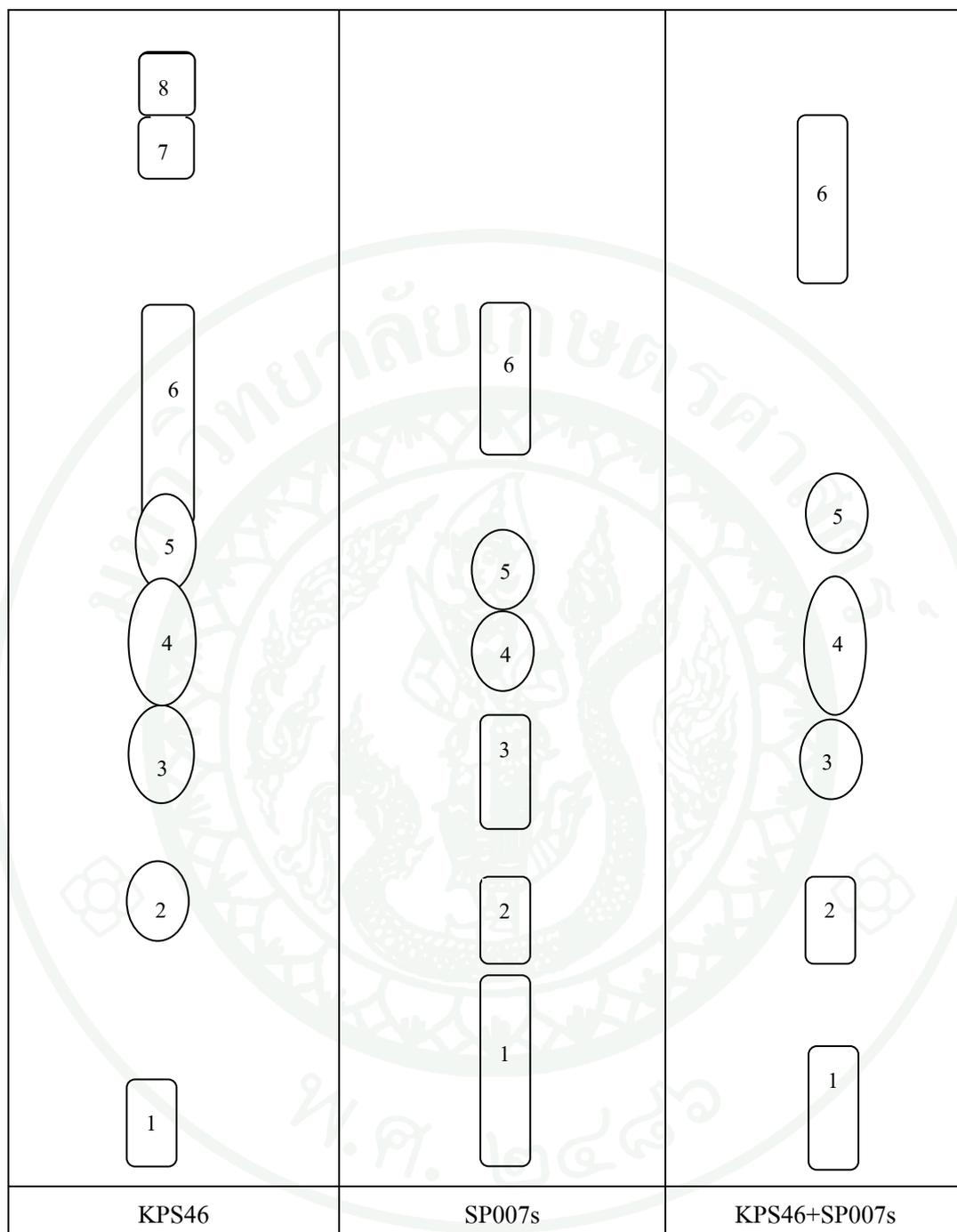
ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพของแถบสารสกัดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B.amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s แบบเชื้อเดี่ยวและแบบผสมที่แยกจากแผ่น TLC ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

แถบที่	สาร secondary metabolites จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกจากแผ่น TLC ^{1/}					
	KPS46		SP007s		KPS46+SP007s	
	ค่า R _f	บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)	ค่า R _f	บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)	ค่า R _f	บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)
1	0.13	0	0.16	0	0.15	0
2	0.25	1.1	0.21	1.8	0.21	1.8
3	0.33	1.8	0.33	1.5	0.35	0
4	0.37	1.7	0.36	0	0.37	1.7
5	0.43	0	0.40	0	0.47	1.4
6	0.54	0	0.66	1.2	0.82	2.1
7	0.86	0	-	-	-	-
8	0.90	0	-	-	-	-
Contro	80%	0	80%	-	80%	-
1	Ethanol		Ethanol		Ethanol	

^{1/} KPS46 = *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 แบบเชื้อเดี่ยว, SP007s = *Pseudomonas fluorescens* SP007s แบบเชื้อเดี่ยว และ KPS46+SP007s = การเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 และ *Pseudomonas fluorescens* SP007s



ภาพที่ 9 ตำแหน่งแถบสารบน TLC plate silica gel ที่ใช้แยกสาร secondary metabolites ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquifaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s แบบเดี่ยว (ก และ ข) และแบบผสม (ค)



ภาพที่ 10 ภาพจำลองแถบสาร secondary metabolites ที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยว *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s และแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม 2 สายพันธุ์ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 โดยวิธี Thin-layer Chromatography

6. การพัฒนาสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสมหลายสายพันธุ์ และการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช

6.1 สูตรอาหารเพิ่มปริมาณ

การศึกษานิตและส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ โดยดัดแปลงจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการคือ nutrient glucose broth (NGB) เพื่อใช้เป็นส่วนผสมอาหารเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะ โดยมีการปรับสภาวะการเลี้ยงตามรายละเอียดในอุปกรณ์และวิธีการข้อ 6.1 พบว่าสูตรอาหาร VS medium ที่มีส่วนผสมของกากน้ำตาล vinasses และกากถั่วเหลือง อัตราส่วนผสมเท่ากับ 10 : 10 (กรัม/กรัม) ที่ผสมในน้ำ 1 ลิตร ที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s แบบเดี่ยวและแบบผสมมีอัตราการเพิ่มปริมาณของประชากรเชื้อสูงที่สุด จากการตรวจสอบประชากรเชื้อหลังเลี้ยงเชื้อที่ 24 ชั่วโมง โดยมีประชากรเชื้อที่ 10^{19} - 10^{22} cfu/มิลลิลิตร (ตารางที่ 18) ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะด้วยสูตรอาหารดัดแปลง MS medium ตามวิธีการของชัยสิทธิ์ และสุทธฤดี (2548) ที่มีส่วนผสมของกากน้ำตาล (molasses) และกากถั่วเหลือง และอาหารสังเคราะห์ NGB ที่เวลาเลี้ยงเชื้อและสภาวะเลี้ยงเชื้อเดียวกัน มีประชากรเชื้อที่ตรวจพบน้อยกว่า โดยมีประชากรเชื้อเฉลี่ยที่ 10^{18} - 10^{20} cfu/มิลลิลิตร ในสภาวะการเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว และแบบเชื้อผสม 2 สายพันธุ์ตามลำดับ ทั้งนี้การนำเชื้อดังกล่าว คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s มาเลี้ยงร่วมกันในอาหาร VS medium พบว่าอัตราการเจริญของประชากรเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s มีปริมาณสูงสุด เท่ากับ 3.2×10^{22} และ 2.4×10^{22} cfu/ มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 17 และภาพที่ 11)

เมื่อนำผลการทดสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมดังกล่าวมาทำการศึกษานิตเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหาร VS medium ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และสภาวะอุณหภูมิเลี้ยงเชื้อต่างๆ พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s สัดส่วน 9:1 สามารถเจริญได้ดีในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ VS medium ที่ผสมส่วนผสมกากน้ำตาล vinasses และกากถั่วเหลือง อัตราส่วนผสมเท่ากับ 10 : 10 (กรัม/กรัม) ที่ผสมในน้ำ 1 ลิตร ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 โดยมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s เฉลี่ย เท่ากับ 3.2×10^{22} และ 2.4×10^{22} cfu / มิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 19)

ส่วนการทดสอบปัจจัยด้านอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s พบว่าอาหาร VS medium ที่ค่า pH เท่ากับ 7 และปรับสภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิในช่วง 25- 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เซลล์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s สามารถเพิ่มปริมาณได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง โดยที่ *B. amyloliquefaciens* KPS46 มีประชากรอยู่ในช่วงเฉลี่ยเท่ากับ 3.0×10^{22} – 3.4×10^{24} cfu/ มิลลิลิตร และ *P. fluorescens* SP007s มีประชากรอยู่ในช่วงเฉลี่ยเท่ากับ 2.0×10^{22} – 2.6×10^{24} cfu/ มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงที่สภาพอุณหภูมิ 30 -35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ตารางที่ 19)

นอกจากนี้ยังพบว่า อาหารเหลวทดสอบแต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อการกระตุ้นการผลิตสาร secondary metabolite ที่แตกต่างกัน โดยผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ของแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 ด้วยวิธี agar diffusion โดยการนำสารกรองเซลล์จากอาหารเพิ่มปริมาณ VS medium ที่ปรับ pH เท่ากับ 7 และปรับเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนได้ดีที่สุดมีค่าความกว้างบริเวณยับยั้งเท่ากับ 2.2 เซนติเมตร รองลงมาคือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ KPS46 แบบสายพันธุ์เดี่ยวโดยมีขนาดความกว้างของบริเวณยับยั้ง 2.0 เซนติเมตร และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร NGB พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s สัดส่วน 9:1 สามารถยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ดีที่สุด มีขนาดความกว้างของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.8 เซนติเมตร รองลงมาคือแบคทีเรียปฏิปักษ์ KPS46 และ SP007s แบบสายพันธุ์เดี่ยวโดยมีขนาดความกว้างของบริเวณยับยั้ง 1.7 เซนติเมตร (ตารางที่ 20) แสดงว่าอาหารเหลว VS medium มีศักยภาพในการกระตุ้นการผลิตสาร secondary metabolites ได้ดีที่สุดมีขนาดความกว้างของบริเวณยับยั้งได้ดีกว่าอาหารเหลว NGB

ตารางที่ 17 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยวและสายพันธุ์ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณสูตรต่างๆ

กรรมวิธี ^{3/}	จำนวนประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (cfu/มิลลิลิตร) ^{1/}					
	สูตรอาหารเพิ่มปริมาณ ^{2/}					
	V	VS	M	MS	กากถั่วเหลือง	NGB
1. KPS46	3.0×10^{17}	3.2×10^{19}	1.6×10^{17}	3.0×10^{18}	2.9×10^{16}	2.0×10^{18}
2.SP007s	3.7×10^{17}	3.6×10^{19}	1.3×10^{17}	1.5×10^{18}	2.2×10^{16}	2.2×10^{18}
3.KPS46 + SP007s (9:1)						
:KPS46	3.0×10^{18}	3.2×10^{22}	1.5×10^{17}	3.3×10^{20}	2.2×10^{18}	2.7×10^{20}
:SP007s	2.7×10^{18}	2.4×10^{22}	1.2×10^{17}	2.9×10^{20}	1.7×10^{18}	2.1×10^{20}

^{1/} การเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^8 cfu/มิลลิลิตร ที่เจริญในอาหารเพิ่มปริมาณ ตรวจสอบจำนวนเซลล์เมื่อเลี้ยงบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง

^{2/} V = กากน้ำตาล Vinasses, VS = กากน้ำตาล Vinasses + กากถั่วเหลือง, M = Molasses, MS = Molasses + กากถั่วเหลือง และ NGB = nutrient glucose broth

^{3/} KPS46 = *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 และ SP007s = *Pseudomonas fluorescens* SP007s

ตารางที่ 18 อัตราการเจริญของเชื้อปฏิภักย์สายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s (อัตรา 9:1) ในสูตรอาหารดัดแปลง VS medium ที่มีส่วนผสมของ Vinasses และกากถั่วเหลืองแตกต่างกัน

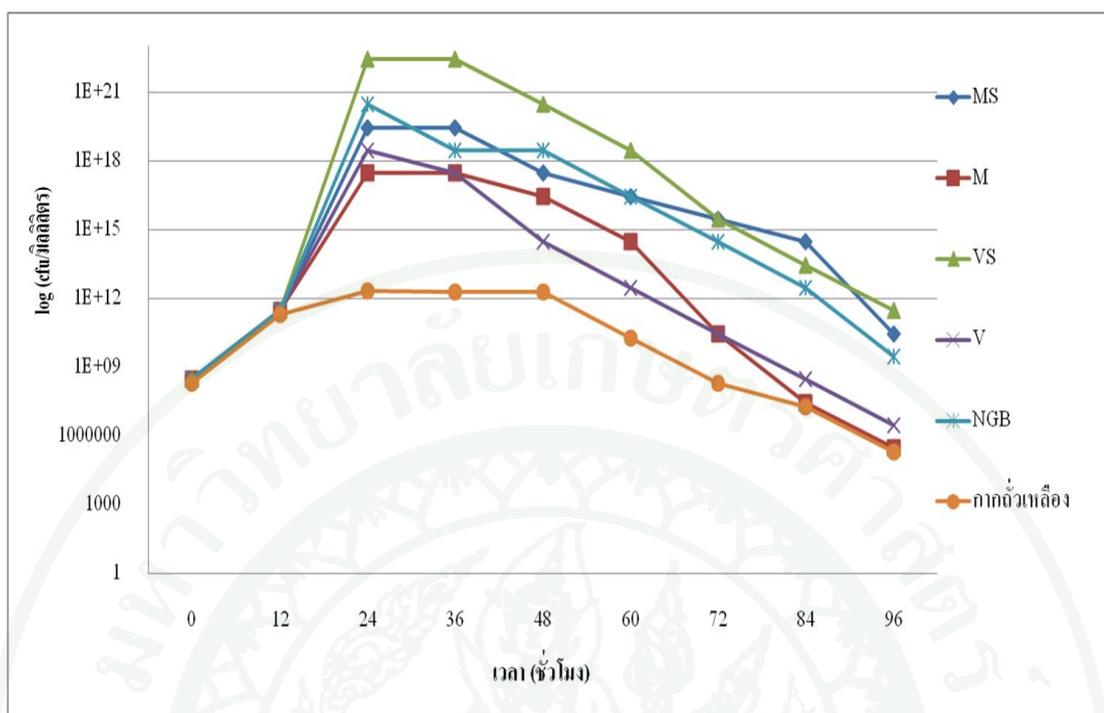
อัตราส่วน กากถั่วเหลือง : vinasse ^{2/}	จำนวนประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิภักย์ (cfu/มิลลิลิตร) ^{1/}					
	เวลา (ชั่วโมง)					
	0	6	12	18	24	30
0:10	1X10 ⁸	3X10 ⁹	2.7X10 ¹⁰	2X10 ¹³	2X10 ¹⁷	1.7X10 ¹⁷
1.25:10	1X10 ⁸	3X10 ⁹	3X10 ¹¹	2.7X10 ¹⁶	2.5X10 ¹⁹	2.1X10 ¹⁹
2.5:10	1X10 ⁸	3X10 ⁹	3X10 ¹³	2.5X10 ¹⁶	2.5X10 ¹⁹	2.3X10 ¹⁹
5:10						
10:10	1X10 ⁸	3X10 ¹¹	3X10 ¹³	3X10 ¹⁹	3X10 ²²	3X10 ²²
10:0	1X10 ⁸	2X10 ⁹	2.4X10 ¹⁰	2.3X10 ¹³	2.2X10 ¹⁸	2X10 ¹⁹
10:1.25	1X10 ⁸	3X10 ¹¹	3X10 ¹¹	2.5X10 ¹⁶	2X10 ¹⁹	1.7X10 ¹⁹
10:2.5	1X10 ⁸	3X10 ¹²	3X10 ¹³	2.6X10 ¹⁷	2.3X10 ¹⁹	1.9X10 ¹⁹
10:5	1X10 ⁸	3X10 ¹²	3X10 ¹³	2.9X10 ¹⁷	2.6X10 ¹⁹	2X10 ¹⁹
NGB	1X10 ⁸	3X10 ¹¹	3X10 ¹³	1.9X10 ¹⁸	2X10 ²⁰	2X10 ²⁰
MS-medium	1X10 ⁸	3X10 ¹⁰	2.3X10 ¹²	2.7X10 ¹⁷	3X10 ²⁰	2.5X10 ¹⁹

