

การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.
ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น

นางสาวพรพรรณ อุสุวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2550

**BIOCONTROL OF GRAPE FUNGAL DISEASES BY
BACILLUS SPP. AND *STREPTOMYCES* SPP.**

Pornpan Usuwan

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Doctor of Philosophy in Crop Production Technology
Suranaree University of Technology**

Academic Year 2007

การใช้เชื้อ *Bacillus spp.* และ *Streptomyces spp.* ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักศึกษานิตยภัตฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อ. ดร.สุดชล วุ่นประเสริฐ)

ประธานกรรมการ

(อ. ดร.โสภณ วงศ์แก้ว)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(รศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)

กรรมการ

(ศ. ดร.นันทกร บุญเกิด)

กรรมการ

(รศ. ดร.วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์)

กรรมการ

(รศ. ดร.เสาวณีย์ รัตนพานิช)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

พรพรรณ อุสุวรรณ : การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น (BIOCONTROL OF GRAPE FUNGAL DISEASES BY *BACILLUS* SPP. AND *STREPTOMYCES* SPP.) อ. ที่ปรึกษา : ดร. โสภณ วงศ์แก้ว, 149 หน้า.

โรคที่เกิดจากเชื้อราเป็นโรคที่ทำความเสียหายอย่างมากในองุ่น การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี มักทำให้เชื้อดื้อต่อสารเคมี เกิดการปนเปื้อนสารเคมีกับผลผลิตและสิ่งแวดล้อม การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพมาใช้ควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราในองุ่น โดยทำการแยกเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. จากตัวอย่างดินปลูกองุ่นในจังหวัดนครราชสีมา และอุบลราชธานี จากนั้นคัดเลือกเชื้อแต่ละสกุล 5 ไอโซเลตแรกที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* ด้วยวิธี dual culture method จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด (detached leaf) และทดสอบการสร้างเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase, protease และ chitinase ทำการระบุชนิดของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเกิดโรคในองุ่น โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และลำดับของนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ผลการศึกษาพบเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ จำนวน 61 ไอโซเลต และเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 73 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. aphanidermatum*, *C. ampelinum* และเชื้อ *S. rolfsii* ได้ เมื่อนำเชื้อแต่ละสกุล 5 ไอโซเลตแรก มาทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิม พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคทั้ง 3 ชนิดได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับไอโซเลต ระยะเวลาเจริญเติบโต และรูปแบบของเชื้อ โดยเชื้อ *Bacillus* spp. ในรูปของ cell suspensions ทั้งระยะ log phase และ stationary phase สามารถยับยั้งการเกิดโรคราสนิมได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งโรคสแคบ และราน้ำค้างได้ ขณะที่ culture filtrate ของเชื้อทั้งสองระยะสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ทั้ง 3 ชนิด ส่วนเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้งรูปแบบ cell suspensions และ culture filtrate ทั้งสองระยะการเจริญเติบโต สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีทั้ง 3 ชนิด สำหรับความสามารถของแต่ละไอโซเลต ในการยับยั้งโรคแต่ละชนิดได้สูงสุด สรุปได้ คือเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSN502 log phase รูป cell suspensions, BSD603 ทั้ง 2 ระยะ รูป culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SHH202 log phase, SHR103 stationary phase รูป cell suspensions, SYR107 log phase และ SSR107 stationary phase ในรูป culture filtrate ยับยั้งโรคราน้ำค้างได้สูงสุด เชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSD502 log phase, BSN603 stationary phase ในรูป cell suspensions, BSD101 ทั้ง 2 ระยะ รูป culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SHH202 ทั้ง 2 ระยะ รูป cell suspensions, log phase รูป culture filtrate และ SYR107

ระยะ stationary phase รูป culture filtrate ยับยั้งโรคสแคบได้ดีที่สุด เชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต BSN301 ทั้ง 2 ระยะ รูป cell suspensions, BSN201 ทั้ง 2 ระยะ รูป culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSH216 log phase และ SSH211 stationary phase ทั้ง 2 รูปแบบ ยับยั้งโรคราสนิมได้ดีที่สุด เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. มาใช้ร่วมกันในการยับยั้งการเกิดโรค พบว่าการใช้ culture filtrate ของเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกันสามารถยับยั้งการเกิดโรคทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่าการใช้ cell suspensions ร่วมกัน การทดสอบการสร้างเอนไซม์ พบว่า culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* spp. ในระยะ stationary phase แต่ละไอโซเลต มีกิจกรรมของเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase และ protease แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเทียบกับเชื้อในระยะ log phase แต่ไม่พบการสร้างเอนไซม์ chitinase สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. ในสภาพ cell culture แต่ละไอโซเลต สร้างเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase และ chitinase ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่ไม่พบการสร้างเอนไซม์ protease ผลของการศึกษาคณสมบัติของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคเชื้อราในงุ่นเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของเชื้ออ้างอิง พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต BSD101, BSD203 และ BSD604 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *B. subtilis* ไอโซเลต BSD406, BSD502, BSD405, BSN301 และ BSN304 ใกล้เคียงกับ *B. firmus* ไอโซเลต BSD603 และ BSN201 ใกล้เคียงกับ *B. pantothenicus* ไอโซเลต BSN501, BSN502 และ BSN603 ใกล้เคียงกับ *B. megaterium* สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSR203 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *S. cellulosa* ไอโซเลต SSR107 ใกล้เคียงกับ *S. globisporus* ไอโซเลต SSH209 ใกล้เคียงกับ *S. aureoverticillatus* ไอโซเลต SSH211 ใกล้เคียงกับ *S. gancidicus* ไอโซเลต SSH213 ใกล้เคียงกับ *S. ghanaensis* ไอโซเลต SSH216 ใกล้เคียงกับ *S. chattanoogensis* ไอโซเลต SYR205 ใกล้เคียงกับ *S. noboritoensis* ไอโซเลต SYR107 ใกล้เคียงกับ *S. rameus* ไอโซเลต SHH202 ใกล้เคียงกับ *S. malaysiensis* และไอโซเลต SHR103 และ SHR106 ใกล้เคียงกับ *S. cyaneus*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

PORNPAN USUWAN : BIOCONTROL OF GRAPE FUNGAL DISEASES
BY *BACILLUS* SPP. AND *STREPTOMYCES* SPP. THESIS ADVISOR :
SOPONE WONGKAEW, Ph.D., 149 PP.

DOWNY MILDEW/SCAB/RUST/*BACILLUS* SPP./*STREPTOMYCES* SPP./GRAPE

Fungal diseases cause great losses in grapes. Chemical control can make the causal fungi become resistant and always leave residues on the products and environment. The objective of this study was to select effective antagonists to be used as biocontrol agents for grape fungal disease control. *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. were isolated from soils collected from grape growing areas in Nakhon Ratchasima and Ubonratchathanee provinces. Subsequently, the top 5 isolates from each genus which were most effective in reducing the growth of *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* and *Sclerotium rolfsii* in dual culture, were selected for further test with downy mildew, scab (anthracnose), and rust on the detached grape leaves. The most effective isolates were subsequently studied for β -1, 3-1, 4-glucanase, protease and chitinase production and identified to a species level. Identification of the isolates was based on their morphology, biochemical tests and the nucleotide sequence of 16S rDNA. From the soils, 61 isolates of *Bacillus* spp and 73 isolates of *Streptomyces* spp. antagonistic to *P. aphanidermatum*, *C. ampelinum* and *S. rolfsii* were obtained. These isolates had different capacity in subduing downy mildew, scab, and rust depending on the isolate, growth phase and the form tested. Cell suspensions of *Bacillus* spp. in both log and stationary phases could inhibit rust well but were not effective with downy mildews and scab while the culture filtrates of

both phases were effective to all 3 diseases. In contrast, *Streptomyces* spp. of both phases and forms could reduce all 3 diseases. The isolates that were most effective in reducing the diseases were *Bacillus* isolate BSN502 log phase as a cell suspension; BSD603 in both phases as culture filtrate; *Streptomyces* isolate SHH202 log phase; SHR103 stationary phase as cell suspension; SYR107 log phase and SSR107 as culture filtrate against downy mildews, *Bacillus* isolate BSD502 log phase, BSN603 stationary phase as cell suspension; BSD101 in both phases as culture filtrate; *Streptomyces* isolate SHH202 in both phases as cell suspension; in log phase as culture filtrate and SYR107 stationary phase as culture filtrate against scab, *Bacillus* isolate BSN301 in both phases as cell suspension; BSN201 in both phases as culture filtrate; *Streptomyces* isolate SSH216 log phase and SSH211 stationary phase as both phases against rust. By mixing the culture filtrates of *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. together, the effectiveness could be increased but not that of the cell suspension. As a culture filtrate, activities of β -1, 3-1, 4-glucanase and protease of *Bacillus* spp. could be detected at a highly significant different level among the isolates in the stationary phase but not in the log phase. Chitinase was not detected, however. For *Streptomyces* spp. in cell culture form, activities of β -1, 3-1, 4-glucanase and chitinase could be detected at a highly significant level among the isolates but protease could not be detected. The isolates that were most effective in controlling the 3 diseases were identified as *B. subtilis* (BSD101, BSD203 and BSD604), *B. firmus* (BSD406, BSD502, BSD405, BSN301 and BSN304), *B. pantothenicus* (BSD603 and BSN201), *B. megaterium* (BSN501, BSN502, and BSN603) and *S. cellulosa* (SSR203), *S. globisporus* (SSR107), *S. aureoverticillatus* (SSH209), *S. gancidicus* (SSH211), *S.*

ghanaensis (SSH213), *S. chattanoogensis* (SSH216), *S. noboritoensis* (SYR205), *S. rameus* (SYR107), *S. malaysiensis* (SHH202) and *S. cyaneus* (SHR103 and SHR106).

