10.14457/SU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 06:51

รายงานการวิจัย เรื่อง

การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ เพื่อควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

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

มานะ กาญจนมณีเสถียร อัจฉรา เพ็งหนู ฤดีกร วิวัฒนปฐพี และวานิด รอดเนียม

Mana Kanjanamaneesathian, Ashara Pengnoo, Ruedeekorn Wiwattanapatapee and Wanit Rotniam

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

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

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2556

กิตติกรรมประกาศ

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

10.14457/SU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

ชื่อโครงการ การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์
ชื่อผู้วิจัย มานะ กาญจนมณีเสถียร[1] อัจฉรา เพ็งหนู[2] ฤดีกร วิวัฒนปฐพี[2] และวานิด รอดเนียม[3]
หน่วยงานที่สังกัด [1]มหาวิทยาลัยศิลปากร [2]มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ [3]มหาวิทยาลัยทักษิณ
แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 (ต่อเนื่อง 2 ปี)
ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2556
ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์

10.14457/SU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ (1) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium* spp. ในการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ (2) พัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพและคงตัวเพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ และ (3) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์

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

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

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

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

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

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

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

คำสำคัญ : การพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ โรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

10.14457/SUres.2013.8
เลข 07/01/2562 16:06:51

10.14457/SU.res.2013.8
สืบค้น 07/01/2562 16:06:51

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

Researcher Mana Kanjanamaneesathian[1], Ashara Pengnoo[2], Ruedeekorn Wiwattanapatapee[2] and Wanit Rotniam[3]

Office [1]Silpakorn University, [2]Prince of Songkla University and [3]Taksin University

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

Year of Completion 2013

Type of research applied research

Abstract

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10.14457/SU.res.2013.8
ผลิต 07/01/2562 16:06:51

สารบัญ

10.14457/SU.res.2013.8
ย้อน 07/01/2562 16:06:51

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

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ส่วนประกอบของชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ.....	10
4.2 ส่วนประกอบของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น	12
5.1 จังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างพืชปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ต่างๆ ที่พบเชื้อราก่อโรค และใช้ในการทดสอบ.....	16
5.2 ชนิดของเชื้อราก่อโรคที่พบว่าก่อให้เกิดอาการรากเน่าและทำให้เกิดอาการเหี่ยวถาวร กับพืชทดสอบ 3 ชนิด	17
5.3 จำนวน isolates ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกจากฟาร์มในจังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างที่มีการปลูกพืชไฮโดรโพนิกส์ในระบบต่างๆ	18
5.4 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเส้นใยของเชื้อรา *P. helicoides* และพืชที่เป็นแหล่งของเชื้อ.....	20
5.5 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides*	21
5.6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของเชื้อรา *P. helicoides* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์.....	22
5.7 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA	23
5.8 ลักษณะและขนาดของสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	24
5.9 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการเจริญร่วมกันบนอาหารแข็ง PDA	25
5.10 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีคุณสมบัติในการผลิตฮอร์โมน IAA	26
5.11 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides* โดยการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S ribosomal RNA gene	27
5.12 ผลการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของแกรนูลในแต่ละสูตร	28
5.13 ผลการประเมินความกร่อนและความหนาแน่นของแกรนูล	29
5.14 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์แกรนูลละลายน้ำและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ	29
5.15 ปริมาตรของการตกตะกอนของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสูตรต่างๆ	31
5.16 ลักษณะทางกายภาพและการกระจายตัวของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสูตรต่างๆ	31
5.17 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ	32
5.18 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ในชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน	33

10.14457/SU.res.2019.8
มีนา 07/01/2562 16:06:51

5.19 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ในชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นแต่ละสูตร หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 เดือน 33
5.20 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของต้นกล้าผักสลัด green oak ที่ใส่เชื้อรา *P. aphanidermatum* ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง..... 34
5.21 เปอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อราที่รากของต้นกล้าผักสลัดอายุ 30 วัน ที่ปลูก ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง 35
5.22 เปอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อราที่รากผักสลัด red coral ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ 37
5.23 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของรากและต้นผักสลัด red coral ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ 38
5.24 เปอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อราที่รากผักสลัด green oak ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ 39
5.25 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของรากและต้นผักสลัด green oak ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ 40
5.26 ความยาว น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของรากและต้นกวางตุ้งที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์.... 41

10.14457/SU.res.2013.8
วันที่ 07/01/2562 16:06:51

สารบัญภาพ

10.14457/SU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

ภาพที่ **หน้า**

5.1 ลักษณะการยับยั้งเชื้อราก่อโรค *P. helicoides* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis*…….... 19

5.2 ลักษณะของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดแกรนูลละลายน้ำ สูตรที่ 8 ……..... 27

5.3 ลักษณะของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น…… 30

5.4 การตกตะกอนของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น สูตรต่างๆ…… 30

5.5 ระบบการปลูกพืชไฮโดรโพนิกส์ระบบ DRFT ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในการควบคุมโรคราก่า…… 36