^{1/} = ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตรวจนับจำนวนเซลล์เมื่อบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง บนอาหารที่ผสมสารปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรียปฏิภักย์ต่างสายพันธุ์ต้านทานและบ่มเชื้อภายใต้อุณหภูมิห้อง ^{2/} = อัตราส่วนของอาหาร VS medium ที่ประกอบด้วย กากน้ำตาล vinasses : กากถั่วเหลือง ในน้ำ 1 ลิตร เพื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิภักย์

ตารางที่ 19 ปัจจัยความเป็นกรด – ค่า และอุณหภูมิระดับต่างกันในระยะการบ่มเชื้อ 24 ชั่วโมงที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s (อัตรา 9:1) ในสูตรอาหาร VS medium

ปัจจัยทดสอบ		ประชากรเชื้อ (cfu/มิลลิลิตร) ^{1/}	
		KPS46	SP007s
กรด-ค่า (pH)	5	2.3X10 ¹⁴ d	2.7X10 ¹⁴ d
	6	2.7X10 ¹⁶ c	3.0X10 ¹⁶ c
	7	3.2X10 ²² a	2.4X10 ²² a
	8	2.6X10 ¹⁷ b	3.0X10 ¹⁷ b
อุณหภูมิ (°C)	25	3.4X10 ²⁴ a	2.6X10 ²⁴ a
	30	3.0X10 ²² a	2.0X10 ²² a
	35	2.8X10 ²⁰ b	2.6X10 ²⁰ b
	40	2.1X10 ²⁰ b	2.3X10 ²⁰ b

^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ P= 0.05 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range test (DMRT); ตรวจสอบจำนวนเซลล์เมื่อบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 11 อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s (อัตรา 9:1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ VS medium เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ MS และ NGB ที่อายุการเลี้ยงเชื้อ 0 – 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 20 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ในสูตรเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในวัสดุผสมสูตรต่าง ๆ

กรรมวิธี ^{1/}	บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)					
	MS ^{2/}	M ^{2/}	VS ^{2/}	V ^{2/}	กากถั่วเหลือง	NB ^{2/}
1.KPS46	1.7b	1.4a	2.0b	1.2a	0	1.7b
2.SP007s	1.6c	1.2b	1.8c	1.1b	0	1.7b
3.SW01/4	0.5d	0.2d	0.5d	0.2c	0	1.1c
4.SPt360	0e	0e	0e	0d	0	0d
5.KPS46 + SP007s	1.9a	0.4c	2.2a	1.2a	0	1.8a

^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ P=0.05 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

^{2/} V = กากน้ำตาล Vinasse , VS = กากน้ำตาล Vinasse และกากถั่วเหลือง, M = กากน้ำตาล, MS = กากน้ำตาล และกากถั่วเหลือง และ NB = nutrient broth

6.2 การพัฒนาสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสม 2 สายพันธุ์

การคัดเลือกชนิดสารพา สารเสริมประสิทธิภาพ และการใช้อัตราส่วนที่เหมาะสมต่อความมีชีวิตรอด และประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะผสมในสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่พัฒนาขึ้น พบว่า สารพา kaolin ที่มีส่วนผสมของสารเสริมประสิทธิภาพ ได้แก่ น้ำตาลทราย + SiO_2 + CMC + CaCO_3 + FeSO_4 + deshecofix เป็นส่วนผสมของสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพที่เหมาะสมที่สุดในการรักษาความมีชีวิตรอดของเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s โดยสามารถเก็บรักษานานที่สุด 12 เดือน โดยให้ผลการทดสอบในการเก็บรักษาความมีชีวิตรอดของ (viability) ประชากรเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 เติบโตเท่ากับ 3.4×10^{13} และ 2.2×10^{13} cfu/ มิลลิลิตร โดยการตรวจสอบบนอาหาร NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแต่ละสายพันธุ์ต้านทาน สูตรสำเร็จดังกล่าวมีค่าการละลายน้ำก่อนพบใบกล้วยแห้งฝักสดเท่ากับระดับที่ 1 ซึ่งเป็นระดับที่ดีที่สุด เนื่องจากผงสูตรสำเร็จสามารถกระจายตัวได้ดีในน้ำและไม่ตกตะกอนหลังผสมน้ำซึ่งเป็นการช่วยให้แบคทีเรียเป้าหมายกระจายครอบคลุมเมื่อพ่นลงผิวพืช ซึ่งจากการประเมินพบว่าสารพาดังกล่าวละลายน้ำทันทีในเวลา 1-5 นาที (ตารางที่ 21 และ ภาพที่ 12)

การทดสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพในการผลิตสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 พบว่าอัตราส่วนของ kaolin + น้ำตาลทราย + SiO_2 + CMC + CaCO_3 + FeSO_4 + deshecofix ที่อัตราส่วน 70: 15 : 5 : 5 : 1 : 2 : 2 เป็นอัตราส่วนที่ให้ผลการประเมินผลในทุกด้านที่ดีที่สุด โดยการตรวจสอบประชากรเชื้อที่อายุเก็บรักษาที่ 12 เดือน พบว่ามีประชากร *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s เท่ากับ 2.6×10^{10} และ 1.4×10^{10} cfu/ มิลลิลิตร ตามลำดับ การประเมินผลทางด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้วยแห้งฝักสด พบว่าการใช้สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสมในอัตราส่วนดังกล่าว คลุกเมล็ดก่อนปลูก (5 กรัม/ เมล็ดกล้วยแห้ง 1 กิโลกรัม) มีอัตราการเจริญและพัฒนารากทางด้านลำต้นดี สามารถส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโตทางด้านความสูงต้นและความยาวรากของต้นกล้วยแห้งฝักสดอายุ 14 วัน เท่ากับ 20 และ 26 เซนติเมตร และจำนวนรากแขนง เท่ากับ 35 ราก ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีการที่ใช้สูตรสำเร็จที่อัตราส่วนอื่นมีผลด้อยกว่าอย่างชัดเจน (ตารางที่ 22)

ตารางที่ 21 ประสิทธิภาพของสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพในการผลิตสูตรสำเร็จที่ผลต่อความมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s

สูตร	สารพา	ความมีชีวิตรอด (cfu/มิลลิลิตร) ^{1/}		การละลายน้ำ ^{3/}
		KPS46 ^{2/}	SP007s ^{2/}	
1.	Kaolin	3.2X10 ¹¹ c	2.6X10 ¹¹ c	3
2.	Talcum	3.0X10 ¹¹ c	2.1X10 ¹¹ c	3
3.	CaCO ₃	2.8X10 ¹¹ c	2.2X10 ¹¹ c	4
4.	Silicon	2.6X10 ¹⁰ d	2.3X10 ¹¹ c	4
5.	Talcum + น้ำตาลทราย	2.0X10 ¹⁰ d	2.3X10 ¹⁰ d	4
6.	Kaolin + น้ำตาลทราย	2.2X10 ¹⁰ d	2.4X10 ¹⁰ d	4
7.	Talcum + น้ำตาลทราย + CMC	2.3X10 ¹⁰ d	2.5X10 ¹⁰ d	3
8.	Kaolin + น้ำตาลทราย + CMC	3.1X10 ¹² b	2.7X10 ¹² b	3
9.	Talcum + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃	3.1 X 10 ¹¹ c	2.8X10 ¹¹ c	3
10.	Kaolin + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃	3.3X10 ¹¹ c	2.8X10 ¹¹ c	3
11.	Talcum + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄	2.8X10 ¹² b	2.1X10 ¹² b	3
12.	Kaolin + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄	2.7X10 ¹² b	2.2X10 ¹² b	3

ตารางที่ 21 (ต่อ)

สูตร	สารพา	ความมีชีวิตรอด (cfu/มิลลิลิตร) ^{1/}		การละลายน้ำ ^{3/}
		KPS46 ^{2/}	SP007s ^{2/}	
13.	Talcum + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄ + deshecofix	2.8.X10 ¹¹ c	2.3X10 ¹¹ c	2
14.	Kaolin + น้ำตาลทราย + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄ + deshecofix	2.7X10 ¹² b	2.2X10 ¹² b	3
15.	Talcum + น้ำตาลทราย + silicon + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄ + deshecofix	2.7X10 ¹³ a	2.4X10 ¹³ a	2
16.	Kaolin + น้ำตาลทราย + silicon + CMC + CaCO ₃ + FeSO ₄ + deshecofix	3.6X10 ¹³ a	3.1X10 ¹³ a	1

^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ P=0.05 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

^{2/} แบคทีเรียปฏิสัมพันธ์สายพันธุ์ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 ตรวจสอบจำนวนบนอาหาร NA ที่ติดสารปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์ต่างสายพันธุ์

^{3/} การประเมินการละลายน้ำโดยใช้เกณฑ์ในรายละเอียดอุปกรณ์และวิธีการข้อ 6.2

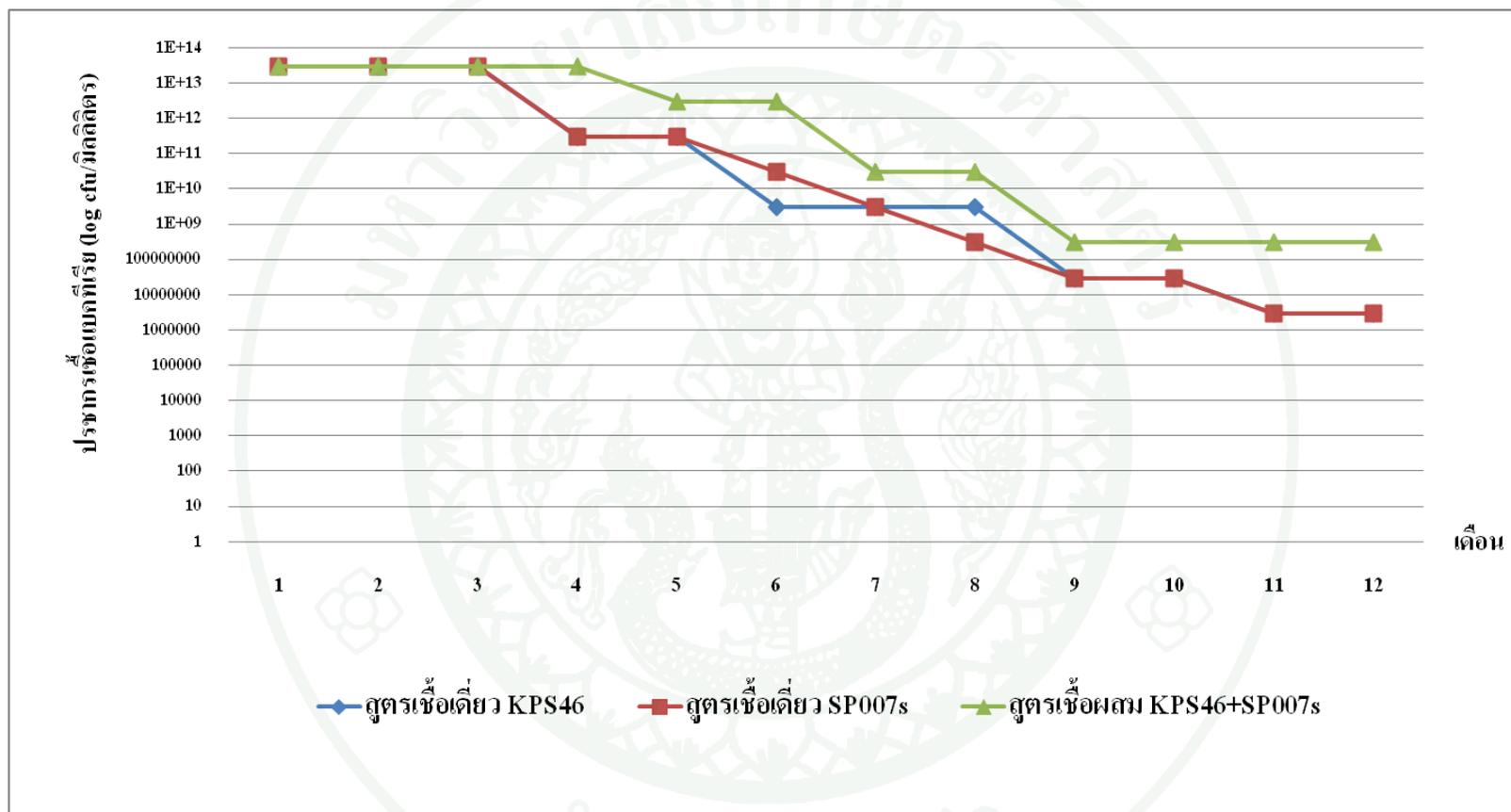
ตารางที่ 22 ประสิทธิภาพของสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพในสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิบั้กษาในอัตราส่วนต่างๆ ต่อการมีชีวิตรอดของ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s และประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการควบคุมโรคใบจุดบนถั่วเหลืองในสภาพเรือนทดลอง

อัตราส่วนสารพา และสารเสริมประสิทธิภาพ ^{1/}	อัตราการเจริญเติบโต ^{2/}			การควบคุมโรค ^{2/}		ชีวิตรอดเซลล์เชื้อ (cfu/มิลลิลิตร) ^{1/}
	ความสูงต้น	ความยาวราก	จำนวนรากแขนง	การลดโรค (%)	ความรุนแรง	
1. 60:20:5:5:3:3:4	16e	21e	28d	72d	2	2X10 ¹⁰ c
2. 65:15:5:5:4:3:3	19b	22d	26e	74b	2	2X10 ¹⁰ c
3. 70:15:5:5:1:2:2	20a	26a	35a	86a	1	3X10 ¹³ a
4. 75:20:1:1:1:1:1	17d	24c	30c	74b	2	3X10 ¹¹ b
5. 80:10:3:3:1:1:2	18c	25b	32b	73c	2	2X10 ¹¹ b
6. 100:0:0:0:0:0:0	13f	17f	21f	57e	3	1X10 ⁹ d
CV (%)	14.47	14.54	17.04	17.09	-	-

^{1/} ส่วนผสมของสารพา และสารเสริมประสิทธิภาพประกอบด้วย Kaolin + น้ำตาลทราย + Silicon + CMC + CaCO₃ + FeSO₄ + Deshecofix

^{2/} ประเมินอัตราการเจริญเติบโตถั่วเหลืองปักสดและความรุนแรงของโรคที่อายุถั่วเหลืองปักสด 28 วัน ตามวิธีการข้อ 6.2 ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับ P=0.05 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range test (DMRT)

^{3/} ความมีชีวิตรอดของเซลล์แบคทีเรียโดยตรวจพบจากผงสูตรสำเร็จแต่ละสูตรที่อายุการเก็บรักษา 12 เดือน



ภาพที่ 12 อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์แบคทีเรียปฏิไภยในสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิไภยแบบผสมและแบบเชื้อเดี่ยวที่อายุการเก็บ 12 เดือน ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง

6.3 การทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม

6.3.1 การประเมินประสิทธิภาพสูตรสำเร็จในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพสูตรผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ด้วยวิธี paper disc ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการละลายผงสูตรสำเร็จในน้ำสะอาดปลอดเชื้อและหยดลงบน paper disc และวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนบ่มเชื้อ 24 ชั่วโมง พบว่าสูตร *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 มีบริเวณยับยั้งเชื้อเป้าหมายมากที่สุดเท่ากับ 1.6 เซนติเมตร เปรียบเทียบกับสูตร SP007s และสูตร KPS46 แบบเชื้อเดี่ยวมีประสิทธิภาพน้อยกว่าโดยมีขนาดความกว้างบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.4 และ 1.3 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 23)