School of Crop Production Technology

Academic Year 2007

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บุคคล และกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่งทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย ได้แก่

อาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือเอาใจใส่อย่างดียิ่ง และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาไว้วางใจให้เข้าทำโครงการวิจัยซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ และคอยให้คำแนะนำ และติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ

ศาสตราจารย์ ดร.นันทกร บุญเกิด คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก และอาจารย์ ดร.สุดชล วุ่นประเสริฐ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

อาจารย์ ดร.อรินทิพย์ ชรรณชัยพิเนตร ภาควิชาพันธุศาสตร์ และอาจารย์ ดร.กรรณิการ์ ดวงมาลัย ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่ช่วยสอนเทคนิคการแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาเฉพาะทางด้านองุ่นและการสร้างมูลค่าเพิ่ม และฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาให้ใช้องุ่นเพื่อการทดลอง

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ให้โอกาสให้ศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก พร้อมทั้งสนับสนุนเงินทุนเพื่อการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณชัยวัช จารุธรรมัน คุณเกษร เมืองทิพย์ คุณรักศักดิ์ เสริมศักดิ์ และคุณพัฒนา สมนิยาม ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจเสมอมา

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่ชาย ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ที่ให้การเลี้ยงดูอบรม และส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา อีกทั้งคอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัย จนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในชีวิตตลอดมา

พรพรรณ อุสุวรรณ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ค
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญรูป	ด
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
2 ปรัชญาวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ความสำคัญและปัญหาของการผลิตองุ่น	3
2.2 โรคขององุ่นที่ทำความเสียหายทางเศรษฐกิจ	4
2.2.1 โรคราน้ำค้าง	4
2.2.2 โรคสแคบ	5
2.2.3 โรคราสนิม	6
2.3 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี	7
2.4 ลักษณะทั่วไปและความสำคัญของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	12
2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	12
2.4.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	14
2.5 นิเวศวิทยาของ <i>Bacillus</i> spp.	15
2.6 ความสำคัญของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	16
2.6.1 ความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม	16
2.6.2 ความสำคัญด้านการควบคุมโรคพืช	17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7	ลักษณะทั่วไปและความสำคัญของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	21
2.8	เชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. กับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี	24
3	วิธีการดำเนินการวิจัย	27
3.1	การแยกเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. จากดิน	27
3.1.1	การเก็บตัวอย่างดิน	27
3.1.2	การแยกเชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	27
3.1.3	การแยกเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	27
3.1.3.1	การเตรียมตัวอย่างดิน (pre-treatment)	27
3.1.3.2	การแยกเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	27
3.2	การทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ (<i>in vitro</i>)	28
3.3	การทดสอบผลกระทบของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ต่อใบองุ่น	29
3.3.1	การเตรียมเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp.	29
3.3.2	การเตรียม cell suspensions ของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp.	29
3.3.3	การตรวจสอบผลของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ต่อใบองุ่น	29
3.4	การทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ในรูปของ cell suspensions ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และ ราสนิมในองุ่น	29
3.4.1	การทดสอบเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง	30
3.4.2	การทดสอบเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งโรคสแคบ และ โรคราสนิม	30
3.4.3	การทดสอบเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง โรคสแคบ และโรคราสนิม	30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.4	การหาระดับความเข้มข้นของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น	30
3.5	การทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ในรูปของ culture filtrate ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น	30
3.6	การทดสอบผลกระทบของการใช้เชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ร่วมกันในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น	31
3.7	การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายเชิงกิ่งปริมาณ	31
3.7.1	การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase	31
3.7.2	การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ protease	31
3.7.3	การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase	32
3.8	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	32
3.9	การระบุชนิดของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ที่ผ่านการคัดเลือก	32
3.9.1	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี	32
3.9.1.1	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	33
3.9.1.2	การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี	33
3.9.1.2.1	การติดสีแกรม	33
3.9.1.2.2	การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยแป้ง	33
3.9.1.2.3	การทดสอบแคตาเลส	33
3.9.1.2.4	การทดสอบการย่อยเคซีน	34
3.9.1.2.5	การทดสอบการย่อยเจลาติน	34
3.9.1.2.6	การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต	34

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.9.1.2.7	การทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรต เป็นแหล่งคาร์บอน.....	34
3.9.1.2.8	การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ ความร้อน และความเป็นกรด-ด่าง.....	35
3.9.1.3	การระบุชนิดของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR).....	35
3.9.1.3.1	การเตรียมเชื้อและดีเอ็นเอของ เชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	35
3.9.1.3.2	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR).....	36
3.9.1.3.3	การเตรียมเชื้อและดีเอ็นเอของ เชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	37
3.9.1.3.4	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR).....	37
4	ผลการทดลอง.....	39
4.1	การแยกเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. จากดิน.....	39
4.1.1	การแยกเชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	39
4.1.2	การแยกเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	39
4.2	การทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ (<i>in vitro</i>)	42
4.2.1	เชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	42
4.2.2	เชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	47
4.3	การทดสอบผลกระทบของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ต่อใบองุ่น.....	53

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4	การทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ในรูปของ cell suspensions ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิม ในองุ่น	54
4.5	การทดสอบหาระดับความเข้มข้นของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น	63
4.5.1	ระดับความเข้มข้นของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	63
4.5.2	ระดับความเข้มข้นของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	65
4.6	การทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ในรูปของ culture filtrate ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น	67
4.7	การทดสอบผลกระทบของการใช้เชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ร่วมกันในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น	76
4.8	การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์	82
4.8.1	การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase	82
4.8.2	การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ protease	82
4.8.3	การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase	82
4.9	การระบุชนิดของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ที่ผ่านการคัดเลือก	85
4.9.1	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	85
4.9.2	การศึกษาคูสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	86
4.9.3	การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธี Polymerase Chain Reaction	87
4.9.4	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	96
4.9.5	การศึกษาคูสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	96
4.9.6	การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA	97
5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	107
5.1	การแยกเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. จากดิน	107
5.1.1	การแยกเชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	107

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.1.2	การแยกเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	108
5.2	การทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชเบื้องต้น	110
5.2.1	เชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	110
5.2.2	เชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	111
5.3	การทดสอบผลกระทบของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ต่อใบองุ่น	111
5.4	การทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ในรูปของ cell suspensions และ culture filtrate ในการยับยั้งการเกิด โรคน้ำค้ำง สแคบ และราสนิมในองุ่น	112
5.4.1	เชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	112
5.4.2	เชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	113
5.4.3	เชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp.	114
5.5	การทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ร่วมกับ <i>Streptomyces</i> spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคน้ำค้ำง สแคบ และราสนิมในองุ่น	114
5.6	การระบุชนิดของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp.	116
5.6.1	เชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	116
5.6.2	เชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	117
5.7	การประเมินความสำเร็จของการคัดเลือกเชื้อปฏิปักษ์เพื่อใช้ในการควบคุม โรคเชื้อราในองุ่นและแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต	118
5.7.1	การแยกเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp.	118
5.7.2	การทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. เบื้องต้น	119
5.7.3	การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคน้ำค้ำง สแคบ และราสนิมในองุ่น	119
	รายการอ้างอิง	121

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก	135
ภาคผนวก ข	139
ภาคผนวก ค	146
ประวัติผู้เขียน	149

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตัวอย่างความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช	20
2.2 สารปฏิชีวนะบางชนิดที่ผลิตจากเชื้อในสกุล <i>Streptomyces</i> spp. และฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์	22
2.3 ลักษณะการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp.	23
2.4 ตัวอย่างการศึกษาการใช้ <i>Streptomyces</i> spp. ในการควบคุมโรคพืช	26
4.1 แหล่งที่มาและจำนวนไอโซเลตของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่แยกได้จากดินพื้นที่ปลูกองุ่น	40
4.2 แหล่งที่มาและจำนวนไอโซเลตของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ที่แยกได้จากดินพื้นที่ปลูกองุ่น	41
4.3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Colletotrichum ampelinum</i> และ <i>Sclerotium rolfsii</i> โดยเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่แยกได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จากแปลงองุ่นที่ไม่มีการแพร่ระบาดของโรค (SN) และมีการแพร่ระบาดของโรค (SD)	44
4.4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Colletotrichum ampelinum</i> และ <i>Sclerotium rolfsii</i> โดยเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่แยกได้จากอำเภอปากช่อง จากแปลงองุ่นที่ไม่มีการแพร่ระบาดของโรค (PN) และมีการแพร่ระบาดของโรค (PD)	45
4.5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Colletotrichum ampelinum</i> และ <i>Sclerotium rolfsii</i> โดยเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรก	46
4.6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Colletotrichum ampelinum</i> และ <i>Sclerotium rolfsii</i> โดยเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ที่แยกได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (S)	49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.7	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Colletotrichum ampelinum</i> และ <i>Sclerotium rolfsii</i> โดยเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ที่แยกได้จากอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี (U) 50
4.8	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Colletotrichum ampelinum</i> และ <i>Sclerotium rolfsii</i> โดยเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ที่แยกได้จากสวนคุณสมยศ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (Y) 50
4.9	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Colletotrichum ampelinum</i> และ <i>Sclerotium rolfsii</i> โดยเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ที่แยกได้จากสวน Holiday อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (H)..... 51
4.10	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อรา <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Colletotrichum ampelinum</i> และ <i>Sclerotium rolfsii</i> โดยเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรก..... 52
4.11	ผลของ <i>Bacillus</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป cell suspensions ต่อการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่น ในสภาพใบตัด..... 56
4.12	ผลของ <i>Bacillus</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป cell suspensions ต่อการเกิดโรคสแคบในองุ่น ในสภาพใบตัด..... 57
4.13	ผลของ <i>Bacillus</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป cell suspensions ต่อการเกิดโรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด 58
4.14	ผลของ <i>Streptomyces</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป cell suspensions ต่อการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่น ในสภาพใบตัด 60
4.15	ผลของ <i>Streptomyces</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป cell suspensions ต่อการเกิดโรคสแคบในองุ่น ในสภาพใบตัด 61
4.16	ผลของ <i>Streptomyces</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป cell suspensions ต่อการเกิดโรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด 62
4.17	ระดับความเข้มข้นของเชื้อ <i>Bacillus</i> และรูปแบบที่มีผลต่อการยับยั้ง การเกิดโรคสแคบในองุ่น ในสภาพใบตัด 64

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.18 ระดับความเข้มข้นของเชื้อ <i>Bacillus</i> ไอโซเลต BSN301 ที่มีผลต่อการยับยั้ง การเกิดโรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด	65
4.19 ระดับความเข้มข้นของเชื้อ <i>Streptomyces</i> และรูปแบบที่มีผลต่อการยับยั้ง การเกิดโรคสแคบในองุ่น ในสภาพใบตัด	66
4.20 ระดับความเข้มข้นของเชื้อ <i>Streptomyces</i> และรูปแบบที่มีผลต่อการยับยั้ง การเกิดโรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด	67
4.21 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกันในรูปแบบ culture filtrate ต่อการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่น ในสภาพใบตัด	69
4.22 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกันในรูปแบบ culture filtrate ต่อการเกิดโรคสแคบในองุ่น ในสภาพใบตัด	70
4.23 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกันในรูปแบบ culture filtrate ต่อการเกิดโรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด	71
4.24 ผลของ <i>Streptomyces</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกันในรูปแบบ culture filtrate ต่อการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่น ในสภาพใบตัด	73
4.25 ผลของ <i>Streptomyces</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกันในรูปแบบ culture filtrate ต่อการเกิดโรคสแคบในองุ่น ในสภาพใบตัด	74
4.26 ผลของ <i>Streptomyces</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกันในรูปแบบ culture filtrate ต่อการเกิดโรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด	75
4.27 ไอโซเลตของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดใน ในการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น ที่นำมาทดสอบร่วมกัน	76
4.28 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. ร่วมกับ <i>Streptomyces</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ต่อการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่น ในสภาพใบตัด	79
4.29 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. ร่วมกับ <i>Streptomyces</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ต่อการเกิดโรคสแคบในองุ่น ในสภาพใบตัด	80
4.30 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. ร่วมกับ <i>Streptomyces</i> spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ต่อการเกิดโรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด	81