10.14457/SU.res.2013.8
สืบค้น 07/01/2562 16:06:51

1. บทนำ

ไฮโดรโพนิกส์ คือเทคโนโลยีการปลูกพืชแบบไม่ใช้ดิน โดยปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีน้ำและปุ๋ยเป็นส่วนประกอบ หรือปลูกบนวัสดุอื่นที่ไม่ใช่ดิน เช่น ทราย กรวด เวอร์มิคิวไลท์ หรือขี้เลื่อย (Jensen, 1991) ระบบการผลิตพืชโดยวิธีนี้ได้ริเริ่มโดย W.F Gericke ในปี ค.ศ 1930 (Gericke, 1940) และในปัจจุบันได้มีการปลูกพืชโดยวิธีไฮโดรโพนิกส์เป็นการค้า แพร่หลายไปยังประเทศต่างๆ ทั่วโลก (Marr, 1994) อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่าพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์มีเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืชเข้าทำลาย (Jensen, 1991; Marr, 1994; Stanghellini and Rasmussen, 1994) ในบางรายงานพบว่า เชื้อโรคและแมลงศัตรูพืชเข้าทำลายพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์มากกว่าการปลูกพืชในดินโดยทั่วไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์มีอุณหภูมิและความชื้นสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโรคและการแพร่ระบาดของแมลง (Menzies *et al* . , 1996; Anonymous, 2002)

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

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

10.14457/KU.res.2013.8
เลขที่ 07701/2562 16:06:51

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

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

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

ในประเทศไทยมีรายงานว่า มีการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์ในระดับอุตสาหกรรมแพร่หลายมากขึ้น แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อโรค ส่วนใหญ่จะมีรายงานเกี่ยวกับอาการผิดปกติของพืชที่เกิดจากปัจจัยอื่นๆ เช่น ธาตุอาหาร อุณหภูมิ และความชื้น ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์และพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราเข้าทำลายพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

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

10.14457/SU.res.2019.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium* spp. ในการปลูกพืชระบบไฮโดรโพนิกส์

2.2 เพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพและคงตัวเพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์

10.14457/SU.res.2019.8
มีนา 07/01/2562 16:06:51

3. สารเคมี อุปกรณ์ และชีวภัณฑ์

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 potato dextrose agar (PDA)

3.1.2 potato dextrose broth (PDB)

3.1.3 PDA double strength

3.1.4 potato carrot agar (PCA)

3.1.5 nutrient agar (NA)

3.2 สารเคมี

3.2.1 lactose monohydrate

3.2.2 alginate, polyvinylpyrrolidone (PVP), starch paste

3.2.3 xanthan gam

3.2.4 sodium carboxy methylcellulose (SCMC)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar air flow cabinet)

3.3.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.3.3 ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven)

3.3.4 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

3.3.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.3.6 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.7 กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.3.8 เครื่องเขย่า (Table rotary shaker)

3.3.9 เครื่องผสม (Planetary mixer)

3.3.10 เครื่องวัดความหนืด (Brookfield DV-III Ultra Programmable Rheometer)

3.3.11 เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง

3.3.12 เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer)

3.3.13 เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น

10.14457/SU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างโรคพืช การแยกเชื้อราสาเหตุโรค และการจำแนกชนิด

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

4.2 การทดสอบการเกิดโรค

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

4.3 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เก็บตัวอย่างรากพืชจากฟาร์มในพื้นที่ที่มีการปลูกพืชด้วยระบบไฮโดรโพนิกส์ในจังหวัดต่างๆ จำนวน 6 ฟาร์ม ได้แก่ ฟาร์มที่มีการปลูกพืชในระบบโฮโดรโพนิกส์ แบบ NFT ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 1 ฟาร์ม นนทบุรี จำนวน 1 ฟาร์ม และชลบุรี จำนวน 1 ฟาร์ม และฟาร์มที่มีการปลูกพืชในระบบโฮโดรโพนิกส์ แบบ Deep water ในจังหวัดเพชรบุรี จำนวน 1 ฟาร์ม อยุธยา จำนวน 1 ฟาร์ม และชลบุรี จำนวน 1 ฟาร์ม โดยตัวอย่างรากพืชที่เก็บจากที่ต่างๆ จะถูกบรรจุในขวดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และมีฝาปิดสนิทป้องกันการปนเปื้อนหรือการรั่วไหลของน้ำ

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

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

10.14457/SU.res.2013.8
มอ 07/01/2562 16:06:51

4.4 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium helicoides*

4.4.1 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium helicoides*

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

4.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium helicoides*

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

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

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

r = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของราชุดทดสอบ

R = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของราชุดควบคุม

10.14457/SU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

4.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium helicoides* ในอาหารเหลว PDB

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

จากนั้นคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. helicoides* ไปทำการคัดเลือกคุณสมบัติที่เหมาะเพื่อพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์

4.5 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสำหรับพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์

4.5.1 การทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 4.2 มาทดสอบเพื่อดูลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง PDA โดยนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มา streak บนอาหาร PDA บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สังเกตและบันทึกการเจริญเติบโต

10.14457/SU.res.2015.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

4.5.2 การตรวจดูลักษณะและวัดขนาดสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

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

4.5.3 การทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร PDA

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

4.5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการผลิตฮอร์โมน IAA

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

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. helicoides* ได้ดีที่สุด จำนวน 3 สายพันธุ์เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำและของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น สำหรับใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ต่อไป

10.14457/SU.res.2013.8
เลขที่ 07/01/2562 16:06:51

4.6 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

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

4.7 การเตรียมและประเมินผลชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

4.7.1 การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์

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

4.7.2 การเตรียมชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

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

10.14457/SU.res.2019.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบของชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

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

4.7.3 การประเมินผลชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

4.5.3.1 การประเมินสมบัติทางกายภาพของชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

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

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

คัดเลือกสูตรที่สามารถละลายน้ำได้รวดเร็ว ได้สารละลายใส ไม่มีตะกอน และมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างไม่สูงหรือต่ำเกินไป นำไปทดสอบค่าความกร่อนและความหนาแน่นต่อไป