6.3.2 ประสิทธิภาพสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนในระดับเรือนทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดผงในเรือนทดลอง โดยกรรมวิธีคลุกเมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูกที่อัตรา 5 กรัมต่อเมล็ดถั่วเหลือง 1 กิโลกรัม และพ่นตาม 3 ครั้ง โดยใช้อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 80 ลิตร ที่อายุ 14 21 และ 28 วัน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สูตร *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ สูตร *P. fluorescens* SP007s แบบเดี่ยว (ISR-P และ ISR-B) และกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี (copper hydroxide) และกรรมวิธีที่ไม่มีการใส่ปัจจัยใดๆ และมีการปลูกเชื้อโรคใบจุดนูนที่อายุถั่วเหลือง 35 วัน ผลการทดลองพบว่า สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบผสมสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s สัดส่วน 9:1 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตทางด้านความสูงต้น ความยาวราก และจำนวนรากแขนงถั่วเหลืองฝักสดได้ดีที่สุดเท่ากับ 38.5 เซนติเมตร 20.5 เซนติเมตร และ 32 ราก ตามลำดับ และแตกต่างกับการใช้สูตร *B. amyloliquefaciens* KPS46 (ISR-B) และสูตร *P. fluorescens* SP007s (ISR- P) และให้ผลดีกว่าการใช้สารเคมี และกรรมวิธีที่ไม่มีการใส่ปัจจัยใดๆ นอกจากนี้สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบผสมสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคใบจุดนูนได้ 85% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี และกรรมวิธีที่ไม่มีการใส่ปัจจัยใดๆ โดยเกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีการใช้สูตร ISR-B สูตร ISR- P

และกรรมวิธีใช้สารเคมีลดความรุนแรงของการเกิดโรครุนแรง 78, 78 และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 23 ประสิทธิภาพสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบเดี่ยวและเชื้อผสมที่พัฒนาในการยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดนูน ในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc

กรรมวิธี	บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร) ^{1/}
1. สูตร KPS46 (ISR-B)	1.4b
2. สูตร SP007s (ISR-P)	1.3c
3. สูตรสำเร็จเชื้อผสม KPS46+SP007s	1.6a
4. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	0d
5. Copper hydroxide	1.3c

^{1/} ค่าเฉลี่ยของความกว้างบริเวณใสจากการทดลอง 4 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $P=0.05$ เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS version 15

ตารางที่ 24 ประสิทธิภาพสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และการควบคุมโรคใบจุดนูน ระดับเรือนทดลอง^{1/}

กรรมวิธี ^{2/}	การเจริญเติบโต ^{2/}			การควบคุมโรคใบจุดนูน ^{3/}	
	ความสูงต้น (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนรากแขนง (ราก)	ระดับการลดโรค (%)	ระดับความรุนแรง โรค
1. ISR-B [®]	33.8 c	18.5 b	27.0 b	78 b	2
2. ISR-P [®]	34.1 b	18.4 b	26.0 c	78 b	2
3. สูตรสำเร็จเชื้อผสม KPS46+ SP007s	38.1 a	20.5 a	32.0 a	85 a	2
4. cell-suspension KPS46	28.2 f	15.4 e	21.2 e	72 d	3
5. cell-suspension SP007s	27.2 g	16.5 d	19.8 g	72d	3
6. cell-suspension เชื้อผสม KPS46+ SP007s	29.6 e	17.1 c	23.5 d	75 c	3
4. กรรมวิธีควบคุม (น้ำเปล่าหนึ่งฆ่าเชื้อ)	24.9 h	12.6 f	14.0 h	0 e	4
5. Chemical control	32.5 d	16.1 d	20.0 f	72 d	3
CV (%)	13.9	14.1	23.9	40.9	-

^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ P=0.05 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range test (DMRT)

^{2/} ISR-B = สูตรสำเร็จเชื้อเดี่ยว *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ ISR-P = สูตรสำเร็จเชื้อเดี่ยว *P. fluorescens* SP007s ของภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

^{3/} อัตราการเจริญเติบโตทางด้านความสูงต้น ยาวราก จำนวนรากแขนง ความรุนแรงโรค ประเมินที่อายุ 42 วัน หลังปลูก ตามรายละเอียดตามวิธีการข้อ 6.3

6.3.3 ประสิทธิภาพสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบสายพันธุ์ผสมในระดับไร่

6.3.3.1 ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต การเพิ่มพูนคุณภาพและปริมาณของถั่วเหลืองฝักสด

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ ในแปลงปลูกถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ No.75 สภาพไร่ ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา พบว่ากรรมวิธีการใช้สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s (อัตราส่วน 9:1) คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วยอัตรา 5 กรัมต่อเมล็ดถั่วเหลือง 1 กิโลกรัม และพ่นใบ 3 ครั้ง อัตราส่วน 20 กรัม ต่อน้ำ 80 ลิตร (14 21 และ 28 วัน หลังปลูก) พบว่า สูตรสำเร็จ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s สัดส่วน 9:1 (กรรมวิธีที่ 3) มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ส่งเสริมคุณภาพและปริมาณของต้นถั่วเหลืองฝักสดได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับวิธีการใช้สูตร *B. amyloliquefaciens* KPS46 แบบเดี่ยว (ISR-B) (กรรมวิธีที่ 1), *P. fluorescens* SP007s แบบเดี่ยว (ISR-P) (กรรมวิธีที่ 2) และกรรมวิธีการใช้สารเคมี (กรรมวิธีที่ 5) โดยกรรมวิธีใช้สูตรสำเร็จ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตทางด้านความสูงต้นเท่ากับ 50.6 เซนติเมตร จำนวนข้อ 4 ข้อ และจำนวนกิ่ง 7 กิ่ง จากการประเมินที่อายุ 65 วัน รองลงมาคือ สูตร *B. amyloliquefaciens* KPS46 (ISR-B) และ *P. fluorescens* SP007s (ISR-P) ที่มีความสูงต้น เท่ากับ 48.2 และ 47.8 เซนติเมตร ตามลำดับ จำนวนข้อ 3 ข้อเท่ากัน และจำนวนกิ่ง 5 และ 6 กิ่ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้สารเคมีอย่างเดียวที่มีความสูงต้น 45.0 เซนติเมตร จำนวนข้อ 3 ข้อ และจำนวนกิ่ง 6 กิ่ง และกรรมวิธีที่ไม่มีการใช้สูตรจุลินทรีย์ (control) ที่มีความสูงต้น 43.3 เซนติเมตร จำนวนข้อ 3 ข้อ และจำนวนกิ่งเท่ากับ 6 กิ่ง

นอกจากนี้ยังพบว่ากรรมวิธีการใช้สูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมดังกล่าว (กรรมวิธีที่ 3) ยังมีศักยภาพสูงในการเพิ่มพูนปริมาณและคุณภาพของผลผลิตถั่วเหลืองฝักสดด้วยสอดคล้องกับระดับการเจริญเติบโตด้านลำต้น กรรมวิธีการคลุกเมล็ดก่อนปลูก ร่วมกับการพ่น 3 ครั้ง ด้วยสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 1,552 กิโลกรัมต่อไร่ มีฝักดีคุณภาพสูงที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน 1,171.3 กิโลกรัมต่อไร่ คิดเป็น 85.7 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั้งหมด และรองลงมาที่พบว่า กรรมวิธีการใช้สูตรจุลินทรีย์สูตร *B. amyloliquefaciens* KPS46

แบบสายพันธุ์เดี่ยว (ISR-B) คลุกเมล็ดและพ่นใบถี่เหลือ 3 ครั้ง ที่ให้ผลผลิตต่อไร่รวม 1,400 กิโลกรัมต่อไร่ แต่กลับมีผลผลิตคุณภาพดีตามมาตรฐานสูง คือ 1.117.3 กิโลกรัมต่อไร่ คิดเป็น 79.8 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั้งหมด (ตารางที่ 25) แสดงให้เห็นว่า *B. amyloliquefaciens* KPS46 มีศักยภาพสูงในการเพิ่มพูนคุณภาพผลผลิต อย่างไรก็ตามพบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สูตรจุลินทรีย์ในระบบการปลูก (กรรมวิธีที่ 1-3) ให้ผลในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มคุณภาพผลผลิตถี่เหลือได้ดีกว่า กรรมวิธีการใช้สารเคมี (copper hydroxide) และกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแทน



ตารางที่ 25 ประสิทธิภาพของการใช้สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมคลุกเมล็ดและพ่นใบถั่วเหลืองฝักสดต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มพูนปริมาณผลผลิตของถั่วเหลืองฝักสดในสภาพไร่^{1/}

กรรมวิธี ^{2/}	อัตราการเจริญเติบโต ^{3/}			ผลผลิตรวม ^{3/}		
	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนข้อ	จำนวนกิ่ง	น้ำหนักรวม (กิโลกรัม/ไร่)	น้ำหนักฝักดี (กิโลกรัม/ไร่)	น้ำหนักฝักดี (%)
1. สูตรเชื้อเดี่ยว KPS46 (ISR-B)	48.2b	3b	5c	1400e	1117.3b	79.8b
2. สูตรเชื้อเดี่ยว SP007s (ISR-P)	47.8b	3b	6b	1421d	946.7c	66.6c
3. สูตรสำเร็จเชื้อผสม KPS46+SP007s	50.6a	4a	7a	1552a	1171.3a	85.7a
4. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	43.3d	3b	5c	1528b	504.0e	32.9e
5. Copper hydroxide	45.0c	3b	6b	1520c	810.7d	53.3d
%CV	33.7	17.4	12.9	4.6	29.5	33.4

^{1/} ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ P=0.05 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range test (DMRT)

^{2/} KPS46= *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 และ SP007s = *Pseudomonas fluorescens* SP007; วิธีการใช้คือการคลุกเมล็ดก่อนปลูกและพ่น 3 ครั้ง ที่อายุ 15, 30 และ 45 วัน

^{3/} อัตราการเจริญทางลำต้น และผลผลิตประเมินที่อายุเก็บเกี่ยว 65 วัน

ตารางที่ 26 ประสิทธิภาพของการใช้สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสมคลุกเมล็ดและพ่นใบถั่วเหลืองฝักสดต่อการส่งเสริมคุณภาพผลผลิตถั่วเหลืองฝักสดในระดับไร่^{1/}

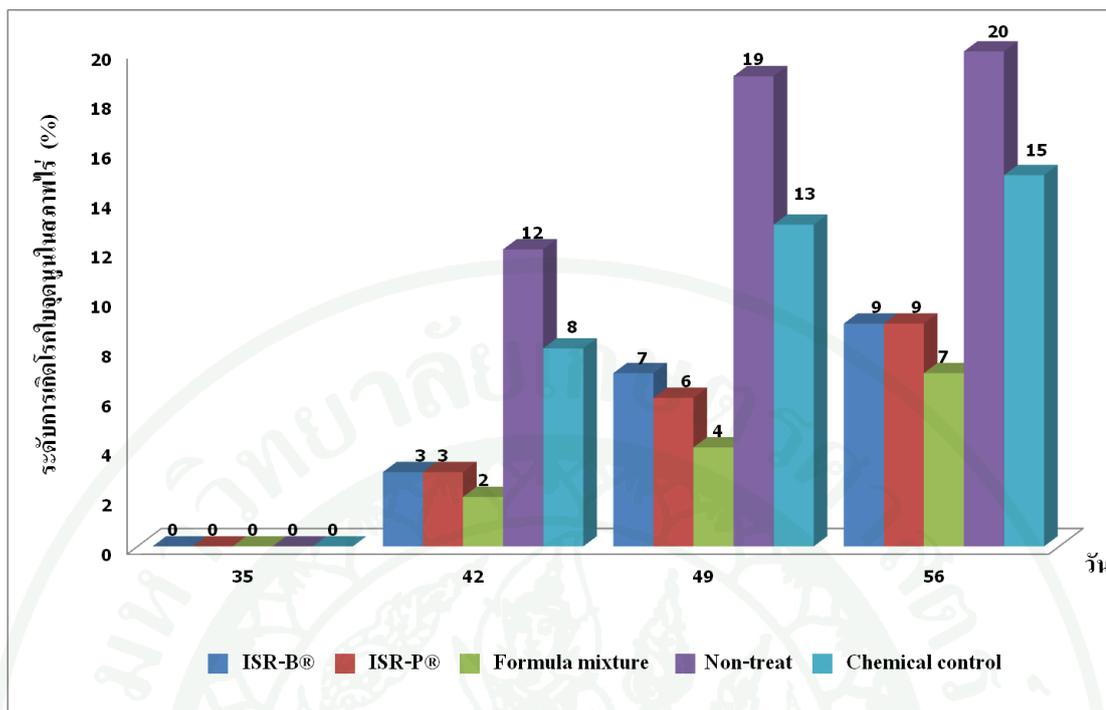
กรรมวิธี ^{2/}	คุณภาพฝัก 2 เมล็ด			คุณภาพฝัก 3 เมล็ด		
	ความกว้างฝัก (ซม.)	ความยาวฝัก (ซม.)	ความหนาฝัก (ซม.)	ความกว้างฝัก (ซม.)	ความยาวฝัก (ซม.)	ความหนาฝัก (ซม.)
1. สูตรเชื้อเดี่ยว KPS46 (ISR-B)	1.3a	5.4b	0.7b	1.3a	6.6b	0.7b
2. สูตรเชื้อเดี่ยว SP007s (ISR-P)	1.3a	5.4b	0.7b	1.3a	6.6b	0.7b
3. สูตรสำเร็จเชื้อผสม KPS46+SP007s	1.3a	5.9a	0.9a	1.3a	6.8a	0.9a
4. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	1.2b	4.7d	0.6c	1.3a	5.9d	0.7b
5. Copper hydroxide	1.3a	5.0c	0.7b	1.3a	6.4c	0.7b
%CV	3.5	8.6	15.2	0	5.3	12.1

^{1/} ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ P=0.05 เมื่อวิเคราะห์ด้วย Duncan's New Multiple Range test (DMRT)

^{2/} KPS46= *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 และ SP007s = *Pseudomonas fluorescens* SP007s; วิธีการใช้คือการคลุกเมล็ดก่อนปลูกและพ่น 3 ครั้ง ที่อายุ 15, 30 และ 45 วัน

6.3.3.2 ประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบจุดนูนของถั่วเหลืองฝักสด

ผลการประเมินระดับความรุนแรงของโรคใบจุดนูนของถั่วเหลือง พบว่าระดับการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับช่วงอายุของถั่วเหลือง โดยจากการติดตามการเกิดโรคไม่พบการระบาดของโรคในช่วงอายุปลูกที่ 0-35 วัน และเริ่มพบการเกิดโรคที่อายุปลูก 42 วัน ที่เป็นช่วงที่ถั่วเหลืองเริ่มออกดอก ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดนูนให้ผลสอดคล้องกับการเจริญเติบโตและการเพิ่มพูนผลผลิต กล่าวคือ กรรมวิธีการคลุกเมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูกและพ่น 3 ครั้ง ที่อายุ 15, 30 และ 45 วัน ด้วยสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสมหลายสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s สัดส่วน 9:1 มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคใบจุดนูนได้ดีที่สุด โดยพบอัตราการเกิดโรคที่ระยะเริ่มติดฝัก (49 วัน) เท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์ และระยะฝักพัฒนา (56 วัน) เท่ากับ 7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ กรรมวิธีการใช้สูตรเดี่ยว *B. amyloliquefaciens* KPS46 (ISR-B) และ *P. fluorescens* SP007s (ISR-P) ที่มีระดับความรุนแรงของโรคใบจุดนูนที่อายุ 49 วัน เฉลี่ย 7 และ 6 เปอร์เซ็นต์ และที่อายุ 56 วัน ที่ 19 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีใช้สารเคมีควบคุม (copper hydroxide) และกรรมวิธีที่ไม่มีการควบคุมโรคมีระดับการเกิดโรครุนแรงสูงกว่า คือ 13 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อายุถั่วเหลือง 56 วัน ตามลำดับ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ภาพแสดงระดับการเกิดโรคใบจุดบนที่เกิดจาก *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ที่ถั่วเหลืองอายุ 35- 56 วัน จากการควบคุมโดยใช้สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะแบบผสมหลายสายพันธุ์ และแบบเชื้อเดี่ยว เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมโดยสารเคมีและการไม่มีการควบคุม