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.31 ความสามารถของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการสร้างเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase, protease และ chitinase โดยประเมินจากขนาดวงใสที่เกิดขึ้นจากการย่อย substrate เฉพาะ	83
4.32 ความสามารถของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ในการสร้างเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase, protease และ chitinase โดยประเมินจากขนาดวงใสที่เกิดขึ้นจากการย่อย substrate เฉพาะ	84
4.33 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ไอโซเลตต่าง ๆ โดยการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA กับลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูลของ GenBank	90
4.34 แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่เปรียบกับคุณสมบัติของ <i>B.subtilis</i> (BS), <i>B. firmus</i> (BF), <i>B. pantothenicus</i> (BP) และ <i>B. megaterium</i> (BM).....	94
4.35 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลตต่าง ๆ โดยการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA กับลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูลของ GenBank.....	101
4.36 แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ที่เปรียบเทียบกับคุณสมบัติของ <i>S. cellulosa</i> (SC), <i>S. globisporus</i> (SG), <i>S. aureverticillatus</i> (SA), <i>S. gancidicus</i> (SGa), <i>S. ghanaensis</i> (SGh), <i>S. spectabilis</i> (SS), <i>S. chattanoogensis</i> (SCh), <i>S. noboritoensis</i> (SN), <i>S. rameus</i> (SR), <i>S. malaysiensis</i> (SM), <i>S. cyaneus</i> (SCy).....	102

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ลักษณะของเซลล์และสปอร์ของ <i>Bacillus</i> spp. 14
4.1	ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อ <i>Pythium aphanidermatum</i> 46
4.2	ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อ <i>Colletotrichum ampelinum</i> 46
4.3	ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อ <i>Sclerotium rolfsii</i> 47
4.4	ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อ <i>Pythium aphanidermatum</i> 52
4.5	ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อ <i>Colletotrichum ampelinum</i> 52
4.6	ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อ <i>Sclerotium rolfsii</i> 53
4.7	ลักษณะของใบองุ่นภายหลังการฉีดพ่นด้วย culture filtrate ของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. 54
4.8	แสดงลักษณะของวงไตที่เกิดจากการย่อย substrate ที่เชื้อ <i>Bacillus</i> spp. และ <i>Streptomyces</i> spp. สร้างขึ้น 85
4.9	ตัวอย่างของการทดสอบเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ทางชีวเคมี 88
4.10	ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วน 16S rDNA ของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จากการใช้ไพรเมอร์ B-K1/F และ B-K1/R1 89
4.11	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่มีลักษณะใกล้เคียง กับเชื้อ <i>B. subtilis</i> 92
4.12	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่มีลักษณะใกล้เคียง กับเชื้อ <i>B. firmus</i> 93

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ <i>B. pantothenicus</i>	94
4.14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ <i>B. megaterium</i>	95
4.15 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วน 16S rDNA ของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จากการใช้ไพรเมอร์ STR1F และ STR 1530R.....	100
4.16 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลต SSR203.....	103
4.17 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลต SSR107	103
4.18 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลต SSH209	103
4.19 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลต SSH211	104
4.20 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลต SSH213	104
4.21 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลต SSH216	104
4.22 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลต SYR205.....	105
4.23 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลต SYR107	105
4.24 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลต SHH202.....	105
4.25 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลต SHR103	106
4.26 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ไอโซเลต SHR106	106

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

องุ่นเป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Vitis* วงศ์ *Vitaceae* เป็นไม้เลื้อยประเภทไม้ยืนต้น มีถิ่นกำเนิดในแถบอากาศอบอุ่น แต่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตกึ่งร้อนถึงร้อน การผลิตองุ่นเพื่อการค้าในประเทศไทยในระยะแรกอยู่ทางภาคตะวันตก ได้แก่ อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี อำเภอสามพราน อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม และอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร แต่เนื่องจากมีโรคแมลงระบาดมากไม่สามารถจัดการได้ ทำให้พื้นที่ปลูกในแถบนี้ลดลง ปัจจุบันพื้นที่ปลูกองุ่นได้ขยายไปเกือบทั่วทุกภาค และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากเป็นพืชที่ให้ผลตอบแทนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับไม้ผลชนิดอื่น (นันทกร บุญเกิด, 2546) ประเทศไทยเริ่มปลูกองุ่นอย่างจริงจัง และได้ผลตั้งตั้งแต่ปี 2510 พันธุ์ที่นิยมปลูกกันมากคือ ไวท์มะละกา ซึ่งมีการปลูกร้อยละ 95 และคาร์ดินัลร้อยละ 5 ส่วนที่เหลือเป็นพันธุ์อื่น โดยมีพื้นที่ปลูกรวมทั้งสิ้นประมาณ 27,000 ไร่ มีผลผลิตรวม 59,000 ตัน ใช้บริโภคสดภายในประเทศร้อยละ 90 ของทั้งหมด มีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ร้อยละ 4 และที่เหลืออีกร้อยละ 6 ส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ ได้แก่ ฮองกง มาเลเซีย ญี่ปุ่น และบรูไน (ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2544) ในปี พ.ศ. 2544 การผลิตองุ่นในประเทศไทยโดยรวมมีปริมาณผลผลิตประมาณ 31,944 ตัน เป็นองุ่นรับประทานผลสดประมาณ 29,344 ตัน องุ่นทำไวน์ ประมาณ 400 ตัน ในปี 2547 การผลิตองุ่นสดมีปริมาณการส่งออก 108 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1.79 ล้านบาท ในปี 2548 มีปริมาณการส่งออกองุ่นสดเพียง 26 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1.51 ล้านบาท คือลดลงถึง 4 เท่าในช่วงเวลาเพียง 1 ปี ที่ผ่านมามีการส่งออกองุ่นสดของไทยมีปริมาณลดลงอย่างมาก ในขณะที่เดียวกันกลับมีการเพิ่มการนำเข้าองุ่นสดมากขึ้น โดยในปี 2536 มีปริมาณการนำเข้าองุ่นสด 1,633 ตัน คิดเป็นมูลค่าเท่ากับ 1.31 ล้านบาท เมื่อเปรียบเทียบกับปี 2540 มีปริมาณการนำเข้าองุ่นสดเท่ากับ 3,640 ตัน คิดเป็นมูลค่า 2.62 ล้านบาท การที่การผลิตองุ่นในประเทศไทยมีปริมาณลดลงอย่างมาก อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากมีพื้นที่ปลูกลดลง และการได้รับความเสียหายจากโรคและแมลง โดยโรคที่พบทำความเสียหายอย่างมาก คือโรคราน้ำค้าง สแคบ (แอนแทรคโนส) และราสนิม

เกษตรกรไทยส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช เนื่องจากสารเคมีออกฤทธิ์เร็ว มีประสิทธิภาพ เห็นผลชัดเจน สะดวกในการซื้อ การใช้ และการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามการควบคุมโรคพืชด้วยสารเคมีมักมีผลเสีย เพราะต้องใช้เป็นประจำและต่อเนื่อง ส่งผลทำให้เชื้อคือ

ยา เกิดการปนเปื้อนสารเคมีกับผลผลิตการเกษตรและสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีจึงเข้ามามีบทบาทมากขึ้น เพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมี รักษาความสมดุลของธรรมชาติ และลดปัญหาสารพิษที่สะสมในผลผลิตทางการเกษตร ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมขององุ่น ดังนั้นการคัดหาจุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมโรคดังกล่าวได้จึงน่าจะเป็นแนวทางที่นำไปสู่การพัฒนาใช้ชีววิธีในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช

1.2.2 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพและวิธีการใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง จากเชื้อ *Plasmopara viticola* โรคสแคบ จากเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* และโรคราสนิม จากเชื้อ *Physopella ampelopsidis* ขององุ่นในสภาพใบตัด

1.2.3 เพื่อศึกษากลไกเบื้องต้นของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น

1.2.4 เพื่อประเมินชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งการเกิดโรคเชื้อราในองุ่น

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. จากดินในแหล่งปลูกองุ่นในเขตจังหวัดนครราชสีมา และอุบลราชธานี ระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. เฉพาะที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคในองุ่น ดำเนินการเฉพาะในสภาพห้องปฏิบัติการ

บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญและปัญหาของการผลิตองุ่น

องุ่นเป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Vitis* วงศ์ *Vitacea* ซึ่งมีอยู่ประมาณ 11 สกุล รวม 600 ชนิด สกุล *Vitis* เป็นสกุลเดียวที่เป็นผลไม้รับประทานได้ เป็นไม้เลื้อยประเภทไม้ยืนต้น มีมือจับเพื่อเกาะยึด มีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่น แต่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตกึ่งร้อนถึงร้อน แบ่งเป็น 2 สกุลย่อย (subgenera) คือ *Euvitis* และ *Muscadinia* โดยยึดหลักความแตกต่างกันทางลักษณะพื้นฐานและจำนวนโครโมโซม *Euvitis* มีจำนวนโครโมโซม 38 ในขณะที่ *Muscadinia* มีจำนวน 40 (นันทกร บุญเกิด, 2546)

สำหรับประเทศไทยเริ่มมีการปลูกองุ่นในสมัยรัชกาลที่ 7 แต่ไม่แพร่หลาย ต่อมาในปี พ.ศ. 2493 เริ่มมีการปลูกองุ่นอย่างจริงจังโดยหลวงสมานวงกิจนำพันธุ์มาจากแคลิฟอร์เนีย และปี พ.ศ. 2506 อาจารย์ ปวิณ ปุณณศรี และคณะนำองุ่นยุโรปหลายสายพันธุ์เข้ามาปลูกได้ผลเป็นที่น่าพอใจ นับแต่นั้นมาการปลูกองุ่นในประเทศไทยจึงแพร่หลายมากขึ้น การผลิตองุ่นเพื่อการค้าในระยะแรกอยู่ในภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และราชบุรี ซึ่งให้ผลผลิตดี แต่เนื่องจากมีโรคและแมลงระบาด ทำให้พื้นที่ปลูกดังกล่าวลดลง ปัจจุบันพื้นที่ปลูกองุ่นได้ขยายไปเกือบทั่วทุกภาคยกเว้นภาคใต้ ที่มีปริมาณน้ำฝนมากเกินไปทำให้ไม่เหมาะที่จะปลูกองุ่น