3) วัดค่าความกร่อน (friability) โดยใส่ตัวอย่างชีวภัณฑ์แกรนูลจำนวน 10 กรัมในเครื่องวัดความกร่อน Roche Friabilator ใช้ความเร็ว 25 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 นาที จากนั้นนำไปผ่านแร่งเบอร์ 18 แล้วชั่งน้ำหนักส่วนที่อยู่บนแร่ง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความกร่อนของแกรนูล ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

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

จากนั้นคัดเลือกชีวภัณฑ์สูตรที่ดีที่สุดไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพ

4.5.3.2 การประเมินสมบัติทางชีวภาพของชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

1) ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์ ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์ โดยสุ่มวัด 3 ครั้ง แล้วนำมา drop plate บนอาหาร plate count agar (PCA) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี และคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดในชีวภัณฑ์ (cfu ต่อกรัม)

2) การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์

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

4.8 การเตรียมและประเมินผลชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

4.8.1 การเตรียมชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

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

10.14457/CU.res.2015.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

10.14457/SU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

ตารางที่ 4.2 ส่วนประกอบของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

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

4.8.2 การประเมินผลสมบัติทางกายภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

1) ปริมาตรการตกตะกอน (sedimentation volumn)

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

$$F = H_u/H_0$$

F = ปริมาตรของการตกตะกอน (sedimentation volume)

H_u = ส่วนสูงสุดท้ายของตะกอนเมื่อวางทิ้งไว้ระยะเวลาหนึ่ง

H_0 = ส่วนสูงเริ่มต้นก่อนการตกตะกอนหรือส่วนสูงทั้งหมดก่อนการตกตะกอน

2) การกระจายตัวคืนรูป (redispersibility) ของชีวภัณฑ์

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

4.8.3 การประเมินผลสมบัติทางชีวภาพภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

นำชีวภัณฑ์ที่เตรียมได้ไปทดสอบสมบัติทางชีวภาพ ได้แก่ การนับจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์และการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ ซึ่งทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4.5.3.2

10.14457/SU.res.2015.8
วันที่ 07/01/2562 16:06:51

4.9 การทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องที่เวลาต่างๆ

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

4.10 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับพืชในห้องปฏิบัติการ

4.10.1 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 1

ทำการเพาะกล้าผักสลัด (*Lactuca sativa*) เมื่อต้นกล้าอายุได้ 14 วัน ย้ายต้นกล้าไปวางบนฟองน้ำที่มีชิ้นวุ้นของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ *Pythium aphanidermatum* วางอยู่ แล้วนำไปวางปลูกบนถาดเพาะกล้าอันใหม่ จากนั้นจึงดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์กับพืช โดยกำหนดให้มี 4 กรรมวิธีการทดลอง ดังนี้ กรรมวิธีทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุม คือต้นกล้าที่ราดด้วยน้ำ กรรมวิธีทดลองที่ 2 คือต้นกล้าที่ราดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% Blank SC) กรรมวิธีทดลองที่ 3 คือต้นกล้าที่ราดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* จำนวน 10^{12} CFU /ml (1% SC) และกรรมวิธีทดลองที่ 4 คือต้นกล้าที่ราดด้วยเซลล์สดของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* จำนวน 10^{14} CFU /ml (1% fresh cell) โดยทั้ง 4 กรรมวิธีทดลองได้รับของเหลวกรรมวิธีทดลองละ 500 ml (โดยแต่ละกรรมวิธีทดลองมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยกล้าผักสลัดจำนวน 4 ต้น) ทำการเช็คผลการทดลองโดยนับจำนวนต้นกล้าที่มีชีวิตภายหลังการราดของเหลว 15 และ 30 วันตามลำดับ

4.10.2 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 2

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

10.14457/SU.res.2019.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

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

4.11 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับพืชในโรงเรือนปลูกพืชระบบ dynamic root floating technique (DRFT)

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

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

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

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

10.14457/SU.res.2019.8
ลงวันที่ 07/01/2562 16:06:51

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

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

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

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

10.14457/SU.res.2013.8
มอ 07/01/2562 16:06:51

5. ผลการทดลองและวิจารณ์

5.1 การเก็บตัวอย่างโรคพืช การแยกเชื้อราสาเหตุโรค และการจำแนกชนิด

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

ตารางที่ 5.1 จังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างพืชปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ต่างๆ ที่พบเชื้อราก่อโรคและใช้ในการทดสอบ

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

10.14457/SU.res.2013.8
วันที่ 07/01/2562 16:06:51

5.2 การทดสอบการเกิดโรค

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

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

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

ตารางที่ 5.2 ชนิดของเชื้อราก่อโรคที่พบว่าก่อให้เกิดอาการรากเน่าและทำให้เกิดอาการเหี่ยวถาวรกับพืชทดสอบ 3 ชนิด

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

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

10.14457/KU.res.2019.8
ธันวาคม 2562 16:06:51

5.3 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

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

ตารางที่ 5.3 จำนวน isolates ของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกจากฟาร์มในจังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างที่มีการปลูกพืชไฮโดรโพนิกส์ในระบบต่างๆ

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

จากตารางจะเห็นได้ว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากรากพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ได้จำนวนมาก ดังนั้นรากของพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์จึงถือว่าเป็นแหล่งของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และน่าจะเป็นส่วนของพืชที่ผู้วิจัยสามารถใช้เป็นแหล่งค้นหาเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธ์ใหม่ๆ ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคพืชหรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยเฉพาะพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ต่อไป