วิจารณ์

โรคใบจุดนูนของถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* เป็นโรคสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพและประสิทธิภาพผลผลิต เกษตรกรประสบปัญหาในการควบคุมโรคโดยการใช้สารเคมีไม่ได้ผล เนื่องจากเชื้อโรคมักมีการต้านทานต่อสารเคมี (สุตฤดี และกิติศักดิ์, 2527 และสุตฤดี และเชษฐพันธ์, 2532) แนวทางการควบคุมโดยชีววิธีเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับการควบคุมโรคดังกล่าว (สุตฤดี และคณะ, 2548) โดยแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช แต่ยังไม่มีการนำมาใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญร่วมกันของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ที่มีการรายงานการศึกษากลไกการทำงานและคุณสมบัติที่แตกต่างกันชัดเจนแล้ว ได้แก่การส่งเสริมการเจริญเติบโต และยับยั้งหรือฆ่าเชื้อโรคพืชเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ผสมที่มีกลไกหลายแนวทางที่สามารถใช้กับการปลูกพืชได้ทุกขั้นตอน ตลอดจนการกำหนดสัดส่วนที่เหมาะสมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์คู่ผสมต่าง ๆ ผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งโรค โดยเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาวิจัยประกอบด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 *Paenibacillus pabuli* SW01/4 *Serratia macescens* SPt360 และ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ที่แยกได้จากพืชชนิดต่าง ๆ และมีการศึกษากลไกและนำไปใช้ในระบบการพัฒนาพืชผักต่าง ๆ อย่างมีประสิทธิภาพ ในลักษณะเชื้อเดี่ยว (สุตฤดี และคณะ 2548 ; วิลาวรรณ์ และคณะ 2549 และ Prathuangwong *et al.*, 2004)

การศึกษานี้ได้คัดเลือกสายพันธุ์เชื้อสาเหตุใบจุดนูน คือ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Xag) สายพันธุ์ No.12-2 เป็นตัวแทนในการศึกษา เนื่องจากเป็นสายพันธุ์รุนแรงและมีการศึกษาคูสมบัติต่าง ๆ ทั้งในระดับ สัมพันธวิทยา ชีวเคมี และพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค และความรุนแรงของโรคแล้ว (จารุวัฒน์ และสุตฤดี, 2548; ตียากร และสุตฤดี, 2552; ตียากร และคณะ, 2552; ดุสิต และคณะ, 2548 ; Kasem and Prathuangwong, 2006) เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวที่เก็บในตู้เก็บเชื้อ และนำมาทำการทดสอบยืนยันการเป็นเชื้อสาเหตุโรค และความรุนแรงในการก่อโรค พบว่า *X. axonopodis* pv. *glycines* สายพันธุ์ No.12-2 ดังกล่าว เป็นแบคทีเรียแกรมลบ โคลิโนบนอาหาร NA มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ขอบกลมเรียบ ผิวหนูนยกตัวจากผิวหน้าอาหาร เมื่อทดสอบความสามารถในการชักนำการเกิดปฏิกิริยา hypersensitive response; HR บนใบยาสูบ พบว่าใบพืชทดสอบเกิดอาการ HR ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *X. axonopodis* pv.

glycines สายพันธุ์ No.12-2 เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช โดยปฏิกิริยา HR เป็นวิธีการมาตรฐานใน พิสูจน์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (Shaad, 1988) ทั้งนี้การเกิดปฏิกิริยา HR บนพืชทดสอบนั้นเกิด จากการที่เชื้อโรคสามารถผลิตสาร โปรตีน harpin ที่ควบคุมการผลิตโดย *hrp* gene (Flor, 1942) ซึ่ง สามารถตรวจสอบได้ในเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชทุกชนิดรวมทั้ง *X. axonopodis* pv. *glycines* ด้วย (Kaewnum *et al.*, 2005)

และเมื่อนำเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สายพันธุ์ No.12-2 มาทดสอบความสามารถใน การก่อโรคบนพืชอาศัย ได้แก่ ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ No.75 พบว่าหลังพ่นเชื้อ 4 วัน (ที่ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/มิลลิลิตร) พบอาการเริ่มต้นที่ใบถั่วเหลืองมีลักษณะจุดช้ำน้ำ กระจายทั่วไป เป็นสีเขียว อ่อน ต่อมาอาการแผลมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นตุ่มนูนสีเข้ม และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลยกตัวจาก ผิวใบ จนถึงการประเมนผลที่ 7 วัน พบว่า แผลมีขนาดใหญ่ขึ้นจากตุ่มนูน กลายเป็นแผลไหม้ ลาม ติดกัน และเกิดความเสียหายที่ใบประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จากการประเมินด้วยวิธีของชัชสิทธิ์ (2531) แสดงให้เห็นว่า *X. axonopodis* pv. *glycines* สายพันธุ์ No.12-2 เป็นสายพันธุ์ที่ยังคงความ รุนแรงที่สามารถนำมาใช้ในการทดลองได้ และความเข้มข้นของเชื้อที่ 1×10^8 cfu/มิลลิลิตร เป็น ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการปลูกเชื้อจึงใช้ความเข้มข้นดังกล่าวตลอดการทดลองนี้ ทั้งนี้เมื่อนำ ใบพืชที่เกิดอาการ โรคมาตัดแยกบริเวณแผล และทำการแยกเชื้อใหม่สามารถแยกได้เชื้อชนิดเดิม ซึ่ง เป็นไปตามหลักการพิสูจน์การเป็นเชื้อก่อโรคของ Koch (Koch's postulation) (Agrios, 2005)

สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ที่กล่าวข้างต้น ใน การควบคุมโรคพืช ทั้งการใช้แบบเดี่ยวและผสมให้ผลการศึกษาดังนี้ เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ทุกสายพันธุ์มาศึกษาการเจริญร่วมกันในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี agar diffusion, dual culture และ paper disc บนอาหารแข็ง NA พบว่ามีทั้งสายพันธุ์ที่สามารถเจริญร่วมกันได้ และไม่สามารถเจริญ ร่วมกันได้ โดยพบว่าเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 สามารถเจริญร่วมกันได้กับเชื้อ *P. fluorescens* SP007s *P. pabuli* SW01/4 และ *S. macescens* SPt360 ในขณะที่เชื้อ *P. fluorescens* SP007s ไม่สามารถเจริญร่วมกันกับ *P. pabuli* SW01/4 ซึ่งเป็นผลจากสารที่เชื้อ *P. fluorescens* SP007s ผลิตและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. pabuli* SW01/4 โดยไม่มีผล ยับยั้งเชื้ออื่น แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่เชื้อ *P. fluorescens* SP007s มีความจำเพาะต่อการยับยั้งเชื้อ เป้าหมาย โดยมีรายงานว่าสารปฏิชีวนะสารที่เชื้อกลุ่ม *P. fluorescens* SP007s ผลิตออกมายับยั้งจะ เป็นในกลุ่ม 2,4 -diacetyl-phloroglucinol, phenazine-1-carboxylic acid, pyrrolnitrin และ pyoluteorin (Shanahan *et al.*, 1992 ; Thomshow *et al.*, 1992) และสารแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะ

ต่อเชื้อเป้าหมาย นอกจากนี้สายพันธุ์เชื้อ *P. fluorescens* SP007s ยังสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว และใช้สารอาหารที่เป็นแหล่งอาหารเดียวกันกับ *P. pabuli* SW01/4 จึงทำให้ *P. pabuli* SW01/4 ไม่สามารถเจริญได้ทันจึงถูกยับยั้ง การทดลองนี้จึงไม่สามารถใช้คุณสมบัติระหว่าง *P. fluorescens* SP007s และ *P. pabuli* SW01/4 ได้ และเหลือเชื้อเป้าหมายอีก 3 สายพันธุ์ที่จะต้องคัดเลือกคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อไป ทั้งในด้านการเจริญร่วมกัน และประสิทธิภาพในการควบคุมโรค ถึงแม้จะเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เช่นกัน

และเมื่อนำเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 4 สายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันในอาหารเหลว NB ให้ผลสอดคล้องกันกับการทดสอบบนอาหาร NA กล่าวคือ *P. pabuli* SW01/4 ไม่สามารถเจริญร่วมกันกับเชื้อ *P. fluorescens* SP007s ได้ และการทดสอบคุณสมบัติ 2 สายพันธุ์ผสม 3 สายพันธุ์ และ ผสม 4 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันพบว่า คู่ผสมแบบ 2 เชื้อ คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่อัตรา 1:1 มีการเจริญของเชื้อดีที่สุด (ประชากรเริ่มต้นที่ 10^8 cfu/ มิลลิลิตร) แม้ว่าจะมีประชากรเชื้อที่เจริญไม่เท่ากัน และไม่เท่ากับการเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์แบบเดี่ยว ซึ่งเป็นผลจากการที่เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์แข่งขันกันใช้อาหารกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเชื้อใดที่สามารถครอบครองและใช้อาหารได้เร็วกว่าก็จะสามารถเพิ่มปริมาณตัวเองในการครอบครองพื้นที่ ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ โดยการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่อัตรา 1:1 พบว่ามีเชื้อ *P. fluorescens* SP007s มีการเจริญที่ดีกว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 เนื่องจากแบคทีเรีย *P. fluorescens* SP007s เจริญได้เร็วกว่าโดยเข้าระยะ log phase ที่ 12-24 ชั่วโมง และระยะ stationary phase ที่ 36-72 ชั่วโมง ขณะที่ *B. amyloliquefaciens* KPS46 สามารถเข้าสู่การเจริญระยะ stationary phase ที่ 48-72 ชั่วโมง แต่เป็นที่น่าสนใจคือ ทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่ยับยั้งกันและอยู่ร่วมกันได้ ผลการทดสอบประสิทธิภาพการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ยับยั้งเชื้อโรคในห้องปฏิบัติการ และการส่งเสริมการเจริญเติบโตด้านลำต้นของถั่วเหลืองฝักสด จะเห็นว่า *P. fluorescens* SP007s และ *B. amyloliquefaciens* KPS46 มีกลไกโดดเด่นที่ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออีก 2 สายพันธุ์คือ *P. pabuli* SW01/4 และ *S. macescens* SP1360 ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม การทดลองนี้จึงกำหนดกรอบการศึกษาเฉพาะ *P. fluorescens* SP007s และ *B. amyloliquefaciens* KPS46 มาใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป และเมื่อทำการศึกษ้อัตราส่วนผสมของเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ค่าอัตราส่วนผสมต่างๆ พบว่าอัตราส่วนผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่ 9:1 เป็นสัดส่วนที่ดีที่สุด ซึ่งเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเหลวทดสอบในประชากรที่สูงที่สุดเท่าเทียมกัน (จากการประเมิน 24 ชั่วโมงหลังบ่มเชื้อ) ในขณะที่สัดส่วนอื่นมี

อัตราการเพิ่มประชากรเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 ที่น้อยกว่า แสดงให้เห็นว่าในสิ่งแวดล้อมเดียวกันเชื้อที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตสูงจะแข่งขันและยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น ๆ แต่หากมีอัตราส่วนที่สมดุลกันจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์อื่นสามารถเจริญอยู่ร่วมกันได้สอดคล้องกับการวิจัยของ Kanchalee and Klopper (2002) ที่มีการใช้เชื้อ PGPR แบบผสมในการชักนำภูมิคุ้มกันต้านทานโรคพืชที่มีการใช้สัดส่วนที่เหมาะสม

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 สามารถเจริญแข่งขันกลุ่มทับเชื้อสาเหตุโรคได้ร่วมกับสามารถผลิตสาร secondary metabolites ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคใบจุดนูนโดยตรงซึ่งให้ผลดีและชัดเจนกว่าการใช้เชื้อแต่ละสายพันธุ์แบบเชื้อเดี่ยว แสดงให้เห็นว่ากลไกของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์เมื่อนำมาหาสัดส่วนที่เหมาะสมจะสามารถส่งเสริมซึ่งกันและกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคใบจุดนูนตลอดจนการเจริญครอบครองพื้นผิวใบได้ดีร่วมกับการผลิตสารยับยั้งเชื้อเป้าหมาย ซึ่งถือเป็นสถานะสมดุลของเชื้อที่สามารถเจริญร่วมกันและมีความสามารถในการส่งเสริมกลไกซึ่งกันและกันได้ (Hallmann *et al.*, 1997) นอกจากนี้การทดสอบการเจริญและการมีชีวิตรอดของเชื้อบนผิวใบถั่วเหลืองที่ให้ผลชัดเจนว่า *P. fluorescens* SP007s มีอัตราการเจริญดีกว่า *B. amyloliquefaciens* KPS46 ในทุกระยะการตรวจสอบ 0-168 ชั่วโมง และเป็นที่น่าสนใจคืออัตราการเจริญครอบครองผิวถั่วเหลืองมีการพัฒนาโดยที่ระยะทดสอบ 24 ชั่วโมง จะมีประชากรเชื้อที่ตรวจสอบสูงสุด และหลังจากนั้นคือ 48-72 ชั่วโมง ประชากรจะลดลง และเริ่มเพิ่มขึ้นอีกครั้งที่ 96-168 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นความผันแปรของจุลินทรีย์บนผิวพืชที่มาจากการปรับสมดุล เมื่อมีประชากรมากเกินไปจะควบคุมให้ลดลงจนถึงจุดสมดุล และเมื่อนำมาทดสอบร่วมกับการพ่นเชื้อ Xag พบว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์ทั้งสูตรเชื้อเดี่ยว *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s และเชื้อผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 มีกลไกการลดประชากรของเชื้อ Xag ที่ผิวใบได้ชัดเจน โดยเฉพาะที่ 24 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อที่พบว่าการรวมวิธีพ่น Xag อย่างเดียวมีประชากรเฉลี่ย 7.0×10^5 cfu/มิลลิลิตร แต่กรรมวิธีใช้สูตรเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 สูตรเดี่ยว *P. fluorescens* SP007s และสูตรผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 ร่วมกับการปลูกเชื้อ Xag มีประชากรของเชื้อโรคที่ 24 ชั่วโมงต่ำกว่า คือ มีประชากร Xag ที่ 4×10^3 , 3.4×10^3 และ 3.3×10^4 cfu/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ในทุกวิธีการใช้ทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสมมีประชากรที่สูงกว่าเชื้อโรค จึงยืนยันให้เห็นว่าการครอบครองพื้นที่ใบของ

ประชากรเชื้อปฏิปักษ์เป็นกลไกหลักสำคัญในการยับยั้งเชื้อโรคและควบคุมโรคได้ (Campbell, 1988)

เมื่อนำน้ำล้างใบถั่วเหลืองที่มีการปนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบเดี่ยวและแบบผสม และการพ่นร่วมกับเชื้อโรคใบจุดนูน และปล่อยทิ้งไว้ 168 ชั่วโมง มาทดสอบว่ามีการผลิตสารยับยั้งเชื้อโรคบนผิวใบพืชหรือไม่ ผลพบว่าน้ำล้างใบดังกล่าว สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Xag ในอาหารทดสอบได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquifaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s เมื่อเจริญร่วมกันบนผิวใบพืชจะสามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ ซึ่งกลไกหนึ่งของการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ และเมื่อนำน้ำล้างใบดังกล่าวไปพ่นลงบนใบถั่วเหลืองเพื่อควบคุมโรคพบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้พ่นน้ำล้างใบถั่วเหลือง ถึงแม้จะให้ผลที่ไม่ชัดเจนก็ตาม (เกิดโรคเฉลี่ย 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมเกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งการใช้กากจากใบถั่วเหลืองที่ปนเชื้อผสมจะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว จึงเป็นการยืนยันว่า การใช้เชื้อผสมจะสามารถเพิ่มศักยภาพการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ควบคุมโรคได้ และมีกลไกที่ส่งเสริมซึ่งกันและกัน โดยเฉพาะในสถานะที่มีการกดดันหรือชักนำโดยการแก่งแย่งแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรค (Susan and Chisten, 2000)