ในปี พ.ศ. 2541 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกองุ่นประมาณ 2,717.9 เฮกตาร์ มีผลผลิตรวม 31,677 ตัน ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 15 ตันต่อเฮกตาร์ โดยแบ่งเป็นองุ่นรับประทานผลสด ซึ่งมีการผลิตมากในภาคตะวันตก มีพื้นที่ที่ให้ผลผลิต 2,203.8 เฮกตาร์ ได้แก่ ราชบุรี สมุทรสาคร และ นครปฐม ในขณะที่องุ่นทำไวน์มีพื้นที่ที่ให้ผลผลิตประมาณ 184 เฮกตาร์ จังหวัดที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ เลย และนครราชสีมา (Nilmond, 2001) เนื่องจากมีอากาศค่อนข้างเย็นและเป็นสภาพที่ดอน จึงไม่มีการยกร่องทำให้ดินองุ่นมีอายุยืนยาวขึ้น (ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2544) การผลิตองุ่นในประเทศไทยมีปริมาณผลผลิตรวม 31,944.1 ตัน เป็นองุ่นรับประทานผลสดรวมประมาณ 29,344.1 ตัน ในขณะที่องุ่นทำไวน์มีผลผลิตประมาณ 400 ตัน โดยพันธุ์ที่นิยมปลูกมากที่สุดคือไวท์มะละกา รองลงมาคือคาร์ดินัล ในปี พ.ศ. 2547 องุ่นรับประทานผลสดมีปริมาณ 108 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1.79 ล้านบาท ขณะที่ในปี พ.ศ. 2548 มีปริมาณเพียง 26 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1.51 ล้านบาท (สำนักงานสถิติการเกษตร, 2547) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตองุ่นรับประทานผลสดในปี พ.ศ. 2541 ที่มีปริมาณสูงถึง 27,757 ตัน กับผลผลิตของปี พ.ศ. 2547 และ 2548 จะพบว่าปีมีปริมาณผลผลิตลดลงถึง 257 และ 1,067 เท่า ถึงแม้ว่า

องุ่นจะเป็นไม้ผลที่ให้มูลค่าตอบแทนค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับผลไม้อื่น ๆ แต่ในขณะเดียวกันก็เป็นพืชที่มีโรคเข้าทำลายหลายชนิดตลอดช่วงระยะเวลาเจริญเติบโต เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพอากาศร้อนชื้น มีฝนตกชุก และมีการตัดแต่งกิ่งองุ่นให้ออกดอกติดผลถึง 2 ครั้งต่อปี จึงมีส่วนทำให้เกิดโรคระบาดได้ง่ายเกือบตลอดปีเช่นกัน โรคในองุ่นเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นจากการที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการป้องกันกำจัด โรคองุ่นที่พบในประเทศไทยมีหลายชนิด ได้แก่ โรคราน้ำค้าง ราแป้ง สแคบ (แอนแทรคโนส) ราสนิม กิ่งและใบจุด ปลายกิ่งตาย ยอดอ่อนและผลเน่า เป็นต้น แต่โรคที่พบทำความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมามีเพียง 3 ชนิด คือ โรคราน้ำค้าง สแคบ (แอนแทรคโนส) และราสนิม

2.2 โรคขององุ่นที่ทำความเสียหายทางเศรษฐกิจ

2.2.1 โรคราน้ำค้าง (Downy mildew)

โรคราน้ำค้างพบแพร่ระบาดรุนแรงในเขตอบอุ่นที่มีความชื้นในอากาศสูง เช่น อาเจนติน่า บราซิล ตะวันออกของอเมริกาเหนือ ตะวันออกของออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ จีน และญี่ปุ่น ในขณะที่ในแถบอัฟกานิสถาน แคลิฟอร์เนีย และชิลี พบการแพร่ระบาดของโรคน้อย โดยพบว่าองุ่นสายพันธุ์ *V. vinifera* มีความอ่อนแอต่อโรคสูง ในขณะที่ *V. aestivalis* และ *V. labrusca* มีความต้านทานต่อโรคปานกลาง ส่วน *V. cordifolia*, *V. rupestris* และ *V. rotundifolia* มีความต้านทานต่อโรคสูง (Pearson and Goheen, 1998) โรคราน้ำค้างจัดเป็นโรคที่สำคัญที่สุดขององุ่นสามารถทำความเสียหายให้กับองุ่นในทุกระยะการเจริญเติบโตโดยทำให้เซลล์ตาย ใบร่วง ผลผลิตมีคุณภาพต่ำ ในประเทศอิตาลีโรคราน้ำค้างได้ทำความเสียหายอย่างรุนแรงมีผลกระทบต่อปริมาณของผลผลิตและคุณภาพของไวน์ นอกจากนี้ยังทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูงขึ้นจากค่าใช้จ่ายในการควบคุมโรค คือต้องเสียค่าสารเคมีในการควบคุมโรคถึง 8 ล้านบาทในปีที่มีการแพร่ระบาดของโรคน้อย และ 16 ล้านบาทในปีที่มีการแพร่ระบาดของโรคสูง จากพื้นที่ปลูกองุ่น 53,000 เฮกตาร์ (Salinari, Giosue, Tubiello, Rettori, Rossi, Spannas, Rosenzweig and Gullino, 2006)

สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อรา *Plasmopara viticola* (Berk & Curt) Berl & Det. ซึ่งเป็นเชื้อราพวก obligate parasite ของพืชชั้นสูง ลักษณะของเส้นใยไม่มี septum เจริญอยู่ระหว่างเซลล์ของพืชอาศัยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8-10 ไมโครเมตร มีการสร้าง haustoria รูปร่างกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-10 ไมโครเมตร แทะผ่านเข้าไปในเซลล์ของพืชอาศัย sporangia มีสี่ใส รูปร่างแบบ ellipsoid ขนาด 14×11 ไมโครเมตร ภายใน sporangium ผลิต zoospores ได้ 1-10 อัน มีขนาด 6-8×4-5 ไมโครเมตร เชื้ออยู่ข้ามฤดูในรูปของ oospore มีขนาด 20-120 ไมโครเมตร เมื่อเข้าฤดูฝน oospore งอกเป็น germ tube และ sporangium ซึ่งให้กำเนิด zoospores sporangia หลุดออกจาก sporangiophores โดยลม เมื่อมีความชื้นและอุณหภูมิเหมาะสมคือประมาณ 22-25

องศาเซลเซียส sporangia จะปล่อย zoospores ซึ่งจะเคลื่อนสู่บริเวณปากใบ จากนั้นจึงออก germ tubes แทะเข้าสู่ปากใบหรือระหว่างเซลล์โดยใช้เวลาน้อยกว่า 90 นาที ระยะเวลาตั้งแต่ช่วงเข้าทำลาย จนถึงระยะแรกที่ปรากฏอาการขึ้นอยู่กับอายุของใบ สายพันธุ์ อุณหภูมิและความชื้น โดยทั่วไปใช้ เวลาประมาณ 4 วัน ฝนมีบทบาทค่อนข้างสูงในการแพร่ระบาดของโรค ส่วนอุณหภูมิมีบทบาทในการเร่งหรือชะลอการพัฒนาของเชื้อรา อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของเชื้อคือ 25 องศาเซลเซียส (Pearson and Goheen, 1998)

โรคราน้ำค้างสามารถแพร่ระบาดรุนแรงตลอดทั้งปีโดยเฉพาะอย่างยิ่งในฤดูฝน อาการบนใบ ระยะแรกเป็นจุดขนาดเล็กสีเขียวซีดทางด้านบนของใบ ต่อมาจะขยายเป็นแผลขนาดใหญ่ ขนาดของแผลไม่แน่นอน ถ้าคู่ด้านล่างของใบตรงที่เป็นแผลจะพบกลุ่มสปอร์และก้านชูสปอร์ สีขาวเห็นได้ชัด เพื่อสามารถเจริญแพร่ระบาดติดต่อไปยังใบอื่น ๆ หรือแปลงอื่น โดยปลิวไปกับลม อาการของโรคจะสังเกตได้ก็ต่อเมื่อเชื้อราเข้าทำลายแล้ว 4-6 วัน อาการที่ชัดเจน มีลักษณะแคะ แกร็น ยอดสั้น มีกลุ่มสปอร์และก้านชูสปอร์ขึ้นปกคลุมเห็นได้ชัดเจน ยอดอ่อนที่ถูกทำลายจะ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแห้งตายในที่สุด อาการที่ช่อดอก จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเป็นหย่อม ๆ ต่อมา จะเห็นขึ้นส่วนของเชื้อราสีขาวขึ้นปกคลุม ช่อดอกจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแห้งติดจากโคน ช่อ ปลายช่อ หรือกลางช่อ อาการที่ช่อผล เกิดกับผลอ่อนมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาล เปลือกผลเหี่ยว เปลี่ยนเป็นสีเทาเงินหรือน้ำตาลแก่ ถ้าเป็นมากผลจะเหี่ยวหมดทั้งช่อ อาการที่เถาและมือเกาะ เริ่ม จากเกิดแผลสีเขียวซีดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแผลมีอายุมากขึ้น การเกิดอาการที่เถาจะทำให้ยอด แคะแกร็นเนื่องจากขาดอาหาร

2.2.2 โรครสแคบ (Scab)

โรครสแคบหรือแอนแทรคโนส เป็นโรคที่ทำความเสียหายรองจากโรคราน้ำค้าง มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sphaceloma ampelimum* De Bary (*Elsinoe ampelina* ในระยะ telemorph) ซึ่งเข้า ทำลายส่วนต่าง ๆ ขององุ่นที่อยู่เหนือดินได้ทุกส่วน โดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ที่ยังไม่เปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ได้แก่ ใบอ่อน ยอดอ่อน มือเกาะ ช่อดอก และผลอ่อน บางครั้ง อาจพบอาการบนผล เถา กิ่ง หรือใบที่แก่ และแผลที่พบเหล่านั้นมักเป็นเพียงร่องรอยเดิมของการเข้า ทำลายในระยะที่ยังอ่อนเท่านั้น เชื้อราชนิดนี้ไม่ทำให้ส่วนของพืชร่วงหล่นจากต้น ยกเว้นเมื่อเชื้อ เข้าทำลายบริเวณข้อใบหรือข้อผล จะทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นมีอาการแห้งและตายเพราะขาดน้ำและ อาหาร ใบหรือผลจึงร่วงไปในที่สุด อาการบนใบหรือส่วนยอด เป็นจุดขนาดเล็กสีน้ำตาลอ่อน หรือ เทา ขอบแผลสีเขียวล้อมรอบด้วยรอยน้ำ ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจุดเหล่านี้จะชะงักการ เจริญและเนื้อเยื่อที่ตายแล้วหลุดหายไปเหลือเพียงรอยใบทะลุ ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสมแผลจะ ขยายขนาดขึ้น และรวมกันทำให้อาการลุกลามเร็วขึ้น ส่งผลให้เนื้อเยื่อใบหดตัว ใบมีวงงอลงด้าน ล่าง หรือบิดงอ อาการบนผลองุ่น พบมากในระยะผลอ่อนจนถึงผลอายุ 2 เดือน ลักษณะเป็นแผลจุด