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

5.4 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium helicoides*

5.4.1 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides*

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

10.14457/KU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

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

5.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิปักษ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides*

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

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

ตารางที่ 5.4 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีศักยภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเส้นใยของเชื้อรา *P. helicoides* และพืชที่เป็นแหล่งของเชื้อ

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

10.14457/KU.res.2015.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

ตารางที่ 5.5 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. helicoides*

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

** แตกต่างทางสถิติที่ P< 0.01 อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

10.14457/SU.res.2019.8
เรื่อง 07/01/2562 16:06:51

10.14457/SU.res.2015.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

5.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium heliciodes* ในอาหารเหลว PDB

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

ตารางที่ 5.6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของเชื้อรา *P. helicoides* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

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

** แตกต่างทางสถิติที่ P< 0.01 อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

10.14457/SU.res.2019.8
สืบค้น 07/01/2562 16:36:51

5.5 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสำหรับพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์

5.5.1 การทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 6 สายพันธุ์ ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 4.2 มาทดสอบเพื่อดูการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง PDA พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลา 1 วัน เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์121 C/4 สามารถเจริญได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สายพันธุ์ 097 A/3 และ สายพันธุ์ 129 C/1 ตามลำดับ (ตารางที่ 5.7)

ตารางที่ 5.7 การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA

สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ระยะเวลาบ่มเลี้ยงเชื้อ (วัน)				
	1	2	3	4	5
1. 029 C/1	+1	+2	+3	+4	+4
2. 029 C/7	0	+1	+3	+4	+4
3. 097 A/3	+3	+4	+4	+4	+4
4. 121 C/4	+4	+4	+4	+4	+4
5. 123 B/2	+1	+2	+3	+4	+4
6. 129 C/1	+2	+4	+4	+4	+4

หมายเหตุ 0 = เชื้อไม่เจริญเติบโต
+1 = เชื้อเจริญเติบโตได้
+2 = เชื้อเจริญเติบโตได้ปานกลาง
+3 = เชื้อเจริญเติบโตได้ดี
+4 = เชื้อเจริญเติบโตได้ดีมาก

5.5.2 การตรวจดูลักษณะและวัดขนาดของสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 6 สายพันธุ์ มาย้อมแกรมดูลักษณะและวัดขนาดของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สายพันธุ์ 129 C/1 มีขนาดสปอร์ยาวที่สุด (2.69 μm) รองลงมา คือ สายพันธุ์ 123 B/2, สายพันธุ์ 121 C/4 และ สายพันธุ์ 029 C/7 มีขนาดสปอร์เท่ากับ 2.26, 1.80 และ 1.57 μm ตามลำดับ (ตารางที่ 5.8)

10.14457/SU.res.2019.8
วันที่ 07/01/2562 16:06:51

ตารางที่ 5.8 ลักษณะและขนาดของสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

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

** แตกต่างทางสถิติที่ P< 0.01 อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

5.5.3 การทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร PDA

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

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

ตารางที่ 5.9 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการเจริญร่วมกันบนอาหารแข็ง PDA

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

10.14457/KU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

5.5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการผลิตฮอร์โมน IAA

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

ตารางที่ 5.10 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีคุณสมบัติในการผลิตฮอร์โมน IAA

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

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

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ 129C/1 มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่า สามารถเจริญเติบโตได้ดีและเร็ว มีลักษณะสปอร์และขนาดสปอร์ที่เหมาะสม ดังนั้นเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงในการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปควบคุมโรครากเน่าในสภาพธรรมชาติ เช่นเดียวกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดังกล่าวไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบแกรนูลละลายน้ำและของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสำหรับใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ต่อไป

5.6 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

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

10.14457/SU.res.2019.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

10.14457/SU.res.2019.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

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

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

***หมายเหตุ** ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA ทั้งสาย Forward และ Reverse ด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัตินำข้อมูลลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม NCBI แสดงในภาคผนวก (1)

5.7 การเตรียมและประเมินผลชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

5.7.1 การเตรียมชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

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

ภาพที่ 5.2 ลักษณะของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดแกรนูลละลายน้ำ สูตรที่ 8

5.7.2 การประเมินผลชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

5.7.2.1 การประเมินสมบัติทางกายภาพของชีวภัณฑ์

10.14457/SU.res.2019.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

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

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

ตารางที่ 5.12 ผลการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของแกรนูลในแต่ละสูตร

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

** แตกต่างทางสถิติที่ P< 0.01 อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

10.14457/SU.res.2013.8
เมื่อ 01/01/2562 16:06:51

ตารางที่ 5.13 ผลการประเมินความกร่อนและความหนาแน่นของแกรนูล

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

** แตกต่างทางสถิติที่ P< 0.01 อักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากการตรวจสอบโดย DMRT

5.7.2.2 การประเมินสมบัติทางชีวภาพของชีวภัณฑ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

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

ตารางที่ 5.14 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์แกรนูลละลายน้ำและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ

ชีวภัณฑ์แกรนูลละลายน้ำ	ปริมาณแบคทีเรียในชีวภัณฑ์ (cfu/g)	การยับยั้งเชื้อรา *Aphanomyces* sp. **(%)**
B. velezensis	2.38×10^{10}	96.00

5.8 การเตรียมและประเมินผลชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

5.8.1 การเตรียมชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

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

10.14457/SU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

ภาพที่ 5.3 ลักษณะของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

5.8.2 การประเมินผลสมบัติทางกายภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