นอกจากนี้การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมร่วมกัน ระหว่าง *B. amyloliquifaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 นอกจากจะสามารถลดปริมาณเชื้อก่อโรคได้แล้ว ยังพบว่าการใช้เชื้อร่วมกันเป็นการส่งเสริมประสิทธิภาพซึ่งกันและกันทำให้เชื้อแต่ละชนิดมีความสามารถในการสร้างสารที่มีปฏิสัมพันธ์ที่ให้คุณประโยชน์หลายแนวทางต่อพืช เช่น กระตุ้นให้พืชเจริญเติบโตและเกิดภูมิต้านทานโรคต่าง ๆ ส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิตพืชทั้งปริมาณและคุณภาพ (Boiero *et al.*, 2007) นอกจากนี้มีรายงานถึงสารอินทรีย์หลายชนิดในพืชที่มีความสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เช่น indole-3-acetic acid (IAA) และ gibberellins (GA) และปรับสภาพสมดุลของฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโตพืชให้อยู่ในสภาวะปกติ (Prathungwong and Buensanteai, 2008) จากการทดลองพบว่าเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมระหว่าง *B. amyloliquifaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s มาเลี้ยงร่วมกันสามารถเพิ่มพูนคุณสมบัติด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ชัดเจนในทุกค่าจากการประเมินคือ ความสูงต้น ความยาวราก จำนวนราก น้ำหนักสด โดยศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชนี้มีความสอดคล้องกับปริมาณสาร indole-3-acetic acid (IAA) ที่เพิ่มขึ้น จากการตรวจสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *B. amyloliquifaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 ซึ่งปริมาณของสาร

IAA สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยว จึงเป็นการยืนยันได้ว่าการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่าง

B. amyloliquefaciens KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s นอกจากจะมีผลต่อการเจริญแข่งขันและผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อโรคแล้ว ยังเพิ่มศักยภาพในการผลิตสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชด้วย ซึ่งเป็นการรวมกลไกที่ดีของเชื้อปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกันที่สามารถต่อ ยอดคู่การผลิตสูตรสำเร็จพร้อมใช้ได้

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณและสูตรสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดผงพร้อมใช้เพื่อใช้ในระบบปลูกถั่วเหลืองฝักสด โดยการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิต secondary metabolites ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมระหว่าง

B. amyloliquefaciens KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 และแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวคือ

B. amyloliquefaciens KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s พบว่า อาหารที่กระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรีย

ปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1

ผลิต secondary metabolites ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดนูนได้ดีที่สุดคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NGB ในขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์เดี่ยว *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ

P. fluorescens SP007s สามารถผลิตสาร secondary metabolites ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MY และ KB

ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อแต่ละชนิดจะมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต

สารปฏิชีวนะแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงด้วยสภาวะเชื้อเดี่ยว และสภาวะที่ต้องการแก่งแย่งแข่งขันซึ่งกัน

และกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปจะประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานซึ่ง

ทั่วไปจะได้จากน้ำตาลต่าง ๆ และแหล่งไนโตรเจน (สารตั้งต้นในการเจริญเติบโต) ซึ่งโดยทั่วไปจะ

ได้จากสารโปรตีนสกัดจากสัตว์หรือพืชที่มีโปรตีนสูง หากมีส่วนที่เหมาะสมเชื้อที่เลี้ยงจะมีเมตา

บอลิซึมที่สมบูรณ์ส่งผลต่ออัตราการเจริญที่เต็มที่และการผลิตสารปฏิชีวนะต่าง ๆ (Giancarlo and

Rolando, 1993) โดยทั้งนี้ยังมีปัจจัยอื่นอีกหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการผลิตสาร secondary

metabolites ได้แก่ สภาพการเลี้ยงเชื้อ เช่นอุณหภูมิ สภาพความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจน และ

ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร

secondary metabolites ของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ (Giancarlo and Rolando, 1993) และ

เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อ NGB ที่เลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยวและแบบผสมไปเพิ่มความเข้มข้นของสาร โดย

ระเหยน้ำด้วยเครื่องสกัดแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) และนำมาทดสอบความสามารถในการ

ยับยั้งเชื้อก่อโรค พบว่าปริมาณสารที่สกัดได้จากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน โดย

แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s

9:1 สามารถสกัดสาร secondary meabolites ได้ดีที่สุด ซึ่งอาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละ

สายพันธุ์จะมีความต้องการสารอาหารในการเจริญและการผลิตสาร secondary metabolites ที่แตกต่างกัน และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพสาร secondary metabolites ในรูปสารสกัดหยาบ (crude extract) ของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์ พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycine* โดยเมื่อความเข้มข้นของสารที่เพิ่มสูงขึ้นจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเพิ่มขึ้นด้วย (Yoshida *et al.*, 2001) แสดงให้เห็นว่าปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมีความผันแปรโดยตรงต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ ที่เป็นองค์ประกอบในสารดังกล่าว และเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถผลิตสารดังกล่าวออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมกัน ทำให้มีปริมาณสารและความเข้มข้นที่สูงกว่ากรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์แบบเดี่ยว และเมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ผสมและเชื้อเดี่ยว *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s มาศึกษาชนิดของสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC) พบว่าสามารถแยกแถบสารได้แตกต่างกัน โดยพบว่าแถบ TLC ที่หยดด้วยสารสกัดหยาบของอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณช์สายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 มีแถบสารที่ปริมาณแตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อเดี่ยวแต่ละสายพันธุ์ โดยการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยวด้วย *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s มีแถบที่ตรวจสอบได้บนแผ่น TLC รวม 8 และ 6 แถบ ตามลำดับ แต่เมื่อนำมาเลี้ยงผสมกันพบว่า เกิดแถบสารบนแผ่น TLC ที่ 6 แถบ แต่มีระยะ/ตำแหน่งตามค่า R_f ที่แตกต่างจากการเลี้ยงแบบเดี่ยว และพบว่าแถบสารที่แยกได้จากแผ่น TLC จำนวน 4 ใน 6 แถบของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อผสมแถบที่ 5 และ 6 ที่มีค่า R_f 0.47 และ 0.82 จึงไม่พบแถบสารดังกล่าวในการเลี้ยงเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* แบบเดี่ยว และแถบสารทั้ง 2 ตำแหน่งนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ดี (1.4 และ 2.1 เซนติเมตรตามลำดับ) ซึ่งให้ผลดีแตกต่างกับสารสกัดหยาบจากการเลี้ยงเชื้อเดี่ยว แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่อัตราส่วน 9:1 สามารถชักนำให้เชื้อผลิตสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ขึ้นมา โดยสารดังกล่าวจะไม่สร้างหากเชื้อดังกล่าวมีการเจริญอย่างอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่พบว่า เชื้อแบคทีเรียมีกลไกในการผลิตสารต่าง ๆ และปลดปล่อยออกนอกเซลล์ ซึ่งมีทั้งที่เป็นประโยชน์และไม่เป็นประโยชน์ต่อการดำรงชีวิต โดยการผลิตสารแต่ละชนิดจะมีการกระตุ้นหรือชักนำจากสิ่งเร้าที่แตกต่างกัน (Waksman, 1961; Giancarlo and Rolando, 1993) ส่วนแถบที่เหลืออีก 2 แถบคือ R_f 0.21 และ 0.37 ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ Xag ได้เช่นกัน สามารถตรวจสอบได้ในสภาพการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยว *B. amyloliquefaciens* KPS46

และ *P. fluorescens* SP007s การศึกษาครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการเลือกเชื้อจุลินทรีย์ ปลูกแบบหลายสายพันธุ์ที่ต้องมีการพิจารณาอย่างเหมาะสมในการนำสายพันธุ์จุลินทรีย์ต่าง ๆ มาเลี้ยง ตลอดจนสัดส่วนผสมที่ต้องเหมาะสมและสมดุลซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการเป็น เชื้อปลูกและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอย่างเต็มศักยภาพในสภาพธรรมชาติ

จากผลการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้นของการใช้ เชื้อแบคทีเรียปลูก 2 สายพันธุ์ ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคควบคุมโรคใบจุดบน และ การส่งเสริม การเจริญเติบโต โดยการพิสูจน์ถึงกลไกที่เกี่ยวข้องทั้งการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ การเจริญร่วมกัน บนผิวใบถั่วเหลืองและยับยั้งเชื้อโรคบนผิวใบ ตลอดจนชนิดสารใหม่ที่เชื้อผลิตขึ้น และมีฤทธิ์ใน การควบคุมโรค จึงได้ทำการพัฒนาสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปลูกแบบผสมหลายสายพันธุ์ขึ้น โดยมีเป้าหมายเพื่อคงความมีชีวิตรอดได้นาน การนำไปใช้อย่างสะดวก และมีประสิทธิภาพคงที่ ยาวนาน โดยการศึกษาได้เปรียบเทียบชนิดอาหารดัดแปลงเพิ่มปริมาณ และสูตรส่วนผสมและ อาหารและอัตราส่วนที่เหมาะสม ซึ่งพบว่าอาหารเพิ่มปริมาณสูตรดัดแปลง VS medium ที่มี ส่วนผสมของกากน้ำตาล vinasses และกากถั่วเหลือง (soybean meal) ที่อัตราส่วน 10:10 กรัม ใน ปริมาณอาหาร 1 ลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มปริมาณเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สาย พันธุ์ เมื่อเทียบกับส่วนผสมและอัตราส่วนอื่น ๆ รวมทั้งสูตร NGB ที่เป็นอาหารสังเคราะห์และมี ต้นทุนสูง จึงสามารถสรุปได้ว่าอาหาร VS medium สามารถใช้ทดแทนอาหาร NGB ได้ และมี ต้นทุนต่ำกว่าเนื่องจากส่วนประกอบเป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล และถั่วเหลือง โดยในกากน้ำตาล vinasses มีค่า pH 4.32 มีไนโตรเจน 0.51 เปอร์เซ็นต์ และมีส่วนประกอบของ น้ำตาลที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมและเพียงพอ เมื่อนำไปผสมกับกากถั่วเหลือง ซึ่งมีปริมาณ โปรตีน (แหล่งไนโตรเจน) สูงจึงทำให้สูตรอาหารดังกล่าวเหมาะสมที่จะใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อ เพิ่มปริมาณ และกระตุ้นการผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้อย่างดีทัดเทียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต้นทุน สูงกว่า

การพัฒนาสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียปลูกแบบผสมหลายสายพันธุ์ พบว่า อัตราส่วนของ สารพาและสารเสริมประสิทธิภาพมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่เดิมโดยสารพา ที่ดีจะต้องคงความมีชีวิตของเชื้อได้ดีเป็นที่ยึดเกาะและลดความเสี่ยงจากปัจจัยสิ่งแวดล้อม และลด กิจกรรมของเชื้อ และสารเสริมประสิทธิภาพที่ดีจะต้องออกฤทธิ์ดีเมื่อนำสูตรดังกล่าวละลายในน้ำ และใช้กับพืชทั้งการคลุกเมล็ด และพ่นใบ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารพา kaolin (ผงดินขาว) มีประสิทธิภาพดีกว่าผงทัลคัม เนื่องจาก kaolin ซึ่งมีสูตรทางเคมี คือ $Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$ (hydrated

medium silicate) เป็นผงดินละเอียดที่มีความทนและมีสารประกอบที่มีประโยชน์หลายชนิด ได้แก่ เหล็กออกไซด์ ไทเทเนียมออกไซด์ และวัสดุประเภทคาร์บอน มีโครงสร้างที่แข็งแรง แร่ธาตุและ อินทรีย์สาร ซึ่งมีคุณสมบัติน้ำหนักโมเลกุลเบาว่าการใช้ที่ล้น ความเบาจะช่วยให้เกิดการกระจายตัวได้อย่างรวดเร็วมากขึ้นตรงกันข้ามกับที่ล้นเกิดการจับเกาะกลุ่มบนน้ำทำให้เชื้อแบคทีเรีย ปฏิบัติไม่สามารถละลายออกจากสารพาได้ส่งผลให้จำนวนแบคทีเรียปฏิปฏิบัติมีปริมาณไม่เพียงพอ ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (Greg *et al.*, 2003) และเมื่อนำสารพาดังกล่าวมาผสมกับสารเสริม ประสิทธิภาพที่มีส่วนประกอบด้วยน้ำตาลทราย + SiO_2 + CMC + CaCO_3 + FeSO_4 + deshecofix ที่ อัตราส่วน 70 : 15 : 5 : 5 : 1 : 2 : 2 (v/v) และความเป็นกรด 4.32 ของ vinasses เมื่อนำมาผสมกับสูตร อาหารเลี้ยงเชื้อและเจือจางกับน้ำ และจะได้ค่า pH เป็นกลาง 6.5-7 ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ของเชื้อ พบว่าสูตรดังกล่าวมีคุณสมบัติที่โดดเด่นทั้งในด้านการคงความมีชีวิตรอดของเชื้อได้นาน 12 เดือน สามารถใช้ได้ทั้งการคลุกเมล็ดและพ่นใบ โดยไม่ลดประสิทธิภาพ โดยสารเพิ่ม ประสิทธิภาพแต่ละสารมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันคือ น้ำตาลทรายซึ่งเป็นน้ำตาล โมเลกุลคู่ซึ่งใช้เป็น แหล่งพลังงาน ซึ่งมีรายงานว่าการใช้น้ำตาลที่มีโมเลกุลคู่ทั่วไปที่สำเร็จรูปมีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียจะใช้ในกระบวนการสร้างพลังงานและเมตาบอลิซึมและชักนำการผลิตสาร ยับยั้งเชื้อก่อโรค (Douglas *et al.*, 1996) พง silica (SiO_2) มีคุณสมบัติเป็นตัวดูดและลดความชื้น การ ใส่สาร CMC เพื่อการปกป้องเซลล์เนื่องจาก CMC มีเป้าหมายมีคุณสมบัติสร้างเส้นใยเครือข่าย ห่อหุ้มเซลล์เพื่อป้องกันการกระแทกของเซลล์โดยตรงที่เกิดจากการเสียดสีที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ (Thomas and Katy, 1999) และการใช้ FeSO_4 จะมีประโยชน์เมื่อเซลล์ของแบคทีเรียไปตกอยู่บนใบ พืช เชื้อแบคทีเรียปฏิปฏิบัติจะสามารถเปลี่ยนเหล็กที่มีอยู่ในรูปที่มีประโยชน์ต่อพืช (สุดฤดี, 2551) ส่วนสาร deshecofix เป็นสารที่เพิ่มประสิทธิภาพของสารพาให้ได้ผลดียิ่งขึ้นโดยช่วยให้มีการ แพร่กระจายของผงสูตรสำเร็จในน้ำหลังจากสารตกกระทบลงผิวน้ำทันทีและมีการกระจายจาก ด้านบนลงสู่ด้านล่างและจากด้านล่างพุ่งขึ้นสู่ด้านบน การใส่สารแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) เพื่อ ช่วยลดการจมตัวของผลิตภัณฑ์และเป็นอาหารเสริมกับพืช จะเห็นได้ว่าสูตรสำเร็จดังกล่าวมี ส่วนประกอบที่มีประโยชน์โดยตรงต่อเซลล์ของแบคทีเรียและต่อพืช ซึ่งการใช้สูตรสำเร็จดังกล่าว จะเพิ่มพูนประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ในการควบคุมโรคและส่งเสริมการ เจริญเติบโตของถั่วเหลือง และมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้แบบเชื้อสดและแบบเชื้อเดี่ยว