สีน้ำตาลอ่อนถึงดำ ลักษณะยวบยหรือบวม แผลมีลักษณะแห้งแข็ง ขนาดไม่แน่นอน ตั้งแต่ 2-10 มิลลิเมตร ผลบดงอ อาการบดงอหรือเถาขององุ่น เริ่มจากเชื้อเข้าทำลายบริเวณยอดอ่อน โดยบริเวณที่เชื้อเข้าทำลายจะมีลักษณะบดงอ มีแผลขอบนูนกระจาย และแห้งตายในที่สุดส่งผลให้กิ่ง ใบ หรือคอรอบข้างแห้งตายตามไปด้วย (กรรณิการ์ เพ็ญนภักตร์, อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และธนิตย์ ปล่องบรรจง, 2545)

โรคสแคบขององุ่นมีรายงานพบครั้งแรกในประเทศฝรั่งเศส โดยในปี ค.ศ. 1839 Viala ได้ทำการเก็บตัวอย่างของโรคไว้ที่เมือง Montpellier ในปี ค.ศ. 1881 Burril รายงานการพบในประเทศสหรัฐอเมริกา (Shear, 1929 อ้างใน กานต์ คำทรัพย์, 2546) ต่อมาจามีรายงานการพบในหลายประเทศ เช่น ซิลี บราซิล คิวบา ออสเตรเลีย นิวกินี แซมเบีย และอินเดีย ในประเทศไทยมีรายงานพบครั้งแรกที่ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ในปี พ.ศ. 2506 (กรรณิการ์ เพ็ญนภักตร์ และอุบล คือประโคน, 2537) โรคสแคบขององุ่นหรือที่ชาวสวนเรียกว่าโรคอินุบ มีอาการโรคคล้ายโรคแอนแทรกโนส และมักเข้าใจว่าเกิดจากเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรกโนส ซึ่งสามารถก่อให้เกิดโรคกับองุ่นได้เช่นกัน จึงทำให้เกิดความสับสน (นันทกร บุญเกิด, 2544) ในอดีตประเทศไทยมีรายงานเกี่ยวกับโรคแอนแทรกโนสว่าเกิดจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งทำให้เกิดอาการกับองุ่น 2 ลักษณะ คือ อาการฉ่ำน้ำ (bitter rot) และแห้งแข็ง (scab) (กรรณิการ์ เพ็ญนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และอภิรัชต์ สมฤทธิ์, 2544) โรคแอนแทรกโนสเข้าทำลายผลองุ่นในระยะผลเริ่มแก่ โดยพบจุดแผลสีน้ำตาลดำบนผล เนื้อเยื่อมีอาการบวมหรือยวบยบริเวณผลที่ถูกทำลายคล้ายกับอาการของโรคสแคบ แต่มีข้อแตกต่างกันคือ โรคสแคบมีอาการแข็งบริเวณขอบแผลและจำกัดขอบเขตอย่างเด่นชัด (canker-like) ไม่มีกลุ่มของสปอร์ปรากฏให้เห็นบริเวณแผล แต่โรคแอนแทรกโนส แผลที่ยวบยจะมีลักษณะฉ่ำน้ำ ขอบแผลไม่จำกัดขอบเขตอย่างเด่นชัด และมักมีกลุ่มสปอร์สีส้มปรากฏเป็นวงซ้อนกันบนแผล ในสภาพอากาศร้อนชื้น จุดแผลที่ผลจะขยายกว้างออกอย่างรวดเร็ว ทำให้แผลมีลักษณะคล้ายดวงตานก (bird's eye spot) (นิพนธ์ วิสารทานนท์, 2542) นอกจากนี้แผลของโรคสแคบมีความแตกต่างจากแผลของโรคแคงเกอร์ในส้ม คือเป็นแผลตกระเก็ด อาจปริเล็กน้อยแต่ไม่เกิดเป็นร่องลึกเหมือนโรคแคงเกอร์ และบริเวณเนื้อใบรอบแผลไม่พบลักษณะที่เป็นวงสีเหลือง (halo) ล้อมรอบแผล (กรรณิการ์ เพ็ญนภักตร์ และอุบล คือประโคน)

2.2.3 โรคราสนิม (Rust)

โรคราสนิมขององุ่นมีแหล่งกำเนิดในเขตร้อน ทำความเสียหายให้กับองุ่นในเขตร้อนและกึ่งร้อนของเอเชียมากกว่าในเขตอบอุ่น โรคนี้พบแพร่ระบาดเป็นประจำในเอเชีย และอเมริกากลาง สามารถเข้าทำลายองุ่นได้ทุกสายพันธุ์

โรคราสนิมขององุ่น มีสาเหตุจากเชื้อ *Physopella ampelopsidis* หรือ *Phakopsora ampelopsidis* เกิดได้ดีในเขตที่มีความชื้นสูง โดยพบ uredia สีเหลืองกระจายอยู่ทั่วบริเวณใต้ใบ บาง

ครั้งพบบนก้านใบ ยอดอ่อน และช่อดอก และทำให้เกิดแผลจุดสีน้ำตาลบนใบด้านที่อยู่ตรงข้ามกับ uredial โรคนี้ทำความเสียหายให้กับใบแก่ ทำให้ใบแห้ง ร่วงหล่น และการเจริญในช่วงฤดูถัดไป ลดลง

ระยะ uredia stage ของเชื้อพบบริเวณใต้ใบ มีลักษณะเป็นตุ่มแผลสีเหลือง มีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1-0.5 มิลลิเมตร ภายในมีการสร้าง uredospore รูปไข่ถึงรี ขนาด 18-29x10-18 ไมโครเมตร telia มีลักษณะกลม ขนาด 0.1-0.2 มิลลิเมตร ภายในมี teliospore รูปวงรี ขนาด 10-35x9-15 ไมโครเมตร อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอก uredospore คือ 24 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิต่ำสุด คือ 8 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดคือ 32 องศาเซลเซียส หากมีความชื้นสูงจะพบการสร้าง appressoria ภายใน 6 ชั่วโมงหลังจากปลูกเชื้อ จากนั้นภายในเวลา 12 ชั่วโมง เชื้อเริ่มเข้าสู่พืชทางปาก ใบ และหลังจากปลูกเชื้อ 5 วัน เชื้อจะเข้าครองพื้นที่ใบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 200-300 ไมโครเมตร จากนั้นจึงสร้าง uredospore ภายใน 7 วัน ระยะเวลาการปรากฏของ uredia ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ คือใช้เวลา 5-6 วัน ที่อุณหภูมิ 16-30 องศาเซลเซียส หรือ 15-20 วัน ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส uredospore จะไม่เข้าทำลายใบที่ยังอ่อน เนื่องจากปากใบยังมีการพัฒนาไม่เต็มที่ teliospore สามารถงอกได้ที่อุณหภูมิ 10-30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 15-25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้าง basidiospore อยู่ระหว่าง 15-20 องศาเซลเซียส โดยสามารถงอกได้ที่ อุณหภูมิ 5-30 องศาเซลเซียส แต่ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 20-25 องศาเซลเซียส (Pearson and Goheen, 1998)

การควบคุมโรคทั้ง 3 กลุ่ม ปัจจุบันนิยมใช้สารเคมีเป็นส่วนใหญ่ สำหรับโรครา น้ำค้าง สารเคมีที่นิยมใช้ในการป้องกันกำจัดมี 2 กลุ่ม คือ สารเคมีประเภทสัมผัส เช่น cupric salts, dithiocarbamates และ phthalimides ซึ่งมีประสิทธิภาพในการป้องกันเท่านั้น กลุ่มที่สอง เป็นสารเคมีดูดซึม เช่น benalaxyl, metalaxyl, ofurace และ oxadixyl สำหรับโรคสแคบ (แอนแทรกโนส) นิยมใช้ Bordeaux mixture หรือ lime sulfur, copper oxychloride, DNOC และ DNBP เป็นต้น ส่วน Bordeaux mixture, zineb, maneb, ferbam และ captafol เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ในการป้องกันกำจัด โรคราสนิม (Pearson and Goheen, 1998)

2.3 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การทำการเกษตรที่ผ่านมาเกษตรกรมุ่งใช้เทคโนโลยีทางด้านสารเคมีมาโดยตลอด ในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อโรคพืชเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะสารฆ่าเชื้อรา ซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม มนุษย์และสัตว์ สารเคมีเป็นพิษตกค้างในสภาวะแวดล้อม ผลิตผลเกษตร และมีผลกระทบต่อผู้บริโภค สมคิด ดิสถาพร (2540) กล่าวว่า การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช อย่างขาดความระมัดระวังนอกจากจะเป็นปัญหาโดยตรงต่อผู้ใช้แล้วยังก่อให้เกิดมลพิษต่อ

สิ่งแวดล้อม และเป็นปัญหาของสังคมโดยรวม ในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นใช้วิธีที่เหมาะสมนำมาผสมผสานกันเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพและผลตอบแทนสูงสุดโดยไม่กระทบกระเทือนต่อสิ่งแวดล้อม และสังคมสามารถนำไปปฏิบัติได้ ซึ่งเรียกว่าการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน (Integrated Pest Management, IPM) การเลือกใช้วิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธี เป็นกรรมวิธีหนึ่งของหลักการ IPM

การศึกษาแนวทางการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี เริ่มต้นเมื่อกลางปี ค.ศ. 1920 เมื่อมีการค้นพบว่าปัญหาโรคพืชสามารถลดความรุนแรงลงได้ด้วยการใช้สารอินทรีย์ใส่ลงในดินปลูก โดยมุ่งเน้นการควบคุมโรคโดยอาศัยธรรมชาติจัดการตนเอง ต่อมาอีก 20-25 ปี จึงเริ่มมีการศึกษาวิธีใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชและไล่เดือนฝอยสาเหตุโรคพืช โดยมีผู้ให้ความสนใจและศึกษาเพิ่มมากขึ้น (Baker, 1987 ; Cook, 1991 อ้างถึงใน สมคิด ศิสถาพร 2540) เนื่องจากตระหนักถึงพิษภัยของสารเคมีปราบศัตรูพืชที่ใช้กันมากขึ้น และปัญหาโรคที่ไม่สามารถควบคุมได้โดยสิ้นเชิงหรือควบคุมได้เพียงบางส่วน ตัวอย่างเช่น โรคปุ่มปม (crown gall) บนพืชหลายชนิดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Agrobacterium* sp. ยังไม่สามารถป้องกันกำจัดด้วยวิธีการใด ๆ ที่คุ้มทุนเท่ากับการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี โดยการใช้ *Agrobacterium radiobacter* strain K-84