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

ภาพที่ 5.4 การตกตะกอนของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสูตรต่างๆ

10.14457/SUres.2015.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

ตารางที่ 5.15 ปริมาตรของการตกตะกอนของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสูตรต่างๆ

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

ตารางที่ 5.16 ลักษณะทางกายภาพและการกระจายตัวของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสูตรต่างๆ

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

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

10.14457/SU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

5.8.3 การประเมินผลสมบัติทางชีวภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

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

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

ตารางที่ 5.17 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ที่มีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ

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

5.9 การทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในชีวภัณฑ์ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องที่เวลาต่างๆ

5.9.1 ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์แกรนูลชนิดละลายน้ำ

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

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

ชีวภัณฑ์แกรนูลละลายน้ำ	จำนวนแบคทีเรีย (cfu/g.)					
	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่ 5	เดือนที่ 6
B. velezensis	2.4×10^{10}	2.5×10^{9}	9.0×10^{7}	3.0×10^{7}	3.0×10^{7}	3.2×10^{11}

10.14457/SURes.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

5.9.2 ชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น

เมื่อเก็บชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในภาชนะที่มีฝาปิด และวางเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของชีวภัณฑ์แต่ละสูตร ตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีชีวิตรอด เป็นระยะเวลา 6 เดือน ผลการทดลองพบว่าชีวภัณฑ์ในแต่ละสูตร มีความคงสภาพเหมือนครั้งแรกที่ผลิตเสร็จ ไม่ปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น มีปริมาณเชื้อที่อยู่รอดในชีวภัณฑ์สูง

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

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

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

10.14457/SU.res.2019.8
ธันวาคม 07/01/2562 16:06:51

5.10 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับพืชในห้องปฏิบัติการ

5.10.1 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 1

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 1 พบว่า กรรมวิธีทดลองที่ 2 คือ ต้นกล้าที่ราดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% Blank SC) กรรมวิธีทดลองที่ 3 คือต้นกล้าที่ราดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% SC) และกรรมวิธีทดลองที่ 4 คือต้นกล้าที่ราดด้วยเซลล์สดของเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% fresh cell) มีจำนวนต้นรอดตายมากกว่ากรรมวิธีทดลองที่ 1 คือต้นกล้าที่ราดด้วยน้ำเป็นชุดควบคุม เมื่อทำการเช็คผลการทดลองโดยนับจำนวนต้นกล้าที่มีชีวิตภายหลังการราดของเหลว 15 และ 30 วันตามลำดับ (ตารางที่ 5.20)

การที่ชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการทำให้ต้นกล้าผักสลัดมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าชีวภัณฑ์ชนิดนี้ (ที่มีแบคทีเรีย *B. velezensis* เป็นองค์ประกอบและเป็นแบคทีเรียชนิดที่ผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ) มีประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมโรคที่เกิดจากเส้นใยของเชื้อราได้ โดยชีวภัณฑ์นี้อาจจะนำมาใช้ในระหว่างการเพาะกล้าผักที่ต้องการผลิตในระบบไฮโดรโพนิกส์ เพื่อป้องกันต้นกล้าผักจากเชื้อราสาเหตุที่อาจจะปนเปื้อนกับวัสดุเพาะเมล็ด เช่น ถาดเพาะเมล็ด หรือฟองน้ำที่ใช้ในการเพาะเมล็ดและเลี้ยงต้นกล้าผักก่อนย้ายปลูกลงในระบบไฮโดรโพนิกส์

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

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับ $p< 0.01$

10.14457/SU.res.2013.8
เลข 07/01/2562 15:06:51

5.10.2 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 2

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

ตารางที่ 5.21 เปอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อราที่รากของต้นกล้าผักสลัดอายุ 30 วัน ที่ปลูกในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับ $p< 0.01$

การที่ชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการทำให้เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อราสาเหตุที่ปลายรากน้อยกว่าชุดควบคุม เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าชีวภัณฑ์ชนิดนี้ (ที่มีแบคทีเรีย *B. velezensis* เป็นองค์ประกอบและเป็นแบคทีเรียชนิดที่ผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ) นอกจากจะใช้ในการป้องกันต้นกล้าผักจากเชื้อราสาเหตุที่อาจจะปนเปื้อนกับวัสดุเพาะเมล็ด เช่น ถาดเพาะเมล็ด หรือฟองน้ำที่ใช้ในการเพาะเมล็ดและเลี้ยงต้นกล้าผักแล้ว ยังน่าจะมีศักยภาพในการนำไปใช้โดยการผสมลงในสารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้ปลูกพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์ด้วยเช่นกัน ทั้งนี้การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคโดยการใช้ในลักษณะการผสมเชื้อปฏิปักษ์ในสารละลายเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าจะเป็นทางเลือกในการนำส่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อให้ได้ผลในการป้องกันและควบคุมโรคพืชและมีรายงานการใช้วิธีการดังกล่าวในต่างประเทศ (Liu *et al*., 2007) อย่างไรก็ตามการนำส่งชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการใส่ในสารละลายธาตุอาหารโดยเฉพาะกับพืชที่ปลูกในระบบ DRFT อาจจำเป็นต้องใช้ปริมาณชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวนมาก สำหรับในประเทศไทยมีการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* อย่างแพร่หลาย โดยใช้ใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารที่ใช้ปลูกผักไฮโดรโพนิกส์หลายชนิดที่ปลูกในระบบ NFT และพบว่า ชีวภัณฑ์เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าและเพิ่มปริมาณผลผลิตของผักไฮโดรโพนิกส์ได้ (จิระเดช 2547)