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช และควบคุม โรคในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ให้ผลที่สอดคล้องกัน กล่าวคือ สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรีย ปฏิบัติแบบผสมสายพันธุ์ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 ที่

พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพสูงกว่าสูตรสำเร็จสูตรเดิมที่พัฒนาก่อนหน้านี้ที่เป็นสูตรเชื้อเดี่ยวคือ ISR-B (*B. amyloliquifaciens* KPS46) และ ISR-P (*P. fluorescens* SP007s) ทั้งในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโต (ความสูงต้น ความยาวราก จำนวนกิ่ง และข้อ) การควบคุมโรคใบจุดนูนและการเพิ่มพูนปริมาณและคุณภาพของผลผลิตถั่วเหลืองฝักสด ทั้งนี้ในด้านการควบคุมโรคพบว่าสูตรสำเร็จเชื้อผสมที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้สามารถควบคุมโรคเป้าหมาย ซึ่งให้ผลในการควบคุมที่ดีกว่ากรรมวิธีการอื่น ๆ เมื่อมีการใช้แบบคลุกเมล็ด และพ่น 3 ครั้ง แสดงให้เห็นว่า การผสมสายพันธุ์เชื้อ *B. amyloliquifaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ยังเป็นการเพิ่มศักยภาพที่ครอบคลุมในการควบคุมโรคของถั่วเหลืองฝักสดที่เกิดจากเชื้อสาเหตุหลายชนิด และใช้ได้ทุกระยะการเจริญเติบโตด้วย จากการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าสูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ผสมดังกล่าว ซึ่งมีการพัฒนาองค์ประกอบและสัดส่วนที่เหมาะสมสามารถนำไปต่อยอดและพัฒนาเป็นต้นแบบสูตรผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรม เพื่อถ่ายทอดสู่ภาคการผลิตที่เกี่ยวข้อง และสามารถส่งเสริมให้เกษตรกรผู้ผลิตถั่วเหลืองฝักสดหรือพืชอื่น ๆ ใช้เพื่อลดต้นทุนและความเสี่ยงต่อการใช้สารเคมีควบคุมโรคต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

เชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Xag) เป็นโรคสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณผลผลิตถั่วเหลือง และถั่วเหลืองฝักสด โดยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สายพันธุ์ No. 12-2 ที่นำมาจากตู้เก็บเชื้อสามารถชักนำการเกิด HR บนใบยาสูบ และสามารถการก่อโรครกับถั่วเหลืองพันธุ์ No.75 ภายใน 4 วัน และแสดงอาการชัดเจนที่ 7 วัน แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวยังมีประสิทธิภาพก่อโรคได้

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4 สายพันธุ์ คือ *B. amyloliquefaciens* KPS46, *P. pabuli* SW01/4 *S.marcescens* SPT360 และ *P. fluorescens* SP007s มีที่มาจากต่างแหล่ง และต่างพืชอาศัย เมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้

การทดสอบคุณสมบัติการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 4 สายพันธุ์พบว่า antibiotic marker gene ของเชื้อปฏิปักษ์ยังไม่เปลี่ยนแปลงโดย *B. amyloliquefaciens* KPS46 สามารถต้านทานต่อการ Tetracycline ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml และ Streptomycin ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml; *P. pabuli* SW01/4 สามารถต้านทาน Tetracycline ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml และ Rifampicin ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml; *S.marcescens* SPT360 สามารถต้านทาน Streptomycin ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml และ Amplicilin ที่ความเข้มข้น 150 µg/ml และ *P. fluorescens* SP007s สามารถต้านทาน Amplicilin ที่ความเข้มข้น 150 µg/ml และ Rifampicin ที่ความเข้มข้น 150 µg/ml

การทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันได้ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างสายพันธุ์ พบว่า *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s ที่อัตราส่วน 9:1 เป็นอัตราส่วนที่ดีที่สุดที่สามารถชักนำให้เชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 สายพันธุ์เจริญได้ดีติดเทียมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน และให้ผลดีกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยว และการใช้อัตราส่วนอื่น ๆ

จากการเลี้ยงเชื้อร่วมกันในอัตราส่วน 9:1 ระหว่าง *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s สามารถชักนำให้เชื้อมีการผลิตสาร secondary metabolites ยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* ได้ดีกว่าการเลี้ยงเชื้อเดี่ยวและกลุ่มผสมอื่น ๆ

สารสกัดหยาบสาร secondary metabolites จากอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 มีประสิทธิภาพสูงสุดการยับยั้งเชื้อสาเหตุ *X. axonopodis* pv. *glycines* และให้ผลว่าดีกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว โดยค่า MIC ของสารที่สกัดได้ เท่ากับ 20 μg /มิลลิลิตร

การแยกสารโดยวิธี Thin - layer Chromatography สามารถแยกสารใหม่ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s (9:1) ที่ค่า R_f ต่าง ๆ โดยได้สารยับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* เพิ่มขึ้นจาก 4 แถบที่ค่า R_f 0.21 0.37 0.47 และ 0.82 ตามลำดับ ซึ่งได้มากกว่าสารที่สกัดจากการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยว และพบว่าแถบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่ไม่พบในการเลี้ยงเชื้อแบบเดี่ยวคือแถบสารที่ค่า R_f 0.47

การพ่น cell-suspension คู่ผสมเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 : *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 สามารถลดความมีชีวิตรอดของประชากรเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์บนผิวใบถั่วเหลืองได้ดีกว่า และมีประชากรเชื้อสูงที่อายุ 24 ชั่วโมงหลังพ่น และการใช้ร่วมกับการพ่นเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* พบว่าสามารถลดประชากรเชื้อโรคได้อย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับกรรมวิธีพ่นเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* อย่างเดียว และตรวจสอบน้ำคั้นใบถั่วเหลือง พบว่าคู่ผสมเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 : *P. fluorescens* SP007s อัตรา 9:1 บนใบถั่วเหลืองสามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรคใบจุดบนได้ดีกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว เมื่อตรวจสอบที่ 168 ชั่วโมงหลังพ่นเชื้อลงบนใบพืช

สูตรอาหาร VS medium ที่มีส่วนผสมของการน้ำตาล vinasses และกากถั่วเหลือง ที่อัตราผสม 10:10 กรัม ที่พัฒนาขึ้นใหม่สามารถเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ คู่ผสมระหว่างเชื้อ *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens* SP007s อัตราส่วน 9:1 ได้ดีที่สุด และมีประสิทธิภาพในการชักนำผลิตสาร secondary metabolite ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนได้ดีที่สุด

ส่วนผสมและอัตราส่วนของสารพาและสารเสริมประสิทธิภาพสำหรับการพัฒนาสูตรสำเร็จที่ประกอบด้วย Kaolin + น้ำตาลทราย + SiO_2 + CMC + CaCO_3 + FeSO_4 + deshecofix ที่อัตราส่วน 70: 15 : 5 : 5 : 1 : 2 : 2 เป็นอัตราส่วนที่มีความเหมาะสมที่สุดของสูตรสำเร็จที่เชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถดำรงชีวิตและเพิ่มจำนวนประชากร ตลอดจนเพิ่มประสิทธิภาพใน

การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของการเกิดโรคใบจุด
นูนได้ และให้ผลดีกว่าการใช้เซลล์เชื้อสด และสารเคมี (copper hydroxide)

การใช้สูตรสำเร็จแบคทีเรียสายพันธุ์ผสม *B. amyloliquefaciens* KPS46 และ *P. fluorescens*
SP007s อัตราส่วน 9:1 ในสภาพไร่ โดยการคลุกเมล็ดอัตรา 1 กรัมต่อเมล็ดถั่วเหลือง 1 กิโลกรัม
และพ่นใบ 3 ครั้ง (15 30 และ 45 วัน หลังปลูก) มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการ
เจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด (ความสูงต้น จำนวนข้อ และจำนวนกิ่ง) เพิ่มผลผลิตต่อไร่ เพิ่มพูน
ส่งเสริมคุณภาพของถั่วเหลืองฝักสด (ความกว้าง ความยาว และความหนาของฝัก) และผลผลิตที่
เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงการเกิดโรคใบจุดนูนในแปลงปลูก

สูตรสำเร็จเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ผสมที่พัฒนาขึ้นถือเป็นนวัตกรรมใหม่ที่ยังไม่มี
รายงานวิจัยในเชิงลึกมาก่อน และสามารถพัฒนาเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์แบคทีเรียสุขภาพพืชพร้อม
ใช้ที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตพืชได้ทุกขั้นตอน และสามารถพัฒนาต่อยอดสู่ภาคการผลิต
เชิงอุตสาหกรรม เพื่อเพิ่มช่องทางการนำไปใช้ของเกษตรกรต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. โรคถั่วเหลืองและการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการ ลำดับที่ 32/2547: ISBN 974-436-411-4. กรุงเทพฯ.

กรุง สิตะธนี และสิริกุล วะสี. 2535. ถั่วแระญี่ปุ่นหรือถั่วเหลืองฝักสด. แหล่งที่มา: <http://www.bkk.cedis.or.th/download/pdf/soybean.pdf>, 27 มีนาคม 2550.

จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์, สุกฤดี ประเทืองวงศ์ และ J.E. Loper. 2548. *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ผลิตสาร DSF ที่มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรคพืชของเชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* spp. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการอารักขาพืช ครั้งที่ 7. 2 – 4 พฤศจิกายน 2548. จ. เชียงใหม่. หน้า 48 - 49.

ชัยสิทธิ์ ปรีชา. 2531. การแพร่กระจาย ความรุนแรง และการประเมินความเสียหาย เนื่องจากโรคใบจุดบนถั่วเหลืองในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชัยสิทธิ์ ปรีชา และ สุกฤดี ประเทืองวงศ์. 2548. อาหารเลี้ยงเชื้อประยุกต์สำหรับการทิวจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ KPS46, น. 127-135. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 7, 2-4 พฤศจิกายน 2548. เชียงใหม่.

เชษฐพันธ์ ชูเชื้อ. 2529. ผลของสารเคมีคลุกเมล็ดที่มีผลต่อโรคใบจุดบนและเชื้อไรโซเบียมปมรากถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ, Gary Y. Yuen และ สุกฤดี ประเทืองวงศ์. 2550. สาร Indole-3-Acetic Acid ของเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืช ครั้งที่ 8. 20-22 พฤศจิกายน 2550. จ. พิษณุโลก. หน้า 185-205.

คูสิต อธิณูวัฒน์, สุดฤดี ประเทืองวงศ์, ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ และประชุม จุฑาทวรรณะ. 2548. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* โดยวิเคราะห์การเกิดโรคการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน และ BOX-PCR. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการอารักขาพืชครั้งที่ 7. วันที่ 2-4 พฤศจิกายน 2548.

ศุภักษร ฉัตรนภารัตน์, สุพจน์ กาเซ็ม และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2551. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคเน่าดำคะน้า. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. 29 มกราคม-1 กุมภาพันธ์ 2551. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ. กรุงเทพฯ. หน้า 563 – 571.

ศุภักษร ฉัตรนภารัตน์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2552. การพบยีน *luxR* Homolog ในเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ที่ช่วยในการก่อให้เกิดโรคกับถั่วเหลือง. หน้า 11-12. ใน การประชุมวิชาการพืชไร่วงศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 2. 15 - 17 กรกฎาคม 2552. ณ โรงแรมจอมเทียน ปาล์ม บีช รีสอร์ท จ. ชลบุรี.

ศุภักษร ฉัตรนภารัตน์, คูสิต อธิณูวัฒน์ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2552. การสูญเสียความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* ในระหว่างการพัฒนาการเกิดโรคบนถั่วเหลืองจะเกี่ยวข้องกับยีน *luxR* homolog. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืช ครั้งที่ 9. 24-26 พฤศจิกายน 2552. จ.อุบลราชธานี. หน้า 454-464.

นลินา เหมสนิท. 2554. การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* SP007s ชักนำให้คะน้าเกิดความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทิยา เตชะดี. 2551. การจำแนกชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบขีดขาวโพด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2546. การควบคุมโรคแบคทีเรียของพืชโดยชีววิธี. ประถมทอง พรินต์ติ้ง กรุ๊ป จำกัด, กรุงเทพฯ.

บุปผา มงคลศิลป์. 2545. ถั่วเหลืองฝักสด. กองส่งเสริมพืชไร่. กรมส่งเสริมการเกษตร

พรภิมล จันทร์อ่อน. 2551. การระบาด แหล่งพันธุ์ต้นทาน และชีววิถีการควบคุม *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของข้าวโพดพันธุ์ลูกผสม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ, ศศิธร วุฒินิชย์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเซ็ม, ณัฐธิญา เป็อนสันเทียะ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2549. การส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำภูมิคุ้มกันต้านทานโรคของกะหล่ำดอกและผักคะน้าด้วยเชื้อจุลินทรีย์และสารชีวภัณฑ์ธรรมชาติ, น. 795-810. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2549. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ. 2551. ลักษณะและการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ควบคุมโรค *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคน้ำและของกะหล่ำดอก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชฎาวรรณ เดชมนี และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2548. แถบ Thin-layer Chromatography ของสารทุติยภูมิที่ผลิตโดย *Bacillus firmus* และการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. 2548, น. 313 -320. ใน รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 1-4 กุมภาพันธ์ 2548. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ พิริยะประสาธน์. 2547. ผลของแบคทีเรียจากดินปลวกและจากเมล็ดพืชป่าต่อการเจริญเติบโตของกระถินเทพา (*Acacia mangium*) และ สัก (*Tectona grandis*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ ศิริโชค. 2550. อาหารเลี้ยงเชื้อ. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, น. 340:80-96

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2523. โรคแบคทีเรียลพัสดุล, น. 20-21 ใน รายงานการค้นคว้าและวิจัยประจำปี 2522-2523. สถาบันและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2527. เทคนิคในการปลูกเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. วารสาร วิทยาศาสตร์เกษตร 17(13): 183-189.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ และ กิตติศักดิ์ อำนวยกิต. 2527. สารเคมีบางชนิดที่มีผลต่อโรคใบจุดนูนของ ถั่วเหลือง (ตอนที่ 2). ใน รายงานการสัมมนาการวิจัยและพัฒนาพืชโปรตีนสูง ประจำปี 2527. โครงการวิจัยและพัฒนาพืชโปรตีนสูง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. จ. ชลบุรี. 12 หน้า.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ และ เซษฐพันธ์ ชูเชื้อ. 2532. ผลของสารเคมีกลูเมลิตต่อโรคใบจุดนูนที่ติดมา กับเมล็ดถั่วเหลือง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 23(2): 149-166.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, แสงเดือน สายแสงทอง, อัครเดช ฝาเรือนดี และ ประชุม จุฑาวรรณนะ. 2539. โรคและโรคระบาดชนิดใหม่ของถั่วเหลืองในเขตภาคกลางระหว่างปี 2537 - 2539. ใน รายงานการสัมมนาการวิจัยและพัฒนาพืชโปรตีนสูง ครั้งที่ 4. 19 -21 มิถุนายน 2539. ณ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 5 จ. สุพรรณบุรี. หน้า 129 - 149.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเข้ม, จารุวัฒน์ เกษธรรมพิทักษ์ และดุสิต อธิณัฐณ์. 2548. การจัดการโรคถั่วเหลืองโดยวิธีผสมผสาน และการใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการ ผลิตถั่วเหลืองฝักสดเอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่องที่ 2. โครงการฝึกอบรมเรื่อง เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชของถั่วเหลืองฝักสดเพื่อเพิ่มผลผลิตและลดการใช้สารเคมี. วันที่ 18 มีนาคม 2548. องค์การบริหารส่วนตำบลแม่เจดีย์ใหม่ เวียงป่าเป้า เชียงราย.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ ชัยสิทธิ์ ปรีชา สุพจน์ กาเข้ม จารุวัฒน์ เกษธรรมพิทักษ์ ดุสิต อธิณัฐณ์ รัชฎาวรรณ เดชมณี ณิชฐิญา เบือนสันเทียะ และ วิลาวรรณ เชื้อบุญ. 2549. การควบคุมโรค ของถั่วเหลืองฝักสดด้วยแบคทีเรียไอเอสอาร์และผลิตภัณฑ์ชีวภาพต่างชนิด, น. 46 - 47. ใน การประชุมวิชาการพืชไร่วงศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 1 เรื่อง “พืชไร่วงศ์ถั่วเพื่อสุขภาพและ ความพอเพียง”. 28 - 30 สิงหาคม 2549. ณ โรงแรมริมกสิศอร์ท อ. เมือง จ. เชียงราย.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2551. หนังสือคู่มือการเกษตร การเตรียมเชื้อและการใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียไอเอสอาร์ด้วยวิธีการอย่างง่ายสำหรับใช้ในระบบการผลิตพืชผัก. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 13 หน้า.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2551. การใช้จุลินทรีย์ในการควบคุมโรค. เกษตรกรรมชาติ. กรุงเทพฯ. น. 32

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ สมศิริ แสงโชติ ศรีเมฆ ชาว โพงพาง สุรเชษฐ จามรमान วิบูลย์ จงรัตนเมธิกุล และทศพล พรพรหม. 2552. หนังสือคู่มือระบบการจัดการศัตรูพืชสำหรับถั่วเหลืองฝักสด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 61 หน้า.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, วิบูลย์ จงรัตนเมธิกุล, สุพจน์ กาเซ็ม, จารุวัฒน์ เกษธรรมพิทักษ์, บงกชรัตน์ ปิตียนต์, โสภณ อูไรชื่น และวินัย ปิตียนต์. 2555. การพัฒนาผลิตภัณฑ์สูตรสำเร็จจุลินทรีย์และสารสกัดพืชเพื่อควบคุมโรคและแมลง และเพิ่มผลผลิตคุณภาพของพืชผัก. ใน รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2553. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ. 233 หน้า.