การควบคุมโรคโดยชีววิธี หมายถึง การลดปริมาณของเชื้อโรคพืชหรือลดกิจกรรมของเชื้อโรคอันจะก่อให้เกิดโรคนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยอาศัยสิ่งมีชีวิต ซึ่งรวมทั้งพืชชั้นสูง และจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) ยกเว้นผลจากการกระทำต่อเชื้อโรคโดยตรงจากมนุษย์ (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2544) ปัจจุบันมีการนำแบคทีเรียที่เป็นจุลินทรีย์ต่อต้าน (bacterial antagonist) มาควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยเฉพาะการใช้แบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. จุลินทรีย์ต่อต้านมีกลไกการควบคุมโดยชีววิธี 4 ประเภทด้วยกันคือ

1) โดยการแก่งแย่ง (competition) โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่าง ๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโตในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ การแข่งขันที่พบมากคือการนำธาตุอาหารหรือสารต่าง ๆ ที่มีอยู่มาก ทำให้เชื้อโรคพืชขาดสารอาหารไม่สามารถเจริญเติบโตเข้าทำลายพืชได้ ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Bacillus cereus* UW85 สามารถดึงธาตุแคลเซียมจากดินมาใช้ในการสร้างสปอร์ในเซลล์แล้วยังปลดปล่อยแอมโมเนียออกมาทำให้สภาพดินเป็นด่าง ทำให้เชื้อ *Phytophthora* spp. ไม่สามารถสร้าง zoospore ได้ (Gilbert, Handelsman and Parke, 1990) นอกจากนี้ Handelsman, Raffel, Mester, Wunderlich and Grau, (1990) พบว่าเชื้อ *B. cereus* UW85 ยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะซึ่งมีผลต่อการอยู่รอดของ zoospore ขณะที่ Tokala (2002 อ้างถึงใน บรรจบ วันกิ่ง, 2549) พบว่า *Streptomyces lydicus* WYEC108 สามารถเจริญครอบครองบริเวณรากพืชตระกูลถั่วได้ดี โดย

เจริญสร้างเส้นใยและสปอร์บริเวณรากพืชทำให้ช่วยลดการเข้าทำลายจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* และยังพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถดึงธาตุเหล็กมาใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิตได้ดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชโดยการสร้างซิเดอโรโรฟออร์ (siderophore) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม ligands ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีความจำเพาะเจาะจงต่อธาตุเหล็กสูง สามารถละลายได้ในน้ำ เป็นแหล่งเก็บสะสมธาตุเหล็กของสิ่งมีชีวิต พบว่าในสภาพแวดล้อมที่ขาดธาตุเหล็กหรือมีในปริมาณน้อยจะกระตุ้นให้จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดมีการสร้างซิเดอโรโรฟออร์มากขึ้น ซิเดอโรโรฟออร์จำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Cathecolamides หรือ Cathecolate siderophores (CS) พบได้เฉพาะในแบคทีเรีย เช่น *Bacillus* ได้แก่ *Bacillus megaterium* และ *B. subtilis* สร้างซิเดอโรโรฟออร์ที่ชื่อ Schizokinen และ DHB-glycine ตามลำดับ และ Hydroxamates หรือ Hydroxamate siderophores (HS) พบในสิ่งมีชีวิตที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรา เช่นแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces* จะสร้างซิเดอโรโรฟออร์ที่เรียกว่า Ferrioxamine ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของ diamines และ carboxylic acid ปัจจุบันพบว่า Ferrioxamine มีด้วยกันทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ Ferrioxamine A₁, A₂, B, D₁, D₂, E, G, H และ I (หนึ่งเดียวารุง และ นันทกร บุญเกิด, 2539) โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตสารซิเดอโรโรฟออร์ สามารถจับยึดธาตุเหล็กในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุโรคพืช ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้

2) โดยการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) ผลิตผลจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ โดยทั่วไปแบคทีเรียที่สร้างสปอร์มีรายงานการผลิตสารปฏิชีวนะภายหลังจากที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ดังกล่าวเริ่มมีการสร้างสปอร์ เนื่องจากการสร้างสปอร์เป็นกลไกในการป้องกันตัวเองจากสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้น Oejijono, Line and Dragar (1993) พบว่ากลไกในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชของเชื้อ *Acinetobacter* sp., *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *Pseudomonas cepacia* และ *P. putida* เป็นการสร้างสารปฏิชีวนะมากกว่าการสร้าง siderophore นอกจากนี้เชื้อ *B. subtilis* A13 สร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ถึง 9 ชนิด เชื้อ *Bacillus* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารพวก polypeptide เช่น bacilysocin สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida pseudotropicalis* และ *Cryptococcus neoformans* (Tamehiro, Hosoyan, Okamoto, Ubukata, Hamada, Naganawa and Ochi, 2002) และ iturin สามารถยับยั้งเชื้อ *Botrytis cinerea*, *Erwinia carotovora* และ *Ralstonia solanacearum* (Silva, 1992 อ้างถึงใน Bernal, Illanes and Gampi, 2002) โดยสารปฏิชีวนะมีผลยับยั้งการสร้างเซลล์เมมเบรน เปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเซลล์เมมเบรน และการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารปฏิชีวนะ (สายใจ อ่อนแก้ว, 2542) นอกจากนี้ยังมีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อีกหลายชนิดที่ผลิตปฏิชีวนะสารยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ เช่น *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., *Gliocladium* spp. และ *Myrothecium* spp. เป็นต้น

3) โดยการเป็นปรสิต (parasitism) คือการที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเจริญอยู่ใกล้เคียงหรือบนส่วนของเชื้อโรคพืชแล้วเข้าทำลายเพื่อใช้อาหาร หรือสารประกอบต่าง ๆ จากเชื้อสาเหตุโรคพืช ปรสิตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasite) แบ่งเป็น 2 พวก คือ necrotrophic mycoparasite เป็นพวกที่ต้องฆ่าหรือทำให้เชื้อโรคตายก่อนจึงจะสามารถใช้อาหารจากเส้นใยหรือสปอร์ การฆ่าอาจเกิดขึ้นโดยสร้างสารพิษหรือเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อโรค เช่น เอนไซม์ chitinase และ glucanase พวกที่สองคือ biotrophic mycoparasite เป็นพวกที่เจริญสัมพันธ์อยู่กับเส้นใยของเชื้อราโรคพืช แล้วแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในโดยไม่ทำให้ตาย กระบวนการเป็นปรสิตมักจะพบในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายโดยเฉพาะการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค ตัวอย่างเอนไซม์หลักที่พบ คือ chitinase และ glucanase

ก) เอนไซม์ Chitinase

Chitinase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคตินให้เป็นโมโนเมอร์ของไคติน คือ *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) ไคตินเป็นสารประกอบที่เกิดจากการเชื่อมกันของ *N*-acetyl D-glucosamin ด้วยพันธะ β -1, 4-glycosidic bond (Felse and Panda, 1999) พบโดยทั่วไปมี 3 รูปแบบคือ α -ไคติน, β -ไคติน และ γ -ไคติน chitin ส่วนใหญ่พบในแมลง และในเปลือกแข็งที่หุ้มตัวของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะในพวก Arthropod และ Mollusca พืชชั้นสูง และจุลินทรีย์ นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรีย เช่น *Bacillus* sp. และ *Streptomyces* sp. สามารถสร้าง chitinase ได้ เอนไซม์ chitinase ที่มีอยู่ในพืชจะทำหน้าที่ป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ในแมลงจะพบเอนไซม์นี้ในกระบวนการลอกคราบหรือการย่อยสลายสารประกอบไคติน ในด้านการประยุกต์ใช้เอนไซม์นี้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี พบครั้งแรกโดย Skujins, Potgieter and Alexander (1965) พบการย่อยสลายเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Fusarium solani* โดยเชื้อ *Streptomyces* sp., เอนไซม์ chitinase เป็น multi-complex enzyme ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Shaikh and Deshpande, 1993 ; Tronsmo and Harman, 1993 ; Haran, Schickler, Oppenheim and Chet, 1995) คือ

1 Endo-chitinase หรือ chitinase จะย่อยไคตินแบบสุ่มภายในสายโพลีเมอร์แล้วได้เป็น multimer ของ *N*-acetylglucosamine ซึ่งส่วนมากเป็น diacetylchitobiose และได้ triacetylchitotriose เล็กน้อย

2 Exo-chitinase หรือ *N*-acetylglucosaminidase (chitobiase) จะย่อยจากปลายด้าน non-reducing ของสายไคตินได้เป็น chitobiose หรือ *N*-acetylglucosamine โมเลกุลเดี่ยว

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่มีไคตินเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์เหมือนพวกเชื้อรา การสร้าง chitinase ของแบคทีเรียพบว่าถูกชักนำด้วยไคติน ซึ่งคาดว่าแบคทีเรียสร้าง chitinase เพื่อย่อยสลายไคตินแล้วใช้เป็นแหล่งของอาหาร chitinase จากแบคทีเรียหลายชนิดถูกใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อ

ราเช่น chitinase จาก *Serratia marcescens* ใช้ร่วมกับ β -glucanase, propan-2-ol และ polyoxyethylene lauryl ether ฉีดพ่นในไร่นาข้าวสามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia oryzae* ได้ ในขณะเดียวกัน *S. marcescens* ยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าของต้นฝ้ายที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* ในสภาพเรือนทดลอง Watanabe, Oyanagi, Suzuki and Tanaka (1990) และ Hashimoto (2000) รายงานว่า *B. circulans* WL-12 สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase 6 ชนิด คือ A1, A2, B1, B, C และ D โดยมี chitinase A1 เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในขบวนการย่อยสลายไคติน นอกจากนี้เชื้อ *Streptomyces lividans* สามารถสร้าง chitinase และปล่อยออกมานอกเซลล์ การสร้าง chitinase ถูกชักนำด้วยไคตินและอนุพันธ์ของไคติน และสามารถพบ chitinase และ chitinobiase ที่ย่อยสลายไคตินและไคโตซานได้ (Neugebauer, Gamache, Dery and Brzezinski, 1991) ในขณะเดียวกันเอนไซม์ chitinase จากเชื้อ *S. cinereoruber* และ *S. viridificans* สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของ *Aspergillus niger* และเชื้อราก่อโรคหลายชนิดได้ (Okazaki and Takawa., 1991 ; Gupta, Sexena, Chaturvedi and Viridi, 1995)

ข) เอนไซม์ Glucanase (β -1, 3-glucanase)

เอนไซม์ β -1, 3-glucanase ทำหน้าที่ย่อยสลาย β -1, 3-glucan พบได้ทั่วไปในพืชและจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในพืช เอนไซม์นี้มีบทบาทในกระบวนการป้องกันตัวเองต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา และมีบทบาทในการลำเลียงสารอาหาร ส่วนที่พบในเชื้อรามีบทบาทในกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรืออวัยวะในการเจริญเติบโตและพัฒนาของเชื้อรา และยังมีบทบาทในการดูดซึมธาตุอาหารในการดำรงชีพแบบ saprophyte และปรสิตของเชื้อรา เอนไซม์ β -1, 3-glucanase แบ่งออก เป็น 2 ชนิด (Noronha and Ulhoa, 2000) คือ

1 Exo- β -1, 3-glucanase ทำหน้าที่ย่อยสลาย β -1, 3-glucan ได้ monosaccharides หรือ oligosaccharides

2 Endo- β -1, 3-glucanase ทำหน้าที่ย่อยสลาย β -1, 3-glucan ได้เฉพาะ monosaccharides เท่านั้น

B. subtilis สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม glucanase ได้หลายชนิด และที่มีบทบาทในการป้องกันกำจัดโรคพืชคือ β -1, 3-glucanase และ β -1, 6-glucanase ที่สามารถย่อยสลาย glucan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยจะทำลายพันธะ glycosidic linkage ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของกลูโคส แล้วปลดปล่อยกลูโคส หรือ oligosaccharides สายสั้น ๆ ออกมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

ค) เอนไซม์ Protease

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ protease ได้ protease สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างโดยเชื้อสาเหตุโรคพืชจึงส่งผลให้พัฒนาการของโรคลดลง เอนไซม์

protease ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน เอนไซม์ protease สามารถแบ่งตาม pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานได้ 2 ชนิด คือ Acidic protease มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงในช่วง pH 4.0-5.0 และ Alkaline protease มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงในช่วง pH 8.0-9.0

4) โดยการชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) เป็นกลไกที่กำลังได้รับความสนใจศึกษากันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่เคยเป็นเชื้อโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรค แล้วสามารถชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้

2.4 ลักษณะทั่วไปและความสำคัญของเชื้อ *Bacillus* spp.