10.14457/SU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

5.11 การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นกับพืชในโรงเรือนปลูกพืชระบบ dynamic root floating technique (DRFT)

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

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

ภาพที่ 5.5 ระบบการปลูกพืชไฮโดรโพนิกส์ระบบ DRFT ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* ชนิดของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นในการควบคุมโรครากเน่า

10.14457/SU.res.2019.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

การที่ชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นที่ใช้โดยการฉีดพ่นไปยังรากของพืชที่แสดงอาการโรคแล้วมีประสิทธิภาพในการทำให้เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อราสาเหตุที่ปลายรากน้อยกว่าชุดควบคุม เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าชีวภัณฑ์ชนิดนี้ นอกจากจะใช้ในการป้องกันต้นกล้าผักจากเชื้อราสาเหตุที่อาจจะปนเปื้อนกับวัสดุเพาะเมล็ด เช่น ถาดเพาะเมล็ด หรือฟองน้ำที่ใช้ในการเพาะเมล็ดและเลี้ยงต้นกล้าผัก หรือใช้โดยการผสมลงในสารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้ปลูกพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์ แล้ว ยังน่าจะมีศักยภาพในการนำไปใช้โดยการฉีดพ่นกับรากพืชที่เป็นโรคแล้วโดยตรง ทั้งนี้การใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคโดยทั่วไปมักใช้ในลักษณะการผสมเชื้อปฏิปักษ์ในสารละลาย (Liu *et al*., 2007) การนำส่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการฉีดพ่นชีวภัณฑ์ในการทดลองนี้เป็นการทดสอบในลักษณะที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และถึงแม้ว่าลักษณะการใช้ชีวภัณฑ์โดยการฉีดพ่นอาจมีความยุ่งยากในทางปฏิบัติ แต่การทดลองนี้เป็นหลักฐานที่ชี้ให้เห็นว่าการฉีดพ่นชีวภัณฑ์ที่มีเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสามารถลดความรุนแรงของโรคได้

ตารางที่ 5.22 เปอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อราที่รากผักสลัด red coral ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับ $p< 0.05$

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

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

จากการที่ชีวภัณฑ์มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* ที่มีคุณสมบัติในการผลิตฮอร์โมน IAA เป็นองค์ประกอบ ซึ่งฮอร์โมน IAA นี้น่าจะมีผลโดยตรงในการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดของส่วนยอดในการทดลองนี้

10.14457/SU.res.2019.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

ตารางที่ 5.23 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของรากและต้นผักสลัด red coral ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

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

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

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

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

10.14457/SU.res.2013.8
ลงวันที่ 07/01/2556 16:06:51

ตารางที่ 5.24 เปอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อราที่รากผักสลัด green oak ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับ $p< 0.01$

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

10.14457/SU.res.2019.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

ตารางที่ 5.25 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของรากและต้นผักสลัด green oak ในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เมื่อปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

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

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

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดกวางตุ้ง (*B. campestris* var. *chinensis*) พบว่าต้นกล้าผักกาดกวางตุ้งที่ราดด้วยชีวภัณฑ์ของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้น 1% ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *B. velezensis* (1% SC) สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของส่วนยอดได้มากกว่ากรรมวิธีชุดควบคุม คือรากผักสลัดที่ราดด้วยน้ำ (ตารางที่ 5.26)

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

10.14457/SU.res.2013.8
เลขที่ 07/01/2562 16:06:51

ตารางที่ 5.26 ความยาว น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของรากและต้นกวางตุ้งที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการตรวจสอบโดย DMRT

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

6. สรุป

การศึกษาวิจัยนี้พบว่าเชื้อราก่อโรคในระบบไฮโดรโพนิกส์มีหลายชนิด เช่น *P. myriotyrum, P. helicoides, P. carolinianum* และ *P. dissotocum* รวมทั้งราที่มีรายงานว่าก่อโรคที่พบในน้ำและดิน เช่น *Aphanomyces* sp. การศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ ที่มีรายงานว่าเชื้อราก่อโรคในระบบไฮโดรโพนิกส์ คือ *P. aphanidermatum* ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้จึงได้ทำการทดสอบผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ได้แก่เชื้อ *B. velezensis*) ที่มีต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราก่อโรคที่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์น่าจะมีศักยภาพในการควบคุมโรคและเชื้อราก่อโรคได้ดีกว่าการทดสอบกับเชื้อราก่อโรคชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว

นอกจากประเด็นในเรื่องของความหลากหลายของเชื้อราก่อโรค และ ความรุนแรงของโรคที่รา ดังกล่าวสามารถทำให้เกิดโรคกับผักที่ปลูกโดยระบบไฮโดรโพนิกส์ที่สำคัญๆ แล้ว การศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูลต้นแบบในประเด็นต่างๆ ที่สำคัญ ดังต่อไปนี้คือ

(1) พบว่าส่วนของพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์ และสภาพแวดล้อมในระบบปลูก เป็นแหล่งที่อยู่ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์หลากชนิดที่มีคุณสมบัติดีในการควบคุมโรคและเชื้อราก่อโรค รวมทั้งมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืช ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคและเชื้อราก่อโรคได้

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

10.14457/SUres.2015.8
วันที่ 07/01/2562 16:06:51

และยังคงประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราก่อโรคได้และมีประสิทธิภาพให้ผลในการควบคุมเชื้อราก่อโรคในสภาพโรงเรือน

(3) พบว่าวิธีการฉีดพ่นเป็นวิธีการนำส่งชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพได้วิธีการหนึ่ง

อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยในรายงานนี้ยังอยู่ในขั้นของการวิจัยและพัฒนา และยังจำเป็นต้องขยายขอบเขตการศึกษาไปยังฟาร์มปลูกพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์ของเอกชนที่ทำการปลูกพืชในระบบที่แตกต่างออกไป เช่น ระบบ NFT ซึ่งจะทำให้ระบบนำส่งชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แตกต่างกันออกไป

นอกจากนั้นยังพบว่าต้นทุนของการผลิตชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สำหรับชีวภัณฑ์ของเหลว (suspension concentrate formulation) เท่ากับ 135 บาทต่อลิตร ซึ่งมีราคาที่ค่อนข้างสูง ซึ่งอาจจะเป็นอุปสรรคต่อการนำไปใช้โดยเกษตรกรผู้ปลูกพืชในระบบไฮโดรโพนิกส์ โดยเฉพาะหากจำเป็นต้องนำส่งโดยวิธีการที่จะต้องใช้ชีวภัณฑ์มาก

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

กิตติกรรมประกาศ

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

10.14457/SU.res.2013.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

เอกสารอ้างอิง

จิระเดช แจ่มสว่าง 2547 การควบคุมโรคผักโดยชีววิธี เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีในการปลูกผักระบบไม่ใช้ดินและภายในโรงเรือน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (ชุดโครงการ-การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน) วันที่13กุมภาพันธ์ 2547 ณ. อาคารเจ้าคุณทหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาลาดกระบัง กรุงเทพฯ

Anonymous. 2002. Greenhouse tomato (*Lycopersicon esculentum*): Commercial vegetable productionguides. Oregon State University.U.S.A. (http://oregonstate.edu/Dept/NWREC/tomatogh.html). 13 pages.

Chatterton, S. 2002. Biological control of Pythium root rot of bell peper (*Capsicum annum* L.) in a small – scale hydroponic syatem. M. Sc. Thesis,University of Guelph, Guelph, Canada.

De Jonghe, K., De Dobbelaere, I., Sarrazyn, R. and Höfte, M. 2005a. Control of *Phytophthora cryptogea* in the hydroponic forcing of witloof chicory with the rhamnolipid-based biosurfactant formulation PRO1. Plant Pathology. 54: 219-226.

De Jonghe, K., De Dobbelaere, I., Sarrazyn, R. and Hofte, M. 2005. Control of brown root rot caused by *Phytophthora cryptogea* in the hydroponic forcing witloof chicory (*Cichorium intybus* var. *foliosum*) by means of a nonionic surfactant. Crop Protection. 24: 771-778.

Fravel, D.R. and Larkin, R.P. 2002. Reduction of *Fusarium* wilt of hydroponically grown basil by *Fusarium oxysporum* strain CS-20. Crop Protection. 21: 539-543.

Gericke, W.F. 1940. The Complete Guide to Soilless Gardening. Prentice Hall, New York. U.S.A.

Grosch, R., Junge, H., Krebs, B. and Bochow, H. 1999a. Use of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent. III. Influence of *Bacillus subtilis* on fungal root diseases and on yield in soilless culture. Journal of Plant Diseases and Protection. 106 (6): 568-580.

Grosch, R., Kofoet, A. and Junge, H. 2001. Biological control of root pathogen in soilless culture using bacteria. Acta Horticulturae. 548 : 393-400.

Grote, D. and Bucsi, C. 1998. Chemical control of *Phytophthora nicotianae* on tomato roots with fosetyl-alumimiun in hydroponics. Gartenbauwwissenschaft. 63 (2): 78-87.

Jenkins, D.G., Cook, K.L., Garland, J.L. and Board, K.F. 2000. *Pythium* invasion of plant-based life support system: biological control and sources. Life Support Biosphere and Science: International Journal of Earth Space. 7 (2): 209-218.

Jensen, M.H. 1991. Hydroponic culture for the tropics: opportunities and alternatives. Food and Fertilizer Technology Center. University of Arizona, Tucson, U.S.A. (http://www.agnet.org/library/article/eb329.html). 15 pages.

Kanajanamaneesathian, K., Kusonwiriyawong, C., and Pengnoo, A., 1998. Screening of bacterial antagonists for control of sheath blight in rice and development of suitable bacterial fomulation for effective application. Australasian Plant Pathology. 27:198-206.

Kanajanamaneesathian, K., Wiwattanapatapee, R., Pengnoo, A., Oungbho, K. and Chumthong A. 2007. Efficacy of Novel formulation of *Bacillus megaterium* in suppressing sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. Plant Pathology Journal. 6(2): 195-201.

Khan, A., Sutton, J.C. and Grodzinski, B. 2003. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* on *Pythium aphanidermatum* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponic troughs. Biocontrol Science and Technology. 13 (6): 615-630.

Liu, W., Sutton, J.C., Grodzinski, B., Kloepper, J.W. and Reddy, M.S. 2007. Biological control of Pythium root rot of Chrysanthemum in small-scale hydroponic units. Phytoparasitica 35 (2): 159-178.

Leelasuphakul, W., Sivanunsaku, P. and Phongpaichit, S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of ß-1,3- glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. Enz. Microb. Technol. 38 : 990-997.

Marr, C.W. 1994. Hydroponic systems: Greenhouse vegetable production. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, U.S.A. 11 pages.