สุพจน์ กาเซ็ม และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2544. เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสำคัญของถั่วเหลืองตัดเทียมสารเคมี, น. 237-248. ใน การประชุมวิชาการ อารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5. 21 - 23 พฤศจิกายน 2544. โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว กาญจนบุรี.

สุพจน์ กาเซ็ม. 2545. การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกจากผิวใบและดินบริเวณรากถั่วเหลืองที่สามารถควบคุมโรคใบจุดหนูนของถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หฤษฎ์ นิมรักษา. 2551. การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งที่จากรา *Alternaria solani* Sorauer. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อมรรัตน์ ชุมทอง. 2547. การคัดเลือกและการพัฒนาสูตรตำรับของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง (*Vigna subterranean* (L.) Verdc.) ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* Kuhn. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Abadias, M., A. Benabarre, and N. Texiid. 2001. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **Inter. J. food micro.** 65 : 173-182.

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Academic Press, Inc., New York. 922 p.

Aharonowitz, Y. 1980. Nitrogen nutrition and regulation of antibiotic synthesis. **Ann.Rev. Micro** . 34: 209-233.

Aldiwin, L., R. Toso, R. Goodson and J. Hunter. 1990. Improvement of streptavidin. **J. Ind. Micro.** 5:239-246

Aldiwin, L., R. Toso, R. Goodson and J. Hunter. 1990. Improvement of streptavidin. **J. Ind. Micro.** 5:239-246

Allington, W.B. and C.V. Feaster. 1946. The relation of stomata behavior at the time of inoculation to severity of infection of soybean by *Xanthomonas phasioli* var. *sojense* (Hedges) Starr and Burk. **Phytopathology.** 36:385-386

Araujo, F. F., A. A. Henning and M. Hungria. 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World J of Microbiol and Biotech.** 21 : 1639-1645

Betagnoli, B.L., F.K. Dal-Soglio., and J.B. Sinclair. 1996. Extracellular enzyme profiles of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* isolate 2B-12 and two antagonists, *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 and *Trichoderma harzianum* isolate Th008 : I. Possible correlation with of growth and biocontrol. **Physiology Molecular Plant Pathology** 48(3):145-160

- Boiero, L., D. Perrig, O. Masciarelli, C. Penna, F. Cassán and V. Luna . 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Appl Microbiol Biotechnol.** 74(4): 874-80.
- Buensanteai, N., G.Y. Yuen and S. Prathuangwong. 2008. Soybean proteome changes after seed treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 for growth promotion. **In Proc. of RGJ-PH.D. Congress IX Conference.** Apr. 4-6, 2008. Jomtien Plam Beach Resort, Pattaya, Chonburi. 224.
- Burges.H.D. 1998. Beneficial microorganism, nematode and Seed treatments. **Formulation of Microbial Biopesticides.** 289 .
- Campbell, R. 1989. **Biological control of Microbial Plant pathogens.** Cambridge University Press, Cambridge.
- Chen, K. F., S. H. Lai, Shi-Tzao Cheng and S. Shanmugasundaram. 1991. Vegetable soybean seed production technology in Taiwan, pp 45-52. **In Vegetable Soybean Research Needs for Production and Quality Improvement.** Taipei, Taiwan.
- Douglas, G. Inglis, Dan L. Johnson and Mark S. Goettel. 1996. Effect of Bait Substrate and Formulation on Infection of Grasshopper Nymphs by *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology.** 6:35-50.
- Flor, H. H. 1942. Inheritance of pathogenicity in a cross between physiologic races 22 and 24 of *Melampsora lini*. **Phytopathology.** 32, 653-669.
- Fravel, D.R., J.A. Lewis and J.L. Chittams. 1995. Alginate prill formulations of *Talaromyces flavus* with organic carriers for biocontrol of *Verticillium dahliae*. **Phytopathology.** 85 : 165-168.

Giancarlo L. and L.Rolando. 1993. **Biotechnology of Antibiotic and other Bioactive Microbial Metabolites**. Plenum Press, New York.

Greg Volgas, Roger Dowherr and Humberto Lopez. 2003. **Pesticide formulations and application**. System. 261 p.

Hallman, J. A. Quart - Hallmann, W.F. Mahaffee and J. W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultreual crop. Can. **J. Microbiol.** 43:895-914.

Hedges, F. 1994. A study of bacteria pustule of soybean and Comparision of Bacteria phasioli E.F.S. **J. Agar. Res.** 29:229-251.

Hu, W.S and A.L. Demain. 1979. Reglation of antibiotic biosynthesis by utilizable carbon sources. **Process. Biochemistry.** 14: 2-6

Iwai, Y., J. Awaya,T. Kesado,H. Yamada, S. Omusa, and I. Hata. 1973. Selective production of cerulenin by *Cephalosporium caerelens* KF 140. **J. Ferment. Technology.**51: 575-581.

Iwai, Y. and S. Omura. 1982. Culture condition for screening of new antibiotic. **J. Antibiotics** 35: 123-141.

Kaewnum, S., S. Prathangwong and T. J. Burr. 2005. Aggressiveness of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* isolates to soybean and hypersensitivity responses by other plants. **Plant Pathology.** 54, 409-415.

Kanchalee, J. and J. W. Kloepper. 2002. Mixtures of plant growth- promotinf rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant disease. **Biological control.** 285-291.

- Kang, B. R., K. Y. Yang, B. H. Cho Han, I. S. Kim, M. C. Lee, A. J. Anderson and Y. C. Kim. 2006. Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is negatively regulated by the global sensor kinase GacS. **Current Microbiol.** 52 (60): 473-476.
- Kartz, E. and A.L. Demain. 1977. The Peptide antibiotics of bacillus: Chemistry, biosynthesis and possible function. **Bacteriology. Rev.** 41: 449-474.
- Kasem S. and S. Prathuangwong. 2006. Characterization and sequencing analysis genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* pathogenicity genes. **Proc. of RGJ-PH.D. Congress VII Conference.** Apr. 20-22, 2006. Jomtien Plam Beach Resort, Pattaya, Chonburi. 189.
- Larkin, J. C., J. F. Hunsperger, D. Culley, I. Rubenstein, C. D. Silflow. 1989. **The organization and expression of a maize ribosomal protein gene family.** *Genes Dev.* 3:500-509.
- Mckeen, C.D, C.C. Reilly and P.L. Pusey. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. **Phytopathology.** 76: 136-139.
- Mordukhova, E. A., S. L. Sokolov, V.V. Kochetkov, I.A. Kosheleva, N.F. Zelenkova and A.M. Boronin. 2000. Involvement of naphthalene dioxygenase in indole-3-acetic acid biosynthesis by *Pseudomonas putida*. **FEMS Microbiol Lett.** 190(2): 279-285
- Munk vald, G.P. and J.J. Marios. 1993. Efficacy of nature epiphytes and colonizes of grapevine pruning wounds of biological control of *Eutypa dieback*. **Phytopathology.** 83:624-629.
- Nemlienko, E.F. and T.O.Kulik. 1960. Cotyledon bacteriosis of soybean (in Russian), p.173. *In* Sinclair J.B. and O.D.Dhingra (ed.) *An Annotated Bibliography of soybean diseases 1880-1974.* **International Soybean Program.** University of Illinois, Urbama, Illinois, 495 p.

Nakkeeran, S., K. Kavtha, G. Chandrasekar, P. Renukadevi and W. G. D. Fernando. 2006.

Induction of plant defence compounds by *Pseudomonas chlororaphis* PA23 and *Bacillus subtilis* BSCBE4 in controlling damping-off of hot pepper caused by *Pythium aphanidermatum*. **Biocontrol science and Technology**. 16(4):403-416.

Okami, Y., T. Okasake, T. Kitahara and H. Umezawa. 1975. Studies on marine microorganisms : a new antibiotic, aplasmomycin. Produced by a streptomycetes isolate from shallow sea mud. **J. Antibiotics**. 29: 1019-1025.

Phiriyaprasath, S., S. Prathungwong and N. Chagkhan. 2002. Effects of Termite Mound Bacteria on Disease Incidence and Growth of soybean and Acacia. Proc. of the **Summary of the 1st International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease**. Nov. 5-8 2002. Chain Mai. 167.

Prathungwong, S. 1990. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in soil and soybean plant debris in Thailand. Proc. of the 28th Kasetsart Univ. **Sci. Con.** Jan. 29-31, 1990. Bangkok. 63 - 68.

Prathungwong, S. and S. Kasem. 2003. Potential of new antagonists for controlling bacterial pustule increasing soybean yield and reducing bactericide application. Proc. of the **Summary of the 8th International Congress of Plant Pathology**. New Zealand, pp 29-3.26

Prathungwong, S., and S. Kasem. 2004. Screening and evaluation of thermotolerant epiphytic bacteria from soybean leaves for controlling bacterial pustule disease. **Thai J. Agr. Sci.** 37: 1-8.

Prathungwong, S. and N. Buensanteai. 2008. *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 produced indole-3-acetic acid in culture medium and its effect on growth promotion via increased proteome expression and indole-3-acetic acid contain in soybean plant. **Phytopathology** 98 (6, Supplement): S127.

- Ruth G., D. Shtienberg, Y. Elad, E. Fischer and A. Dinour. 2002. Improving Biological Control by Combining Biocontrol Agents Each with Several Mechanisms of Disease Suppression. **Phytopathology**. 976-985.
- Sandrin, C., F. Peypoux and G. Michel. 1990. Coproduction of surfactin and iturin: Lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology. And Appl. Biochemistry**. 12: 370-375.
- Sinclair, J.B. and O. D. Dhingra. 1975. An annotated bibliography of soybean disease 1882-1974. International Soybean Program, University of Illinois, **Urbama Illiosis**, 495 p.
- Singh, V. and D.K. Jain. 1981. **Taxonomy of Angiosperms**. Rastogi publication. 489 p.
- Shaad, N. W. 1988. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. Bacteriology Committee of American Phytopathological Society St. Paul MN. 245 p.
- Shanahan, P., D. J., O'Sullivan, P. Simpson, J. D. Glennon and F. O'Gara. 1992. Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. **Appl. Environ. Microbiol.** 58:353-358.
- Somers, E., D. Ptacek, P. Gysegom, M. Srinivasan and J. Vanderleyden. 2005. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiology**. 71(4): 1803-1810.
- Stahl, E. 1969. Thin - layer Chromatography : A Laboratory Handbook. **Springer-Verlag Inc.**, Berlin.

- Stein, T., J. Vater, V. Kruffs, A. Otto, B. Wittmann-Liebold, P. Franke, M. Panico, R. McDowell, and H. R. Morriss. 1996. The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. **J. Biology. Chemistry.** 271:15428-15435.
- Susan, S. Hirrano and Chirten D. Upper. 2000. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* - a Pathogen, Ice Nucleus and Epiphyte. **Microbiology and Molecular Reviews.** 624-653.
- Suzuki, S., Y. He and H. Oyaizu. 2003 Indole-3-acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. **Current Microbiol.** 47 (2): 138 -143.
- Tereshchenko, B.A. 1978. Cotyledon bacteriosis of soybean. **Rev.of plant pathology.** 57(9) 341.
- Thomashow, S. Linda, R. F. Bonsall and D. M. Weller. 1992. Antibiotic Production by Soil and Rhizosphere Microbes in situ. **Appl. Environ. Microbiol.** 1-17.
- Thowthampitak, J., B. Shaffer, S. Prathuangwong and J. Loper. 2008. Role of rpfF in virulence and exoenzyme production of *Xanthomonas axonopodis* pathovar *glycines*, the causal agent of bacterial pustule of soybean. **Phytopathology.** 98 (12): 1252-1260.
- Tuffile, C.M. and F. Pinho. 1970. Determination of oxygen transfer coefficients in viscous streptomycetes fermentation. **Biotechnology. Bioings.** 12: 849-871.
- Uematsu T., S. Chuenchitt, S. Karnjanarat., S. Vivitrapinda N. Nabheerong., S. Nilimance., W.Dhirabhava and D. Buangsuwon. 1983. Bacterial Disease economic crops in Thailand. **Tropical Agriculture Research Center, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,** Japan and Department Ministry of Agriculture and Cooperative Thailand, Thailand.

- Van, L.L.C and E.A. Van Strain. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol. Mol. Plant Pathology**. 55: 85–97.
- Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters and J. Swing. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. **Int. J. Bacteriol**. 45: 472-489.
- Voronkerrvich, I. V. and T. N. Shmanenkova. 1968. Biological role of extracellular polysaccharides of *Xanthomonas phasioli* var *sojense* (Hedges) Burkholder, the causal agent of soybean bacteriosis (In Russian), **In J. Bacteriol**. pp 249-250.
- Waksman, S. A. 1961. The role of antibiotic in nature. **Perspect. Biol. Med**. 4:27-278.
- Weinberg, E.D. 1970. Biosynthesis of secondary metabolites : role of trace metals. **Adv. Microbiol. Physiology**. 4: 1-44.
- Weinberg, E.D. 1974. Secondary metabolism : control by temperature and inorganic phosphate. **Dev. Ind. Microbiology**. 15: 70-81.
- Yoshida, S. Hiradate, S. Tsukamoto, Hatakedaks, K. and Shirata, A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry. **Phytopathol**. 91:182-187.



ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Nutrient glucose broth (NGB)

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1,000 มิลลิลิตร โดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

Nutrient glucose Agar (NGA)

Nutrient glucose broth		
Agar	15.0	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1,000 มิลลิลิตร โดยแบ่งน้ำครึ่งหนึ่ง (500 มิลลิลิตร) ละลายส่วนประกอบทั้งหมดยกเว้นวุ้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เติมผงวุ้นลงไปหลอมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

King's B medium (KB)

Protease peptone #3	20.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม

Glycerol	15.0	กรัม
----------	------	------

เตรียมในอัตราน้ำ 1000 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีการเตรียม NGA

Luria Bertani broth (LBB)

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Potato	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1,000 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีเตรียม NGB

Malt-yeast extract broth (MY)

Bacto – peptone	5.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1,000 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีเตรียม NGB

MS medium (Molasses and soybean meal) (ซัยลิตี และสุคฤดี, 2548)

Molasses (กากน้ำตาล)	5.0	กรัม
กากถั่วเหลือง	10.0	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

YDCA medium (Yeast extract dextrose calcium carbonate agar)

Dextrose	20.0	กรัม
Yeast	10.0	กรัม
CaCo ₃	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

VS medium (Vinasses and soybean meal)

Vinasses	10.0	กรัม
กากถั่วเหลือง	10.0	กรัม

เตรียมในอัตราน้ำ 1,000 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีเตรียม MS แบ่งใส่ภาชนะตามต้องการ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารสำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย

Motility test Medium

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extrac	5	กรัม
Agar	5	กรัม

เตรียมอาหารดังกล่าวในปริมาตรน้ำ 1,000 มิลลิลิตร โดยปรับ pH ของอาหารประมาณ 6.8-7 เป็นอาหารสำหรับตรวจการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการ stab เชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหาร บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตว่าเชื้อสามารถเจริญออกนอกบริเวณปลูกเชื้อแสดงว่าสามารถเคลื่อนที่ได้

Starch Agar (Starch hydrolysis)

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extrac	5	กรัม
Soluble starch	10	กรัม
Agar	13	กรัม
เตรียมในน้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบการย่อยสลายแป้งได้โดยการหยดน้ำยาไอโอดีน จนทั่วจานเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบ ๆ รอยขีดแสดงว่าเชื่อนั้นสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ Catalase

ทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในหลอดอาหารแข็ง NGA ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดเชื้อ ถ้าภายในหลอดเกิดฟองอากาศ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ Catalase ได้

เอนไซม์ Catalase มีบทบาทในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียให้เป็นออกซิเจนและน้ำได้ดังสมการ



สูตรอาหารสำหรับทดสอบ Oxygen Relationship

เตรียมอาหาร NGA ใส่ลงในหลอดอาหารทดสอบปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ปล่อยให้อาหารเย็นไม่ต้องเอียง นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้อายุ 24 ชั่วโมงมา stab ลงบนอาหารดังกล่าว สังเกตการเจริญและตำแหน่งการเจริญของเชื้อในอาหาร

Simmon' s Sitrte Agar (Citrate utilization)

MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2	กรัม
(NH ₄)H ₂ PO ₄	1.0	กรัม
K ₂ .HPO ₄	1.0	กรัม
Sodium citrate	2.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	13	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
เตรียมในน้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เลี้ยงเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหารที่เตรียม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีอาหาร (Bromthymol blue) ทุกวัน ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าเชื้อสามารถใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอนได้

Hydrolysis of Gelatin (gelatin hydrolysis)

Beef extract	10.0	กรัม
Bacto-peptone	5.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Gelatine	12.0	กรัม
เตรียมในน้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำอุ่น แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ gelatinase ย่อย gelatin เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาพอุณหภูมิห้องย่อยหลอดเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาแช่ในในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส สังเกตการแข็งตัวของเจลาติน ถ้าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ gelatinase ได้ อาหารที่ทดสอบจะไม่แข็งตัว

Levan formulation

เตรียมอาหาร NA (Nutrient Agar) ตามวิธีการข้างต้น เติมน้ำตาล sucrose ลงไปในอัตราส่วน 5 เปอร์เซ็นต์ นำนึ่งฆ่าเชื้อ เทลงใส่จานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ทำการ cross streak เชื้อแบคทีเรียให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 3-5 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี ถ้ามีลักษณะนูนคล้ายโดมหรือเยิ้มมากกว่าปกติ (Control) แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก (positive)

Salt tolerance medium test

เตรียมอาหาร NB ตามวิธีการข้างต้น ผสม NaCl ในอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ (5 และ 7 เปอร์เซ็นต์) แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

Christensen's Urea medium (Urease test)

Bacto-peptone	1.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เป็น 6.8-6.9 เติม phenol red 0.04 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ینگมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เติมน้ำละลาย Urea เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการกรองแบคทีเรียแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี แบ่งอาหารใส่หลอดทดสอบหลอดละ 3-5 มิลลิลิตร เตรียมเป็น slant (aseptic technique)

นำเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง streak ลงบนอาหารเอียงที่เตรียม บ่มเชื้อไว้ประมาณ 5-7 วัน ในสภาพอุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารจากสีเหลืองเป็นสีบานเย็น

Tryptone yeast extract broth (Indole test)

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม

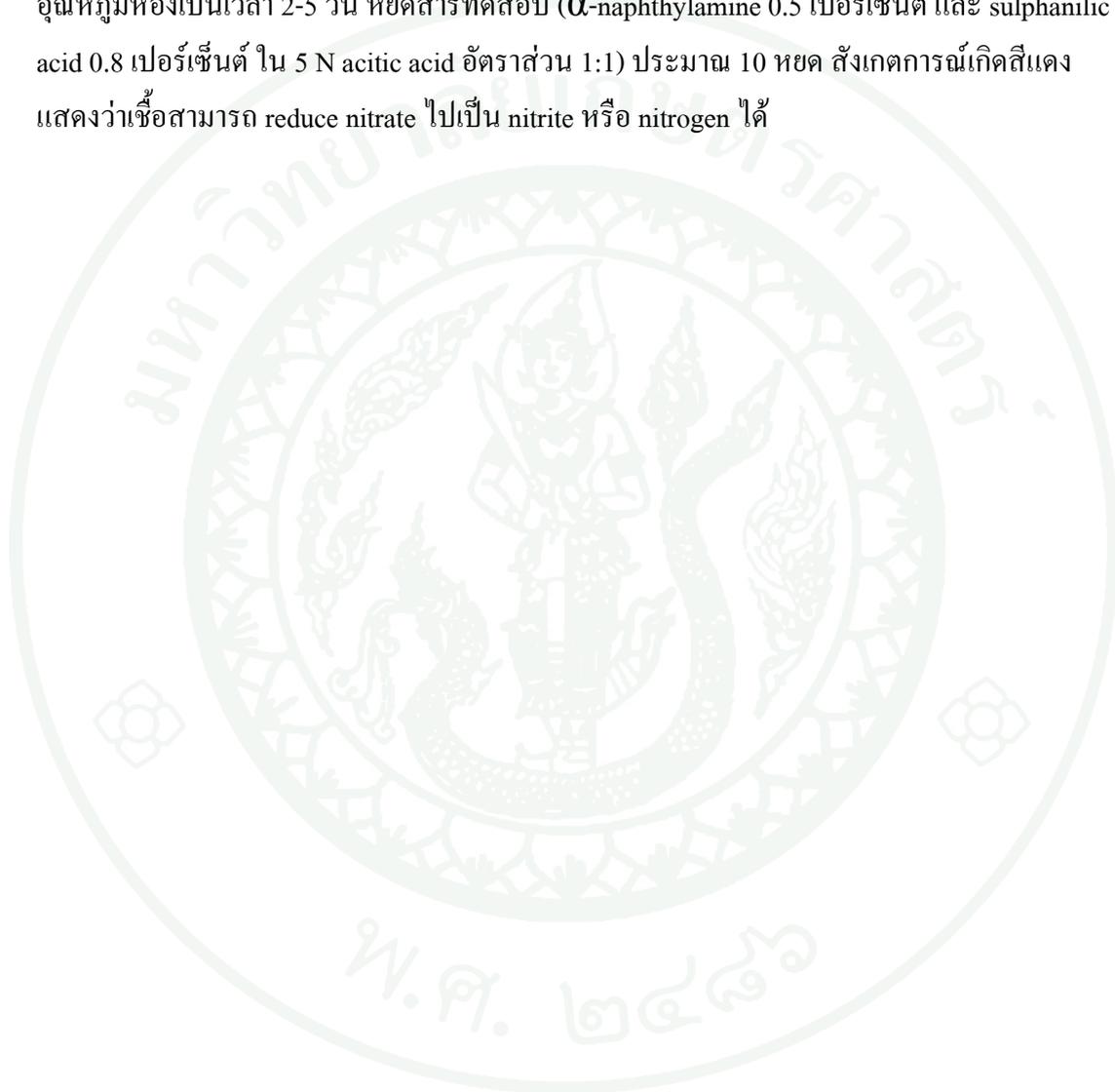
เตรียมน้ำละลายดังกล่าวในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร ย้ายเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมงมาเลี้ยงในอาหาร Tryptone yeast extract broth ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน เติมน้ำละลายทดสอบ (Kovac's reagent) 0.5 มิลลิลิตรลงไป เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน ดูการเกิดสีเปรียบเทียบกับ control

Nitrate broth (Nitrate reduction)

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto-peptone	5.0	กรัม
KNO ₃	1.0	กรัม

เตรียมอาหารในอัตราส่วน 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร หนึ่ง
มาเชื้อ

ทำการทดสอบโดยการย้ายเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหาร nitrate broth บ่มเชื้อที่
อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน หยดสารทดสอบ (α -naphthylamine 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ sulphanilic
acid 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 5 N acetic acid อัตราส่วน 1:1) ประมาณ 10 หยด สังเกตการณ์เกิดสีแดง
แสดงว่าเชื้อสามารถ reduce nitrate ไปเป็น nitrite หรือ nitrogen ได้



ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

Gram's Crystal violet

สารละลาย ก.

Crystal violet	2.0	กรัม
95% Ethanol	20.0	กรัม

สารละลาย ข.

Ammonium	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย ก. และ ข. (Crystal violet ใน 95% Ethanol 20 มิลลิลิตร และสารละลาย 1% ammonium oxalate ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร) ผสมสารทั้ง 2 เข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำมากรองผ่านกระดาษกรอง เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

Safranin solution

Safranin	2.5	กรัม
95% Ethanol	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย Safranin ใน 95% Ethanol แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นนี้
มาเชื้อ

Gram's iodine

Crystal iodine	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม

น้ำกลั่น	300.00	มิลลิลิตร
----------	--------	-----------

ละลาย Potassium iodine ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Crystal iodine ลงในสารละลาย Potassium iodine ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บใส่ขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

Malachite green solution

Malachite green	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	95.0	มิลลิลิตร

ละลาย Malachite green ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร บดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันเติมน้ำกลั่นที่เหลือปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ก่อนนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง (wathman No.1)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ (ภาษาไทย)	นางสาวสุนันทนา นามสกุล นุราภักดิ์
(ภาษาอังกฤษ)	Miss Sunanthanat Nurapak
เกิดวันที่	18 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	บ้านเลขที่ 38 ม. 1 ต. ชะอวด อ. ชะอวด จ. นครศรีธรรมราช 80180
หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail	สาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช (ไทรใหญ่) 109 หมู่ที่ 2 ตำบลถ้ำใหญ่ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110 โทรศัพท์ : 075-773131-2 โทรสาร : 075-773133 E-mail: doremonn@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (พืชศาสตร์) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช (ทุ่งใหญ่)
งานวิจัย	<p>สุนันทนา นุราภักดิ์ วิลาวรรณ เชื้อบุญ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2552. แบททีเรียปฏิชีวนะแบบเชื้อผสมจะผลิต IAA ได้มากขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และลดการเกิดโรคที่บริเวณรากของถั่วเหลือง. ใน รายงานการประชุมวิชาการอัครกาฬพืช ครั้งที่ 9. 24-26 พฤศจิกายน 2552. จ.อุบลราชธานี. หน้า 637-648.</p> <p>สุนันทนา นุราภักดิ์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์ 2554. อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มกิจกรรมการยับยั้งโรคของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. 1-4 กุมภาพันธ์ 2554. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ. กรุงเทพฯ. หน้า 131-140.</p> <p>ติยากร ฉัตรนภรัตน์ สุนันทนา นุราภักดิ์ และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2552. กลไกใหม่ของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดบนถั่วเหลือง. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 47. 14-17 มีนาคม 2552. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ. กรุงเทพฯ. หน้า 592-600.</p>

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ สุพจน์ กาเซ็ม **สุนันทนาถ นูราภักดิ์** วราภรณ์ ภูักคีพันธ์ และนลินา เหมสนิท.

2553. กระบวนการปฏิบัติเพื่อพัฒนาการจัดการโรคข้าวโพดโดยชีววิธี. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดและข้าวฟ่าง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 4. 17-19 มิถุนายน 2553. ณ โรงแรมลพบุรีอินน์ รีสอร์ท จ. ลพบุรี. หน้า 243-259.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ สุพจน์ กาเซ็ม **สุนันทนาถ นูราภักดิ์** วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ และ ดิยากร นัทรนภา รัตน์. 2553. แบคทีเรียปฏิปักษ์ต่างชนิดพืชอาศัยในท้องถิ่นเพื่อการควบคุมโรค ชักนำ ภูมิต้านทานพืช การตอบสนองต่อสูตรผลิตภัณฑ์ และการพัฒนาของข้าวโพด. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดและข้าวฟ่าง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 4. 17-19 มิถุนายน 2553. ณ โรงแรมลพบุรีอินน์ รีสอร์ท จ. ลพบุรี. หน้า 273-284.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ สมศิริ แสงโชติ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง สุรเชษฐ จามรมาน วิบูลย์ จงรัตนเมธิกุล ทศพล พรพรม ดิยากร นัทรนภา รัตน์ **สุนันทนาถ นูราภักดิ์** ดุสิต อธิณวัฒน์ สุพจน์ กาเซ็ม และ จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์. 2552. การตัดสินใจใช้พันธุ์พืชที่เหมาะสมและการลดการใช้ สารเคมีในระบบการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานเพื่อการผลิตถั่วเหลืองฝักสด. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืช ครั้งที่ 9. 24-26 พฤศจิกายน 2552. จ. อุบลราชธานี. หน้า 415-430.

Chuaboon, W., A. Thein, **S. Nurapak** and S. Prathuangwong. 2009. Biological analysis of *Pseudomonas fluorescens* SP007s induced systemic resistance in sweet corn against bacterial leaf streak. *In Proc. of the 1st International Conference on Corn and Sorghum Research*. April 8-10, 2009. Thailand. 37.

Prathuangwong, S., T. Chatnaparat, **S. Nurapak** and D. Athinuwat. 2009. Salicylic acid increased by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 inducer enhances plant resistance against disease under farm production. *In Proc. of the 2nd National Leguminosae Conference*. August 27-29, 2009. Chonburi, Thailand. 13.

ประสบการณ์ในการทำงาน

- ผู้ช่วยวิจัยโครงการ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2550-2551
- นิสิตปริญญาโทช่วยสอนรายวิชา 01008469 โรคของพืชเศรษฐกิจ (Diseases of Economic Crops) ภาคปลาย ปี 2551 และ 2554
- นิสิตปริญญาโทช่วยสอนรายวิชารายวิชา 01008371 หลักการป้องกันกำจัดโรคพืช (Principles of Plant Disease Control) ภาคต้นและภาคปลาย ปีการศึกษา 2553
- นิสิตปริญญาโทช่วยวิจัยโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาโรคของข้าวโพดและข้าวฟ่างในประเทศไทย ได้รับบอชุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2551-2552)
- นิสิตปริญญาโทช่วยวิจัยโครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์และสารสกัดพืช เพื่อควบคุมโรคและแมลง และ เพิ่มผลผลิตคุณภาพของพืชผัก ได้รับบอชุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (2553)
- นิสิตปริญญาโทช่วยวิจัยโครงการวิจัยเรื่อง การจัดการโรคและแมลงศัตรูพืชแบบผสมผสานเพื่อการผลิตถั่วเหลืองและถั่วเหลืองฝักสดอย่างยั่งยืน ได้รับบอชุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2554)
- นิสิตปริญญาโทช่วยวิจัยโครงการเรื่อง การจัดการโรคในระบบผลิตกล้าไม้ยูคาลิปตัส ด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์โดยวิธีผสมผสาน ซึ่งเป็นโครงการความร่วมมือและสนับสนุนงบประมาณวิจัยจาก บริษัท ยูเทค โพรคิวส์ จำกัด (2555)