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) รูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก (rod-shaped) อาจเป็นท่อนเดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย มีขนาด 0.5-2.5x1.2-10 ไมโครเมตร (Claus and Berkeley, 1986 ; Turnbull, Kramer and Melling, 1990 ; Rosovitz, Voskuil and Chamblis, 1998) หรือ 0.3-2.2x0.7-1.2 ไมโครเมตร (ดวงพร คันธโชติ, 2537) ต้องการออกซิเจนในการหายใจ บางครั้งสามารถเจริญได้ในที่ไม่ออกซิเจน (facultative anaerobe) สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore forming) 1 เซลล์ ต่อ 1 สปอร์ ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เจริญได้ในอาหารหลายชนิดเติบโตได้ดีในอุณหภูมิปกติ และ pH เป็นกลาง สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น protease และ amylase เป็นต้น เคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella การศึกษาลำดับ DNA base (DNA sequence) ในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีความแตกต่างกันอย่างมาก เปอร์เซ็นต์ G+C content มีความแปรปรวนตั้งแต่ 33 เปอร์เซ็นต์ ใน *B. anthracis* จนถึง 69 เปอร์เซ็นต์ ใน *B. thermocatenuatus* ซึ่งสูงกว่าความแปรปรวนของลักษณะภายในสกุล ปกติความแปรปรวนของลักษณะในสกุลไม่ควรเกิน 15 เปอร์เซ็นต์ (Priest, 1993 อ้างถึงใน Rosovitz *et al.*, 1998)

2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Bacillus* spp.

Bacillus spp. มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา กว้าง ลักษณะโคโลนีมีความแปรปรวนมากขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม คุณภาพ และปริมาณของอาหารเลี้ยงอายุโคโลนี และจำนวนโคโลนีต่อจานอาหารที่เลี้ยงมีผลต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี ดังนั้นจึงเป็นการยากในการแยกชนิดด้วยลักษณะโคโลนี อย่างไรก็ตามในสภาพแวดล้อมเดียวกันลักษณะโคโลนีสามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ (Rosovitz *et al.*, 1998) เช่น เมื่อเลี้ยงในอาหาร casein agar เชื้อ *B. megaterium* ให้โคโลนีมีสีเหลือง เชื้อ *B. firmus* ให้โคโลนีสีชมพู เชื้อ *B. licheniformis* ให้โคโลนีสีแดงถึงน้ำตาล เชื้อ *B. pumilus* ให้โคโลนีสีเหลืองอ่อน เชื้อ *B. sphaericus* ให้โคโลนีสีชมพู และเชื้อ *B. subtilis* ให้โคโลนีสีชมพู เหลือง ส้ม หรือน้ำตาล ในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต เชื้อ *B.*

subtilis var. *aterrimus* ให้โคโลนีสีน้ำตาลถึงดำ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร tyrosine agar ชื่อ *B. megaterium* และ *B. subtilis* var. *niger* ให้โคโลนีมีสีดำ เป็นต้น

เซลล์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ประกอบด้วย cytoplasmic membrane และ cell wall ในบางสายพันธุ์ เซลล์ของ *Bacillus* spp. ไม่มีชั้น outer membranes ซึ่งต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน cell wall ประกอบด้วย peptidoglycan หลายชั้น anionic polymers ทำให้ผนังเซลล์มีความเหนียว บริเวณผิวหน้าของ cell wall เป็นชั้นของ paracrystalline cell wall surface layers (S layers) ประกอบด้วยโปรตีน หรือ glycoprotein ชื่อ *Bacillus* spp. หลายชนิดสร้าง carbohydrate capsules เช่น poly-D-glutamic acid capsule สร้างโดย *B. anthracis* ทั้งในห้องปฏิบัติการและในสภาพธรรมชาติ ซึ่งเป็นการแสดงออกของ virulence factor (Meynell and Meynell, 1964 อ้างถึงใน Rosovitz *et al.*, 1998) *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาแบบ peritrichous flagella และการใช้แฟลกเจลลาเป็น antigens มีประโยชน์ในการตรวจจำแนก *B. cereus*, *B. thuringiensis* และ *B. sphaericus* (Turnbull *et al.*, 1990)

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* สร้างสปอร์ภายในเซลล์ เมื่ออาหารมีจำกัด เซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase และอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ความร้อน แสง UV และสารเคมีต่าง ๆ บางเซลล์อาจมีเอนโดสปอร์ บางชนิดอาจพบผลึกโปรตีน เช่น *B. thuringiensis* (Rosovitz *et al.*, 1998 ; จริยา จันทร์ไพแสง, นิพนธ์ ทวีชัย, สุดาวรรณ เขยชมศรี, ทิพย์วดี อรรถธรรม และสมนึก วงศ์ทอง, 2534) รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์และตำแหน่งการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ สามารถจำแนกแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ได้เป็น 3 กลุ่ม (สุรางค์ สุธิราวุธ, 2538) คือ

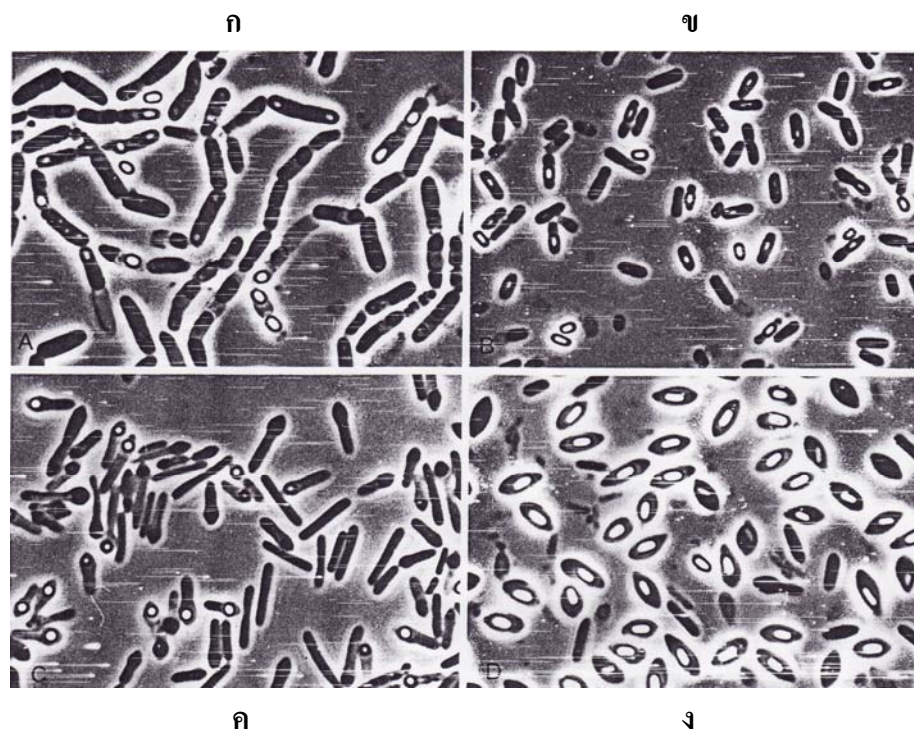
กลุ่มที่ 1 เซลล์ไม่โป่งพอง สปอร์เป็นรูปวงรีหรือรูปทรงกระบอก ตำแหน่งสปอร์อยู่ตรงกลาง หรือก่อนไปทางปลายเซลล์ กลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย (รูปที่ 2ก และ ข) คือ

กลุ่มที่ 1A : เซลล์มีขนาดใหญ่ กว้างมากกว่า 1 ไมโครเมตร ภายใน protoplasm จะมีแกรนูลที่ไม่ติดสีแกรม ทำให้เห็นเซลล์ไม่ติดสีเป็นช่วง ๆ ได้แก่ *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. cereus* var. *mycoides*, *B. thuringiensis* และ *B. anthracis*

กลุ่มที่ 1B : ขนาดเซลล์กว้างน้อยกว่า 1 ไมโครเมตร เช่น *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. licheniformis*, *B. firmus* และ *B. coagulans* เป็นต้น

กลุ่มที่ 2 เซลล์โป่งพอง สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ ตำแหน่งอยู่กลางหรือปลายเซลล์ (รูปที่ 2ค) ได้แก่ *B. circulans*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. alvei*, *B. laterosporus*, *B. brevis*, *B. popilliae*, *B. larvae*, *B. stearothermophilus* และ *B. lentimorbus*

กลุ่มที่ 3 สปอร์ทำให้เซลล์โป่งออก หรือบางครั้งไม่โป่ง สปอร์รูปร่างกลม ตำแหน่งอยู่ปลายหรือก่อนไปทางปลายเซลล์ (รูปที่ 2ง) เช่น *B. sphaericus*



รูปที่ 2.1 ลักษณะของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *Bacillus* spp.

กลุ่มที่ 1 (ก และ ข) กลุ่มที่ 2 (ค) กลุ่มที่ 3 (ง)

ที่มา : Sneath *et.al.* (1986)

2.4.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* spp.