Mayano, C., Roposo, R., Gomez, V. And Melgarejo, P. 2003. Intergrated *Botrytis cinerea* managment in southeastern Spanish greenhouse. Journal of Phytopthology. 151:80-85

Menzies, J.G., Ehret, D.L., and Stan, S. 1996. Effect of inoculum density of *Pythium aphanidermatum* on the growth and yield of cucumber plants grown in recirculating nutrient film culture. Canadian Journal of Plant Pathology. 18 (1): 50-54.

Muslim, A., Horinouchi, H., and Hyakumachi, M. 2003. Control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with hypovirulent binucleate *Rhizoctonia* in soil and rock wool systems. Plant Disease. 87 (6): 739-747.

Nene, Y.L. and Thapliyal, P.N. 1993. Fungicides in Plant Disease Control. New Delhi: Oxford & IBH publishing Company.

10.14457/SU.res.2013.8
วันที่ 07/01/2562 16:06:51

Pengnoo, A., Kusonwiriyawong, C., Niltatana, L. and Kanjanamaneesathian, M. 2000. Greenhouse and field trails of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizotonia solani*. BioControl Journal. 45:245-256.

Plaats-Niterink, A.J.V. 1981. Monograph of the Genus *Pythium*. Centraalbureau Voor Schimmelculture, Baarn, Institute of Royal Netherland Academy of Science Letters. Mycological Number 21.

Rey, P., Model, P., and Tirilly, Y. 1997. *Pythium* f induce a minor but ubiquitous disease in tomato soilless cultures. Plant Pathology. 79 : 173-180.

Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant disease. Bioscience Bioengineering. 89 : 515 – 521.

Shogi, J. 1978. Recent chemical studies on peptide antibiotics from the genus *Bacillus*. Adv. Applied Microbiology. 24 : 187-214.

Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., and Liu, X. 2004. Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. Crop Protection. 23: 243-247.

Stanghellini, M.E. and Rasmussen, S.L. 1994. Identification and origin of plant pathogenic microorganisms in recirculating nutrient solutions. Advanced in Space Research. 14 (11): 349-355.

Sutton, J.C., Yu, H., Grodzinski, B., and Johnstone, M. 2000. Relationships of ultraviolet radiation dose and inactivation of pathogen propagules in water and hydroponic nutrient solutions. Canadian Journal of Plant Pathology. 22 (3): 300-309.

Vestergard, B. 1994. Establishing and maintaining specific pathogen free (SPF) conditions in aqueous solutions using ozone. Advanced in Space Research. 14 (11): 387-393.

Von Der Weid, I., Alviano, D.S., Santo, A.LS., Soares, R.M.A., Alviano, C.S. and Seldin, L. 2003. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. Appl. Microbiol. 95 : 1143-1151.

Wiwattanapatapee, R., Pengnoo, A., Kanjanamaneesatian, M., Nilratana, L. and Jantharangsri, A. 2004. Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice:formulations, viability and bacterial release studies. Journal of Controlled Release. 95:453-460.

Wiwattanapatapee, R., Chumthong, A., Pengnoo, A. and Kanjanamaneesathian, M. 2007. Effervescent fast-disintegrating bacterial formulation for biological control of rice sheath blight. Journal of Controlled Release. 119, 229-235.

Zheng, J., Sutton, J.C. and Yu, H. 2000. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, root, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. Canadian Journal of Plant Pathology. 22 (4): 368-379.

10.14457/SUres.2013.8
วันที่ 07/01/2562 16:06:51

ภาคผนวก

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

10.14457/SU.res.2013.8
เข้าเมื่อ 07/01/2562 16:06:51

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

10.14457/SU.res.2019.8
เมื่อ 07/01/2562 16:06:51

(2) รายการผลงานทางวิชาการที่ได้เผยแพร่แล้ว และที่อยู่ระหว่างการพิจารณาเผยแพร่จากการดำเนินการโครงการวิจัย

เรื่อง: การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

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

หมายเหตุ: เรียงตามเวลาที่ทำการเผยแพร่ผลงาน

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

10.14457/SU.res.2013.8
ใส่ยี่ 07/01/2562 16:06:51

Proceedings of the 3th Annual International Conference: Advances in Biotechnology (BIOTECH 2013). March 18-19, Singapore, Page 137-138. (Oral presentation).

6. Mana Kanjanamaneesathian, Reudeekorn Wiwattanapatapee, Wanit Rotniam, Ashara Pengnoo, Wasunan Wongpetkhiew and Vichit Tanmala. 2013. Application of a suspension concentrate formulation of *Bacillus velezensis* to control root rot of hydroponically-grown vegetables. New Zealand Plant Protection. Volume 66, Page 229-234. (Oral presentation).
7. Mana Kanjanamaneesathian, Reudeekorn Wiwattanapatapee, Wanit Rotniam, Wasunan Wongpetkhiew. 2013. Spraying as a means for delivering a suspension concentrate formulation of *Bacillus velezensis* to suppress root rot disease and promote the growth of *Lactuca sativa*. Journal of Plant Diseases and Protection. (Submitted and In Review).
8. มานะ กาญจนมณีเสถียร ฤดีกร วิวัฒนปฐพี วานิด รอดเนียม วสุนันท์ วงษ์เพชรเขียว และวิจิตร ตันมาละ. 2556. การใช้วิธี Drenching ในการนำส่งสูตรสำเร็จแขวนลอยเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus velezensis* ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาด *Lactuca sativa* ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปรนิกค์. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 11, 26-28 พฤศจิกายน 2556, จังหวัดขอนแก่น (ส่งผลงานฉบับเต็มเพื่อพิจารณาตีพิมพ์และเสนอผลงานโดยวาจาในการประชุมในเดือนพฤศจิกายน 2556).