Bacillus spp. สามารถสร้างเอนไซม์ catalase จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างจากแบคทีเรียสกุล *Clostridium* และ *Sporolactobacillus* ได้ มีบางชนิดที่สร้างเอนไซม์ catalase ได้น้อย หรือไม่สร้างเลย เช่น *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae* และ *B. stearothermophilus* (Turnball *et al.*, 1990) แบคทีเรียสกุล *Bacillus* ต้องการสารอาหารและสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ต้องการอาหารธรรมดาทั่วไปที่มีส่วนประกอบไม่ซับซ้อน กลุ่มที่ 2 ต้องการอาหารที่มีส่วนประกอบซับซ้อน และกลุ่มที่ 3 ต้องการอาหารเฉพาะสำหรับการเจริญเติบโต ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ ที่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต *Bacillus* spp. จะสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊ส ยกเว้น *B. polymyxa* และ *B. macerans* ที่สร้างแก๊สด้วย และคาร์โบไฮเดรตชนิดเดียวกันอาจจะให้แก๊สที่แตกต่างกัน เช่น *B. subtilis*, *B. cereus* และ *B. licheniformis* เจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสแล้วได้ 2, 3-butanediol และ glycerol ในขณะที่ *B. polymyxa* เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสแล้วได้ 2, 3-butanediol ethanal และ hydrogen ส่วน *B. macerans*

เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสแล้วได้ ethanal, acetone, acetic และ formic acid บางชนิดให้กรดแลคติก *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่สร้าง proteolytic enzyme และสามารถย่อย casein และ gelatin ได้

Bacillus spp. ทุกชนิดเจริญได้ดีในที่ ๆ มีออกซิเจน บางชนิดจำเป็นต้องมีออกซิเจน จึงจะสามารถเจริญได้ เช่น *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. firmus*, *B. megaterium* และ *B. sphaericus* ส่วน *B. cereus*, *B. athracis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa* และ *B. coagulans* บางครั้งสามารถเจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่สามารถตรึงไนโตรเจนและสามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ (Turnball *et al.*, 1990)

Bacillus spp. สามารถเจริญได้ดีที่ pH เป็นกลางหรือกรดเล็กน้อย แต่ *B. alcalophilus* สามารถเจริญได้ที่ pH 9-10 ขณะที่ *B. acidocaldarius* สามารถเจริญได้ที่ pH 2-6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus* spp. อยู่ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส ขณะที่ *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. brevis* และ *B. acidocaldarius* ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

2.5 นิเวศวิทยาของเชื้อ *Bacillus* spp.

Bacillus spp. พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ อากาศ ฝุ่น พืช เศษซากพืชหรือแม้แต่ในอาหาร นม และธัญญาหาร (Claus and Berkeley, 1986) *Bacillus* spp. พบได้ทุกสภาพแวดล้อม เพราะสปอร์ที่แบคทีเรียสร้างทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันทำให้ชนิดของ *Bacillus* spp. มีความหลากหลาย เช่น พวกที่ต้องการออกซิเจน (aerobes) ไม่ต้องการออกซิเจนเป็นบางช่วง (facultative anaerobes) เจริญได้ในสภาพกรด (acidophiles) สภาพด่าง (alkalophiles) สภาพที่มีความเค็ม (halophiles) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophiles) อุณหภูมิสูง (thermophiles) และพวกที่ใช้สารเคมีอนินทรีย์ในการเจริญ (chemolithotrophs) (Claus and Berkeley, 1986) ส่วนใหญ่เป็นพวกที่เจริญอยู่ในดิน แต่บางครั้งพบ *B. subtilis* และ *B. licheniformis* อยู่ในน้ำทะเลและน้ำกร่อย (Rosovitz *et al.*, 1998) *Bacillus* spp. ที่พบจะแตกต่างกันตามชนิดของดิน เช่น *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *B. cereus* ไม่ต้องการสารประกอบในอาหารมากนัก สามารถพบได้ในดินที่มีธาตุอาหารต่ำ *B. polymyxa* และ *B. azotofixans* พบในดินรอบ ๆ รากพืชที่มีธาตุอาหาร ส่วน *B. macerans* และ *B. circulans* ต้องการสารประกอบอาหารที่ซับซ้อนและพบในเศษซากพืชที่ย่อยสลาย (Priest, 1989 อ้างถึงใน Rosovitz *et al.*, 1998) *B. licheniformis*, *B. subtilis* และ *B. pumilus* พบในน้ำทะเลที่สะอาด

สกุล *Bacillus* บางชนิดเป็นเชื้อสาเหตุโรคแมลง เช่น *B. larvae*, *B. lentimorbus* และ *B. popilliae* เป็นเชื้อที่มีความจำเพาะต่อแมลงและสปอร์งอกได้ดีเฉพาะใน haemolymph ของแมลงเท่านั้น ขณะที่ *B. thuringiensis* พบได้บ่อยทั้งในดินและพืช ไม่ต้องการแมลงในการงอกของสปอร์

อย่างไรก็ตาม *Bacillus* spp. เชื้อสาเหตุโรคแมลงเหล่านี้สามารถพบได้ในแหล่งที่ตัวอ่อนของแมลงชอบเจริญอาศัยอยู่ เช่น แม่น้ำลำคลอง โคลน และทะเลสาบ *B. thuringiensis* var. *israelensis* แยกได้ครั้งแรกจากโคลนที่มีตัวอ่อนของแมลง (Margalit and Dean, 1985 อ้างถึงใน Rosovitz *et al.*, 1998)

Bacillus spp. หลายชนิดสามารถเจริญได้แม้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น *B. pasteurii* พบในสภาพแวดล้อมที่มียูเรียสูง แหล่งที่พบโดยทั่วไป คือ อ่างถ่ายปัสสาวะและดินในเขตเมือง *B. psychrophilus* และ *B. insolitus* พบในอาหารแช่แข็ง *B. acidocaldarius* เจริญเฉพาะในน้ำพุร้อนที่เป็นกรดและดินรอบ ๆ บริเวณนั้นเท่านั้น (Priest, 1989 อ้างถึงใน Rosovitz *et al.*, 1998) *B. coagulans* และ *B. stearothermophilus* พบในอาหารที่ต้องผ่านขบวนการให้ความร้อน เช่น น้ำตาลจากบีท (beet sugar) และอาหารกระป๋อง เป็นต้น (Priest, 1993)

2.6 ความสำคัญของเชื้อ *Bacillus* spp.

2.6.1 ความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม

Bacillus spp. ผลิตเอนไซม์ที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น เอนไซม์อะไมเลส (amylase) โปรติเอส (protease) และไลเปส (lipase) (จจินาฏ โภชเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล และ สมใจ สิริโชค, 2541) เอนไซม์โปรติเอส ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ หรือโพลีเปปไทด์ของโปรตีนเป็นกรดอะมิโน ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของโปรตีนใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เบียร์ เนยแข็ง อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมผงซักฟอก และใช้ในทางเภสัชกรรม เป็นต้น *B. acidocaldarius* และ *B. licheniformis* CMUC305 ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ที่ย่อยสลายพันธะ α -1, 4 glucosidic linkage ทนความร้อนสูง และคงทนต่อความเป็นกรด-เบส ในช่วงกว้าง มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร การย่อยแป้ง การผลิตแอลกอฮอล์ และอุตสาหกรรมทอผ้า *B. licheniformis* และ *B. stearothermophilus* ผลิตเอนไซม์ไลเปส ที่ย่อยสลายไขมันพวกไตรกลีเซอไรด์ โดยไฮโดรไลสพันธะเอสเทอร์ของกลีเซอรอล (glycerol-ester hydrolase) ให้กรดไขมันและกลีเซอรอล ใช้มากทั้งอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การสังเคราะห์กลิ่นและรส กรดไขมันและอุตสาหกรรมผงซักฟอก เป็นต้น นอกจากนี้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ยังมีบทบาทในการจัดการสิ่งแวดล้อม โดยนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียและขยะในแหล่งชุมชน และยังมีสาร subtilisins ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* spp. หลายชนิดใช้ในการทำความสะอาด contact lens ใช้ในกระบวนการผลิต collagen และ gelatin และอุตสาหกรรมอื่น ๆ เอนไซม์อื่นที่แยกได้จาก *Bacillus* spp. ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตนม แป้ง เครื่องดื่ม อาหารและเบียร์ (Zukowski, 1992)

สารปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. เช่น bacitracin ผลิตจาก *B. licheniformis* สาร polymyxin ผลิตจาก *B. polymyxa* สาร gramicidin และ สาร tyrocidine ผลิตจาก

B. brevis สาร subtilin และ bacilycin ผลิตจาก *B. subtilis* นอกจากนี้ *Bacillus* spp. ที่เป็นโทษกับมนุษย์และสัตว์มี 2 ชนิด คือ *B. anthracis* ซึ่งผลิตสารที่มีความเป็นพิษสูงเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกซ์ (anthrax) ที่มีความร้ายแรงถึงตายได้ และ *B. cereus* เป็นสาเหตุของอาการอาหารเป็นพิษ และอาการท้องร่วง (Erkendur, Ole, Henning, Agens, Michele, Ida and Anne, 2000)

นอกจากนี้ยังรายงานการใช้ *B. thuringiensis* ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีโดยเชื้อผลิต intracellular protein toxin ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตัวอ่อนของแมลงหลายชนิดในอันดับ Lepidoptera และ Coleoptera เมื่อแมลงได้รับสารพิษโดยการกินเข้าไป จะไปทำลายเยื่อทุกระเพาะอาหารของแมลง จนแมลงตายด้วยอาการโลหิตเป็นพิษ แต่สารนี้ไม่เป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ปลา นก พืช และจุลินทรีย์อื่น ๆ (Erkendur et al., 2000)

2.6.2 ความสำคัญด้านการควบคุมโรคพืช

เชื้อ *Bacillus* spp. มีกลไกในการควบคุมโรคพืชได้หลายวิธี ได้แก่ การแข่งขันกับเชื้อโรคพืช และการผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายชีวิต มณจันทร์ เมฆชน (2536) รายงานว่าเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ AP01 สามารถเข้าครอบครองพื้นที่ก่อนการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium roseum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวและโคนเน่าของกล้วยไม้ และเชื้อ *Pythium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้มโอ เมื่อนำ *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และ NSRS 89-26 คลุกเมล็ดข้าวหรือแช่เมล็ดพันธุ์ก่อนปลูก พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถลดความรุนแรงของโรคขอบใบแห้ง สาเหตุจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* จากระดับความรุนแรงของโรค 94 เป็น 19 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวที่สำคัญ 7 ชนิด คือ *Pyricularia oryzae*, *Cercospora oryzae*, *Thanatephorus cucumeris*, *Curvularia oryzae*, *Acrocyndrium oryzae*, *Rhynchosporium oryzae* และ *Alternaria padwickii* (Charigkapakorn, Noonim, Aneckachi and Warensahd, 1991) นอกจากนี้ลินี จาริกภากร, พาณี หนูนิ่ม, บุญมี วารินสอาด, พิรุณ จันทนกุล และมนูญ เอนกชัย (2534) ทำการทดสอบการควบคุมโรคโดยวิธีการคลุกเมล็ด พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-26 ช่วยลดอัตราการเกิดโรคของเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าได้ดี ไม่มีผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การงอกและความแข็งแรงของเมล็ด ต้นกล้าเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมล็ดที่ไม่มีการคลุกเชื้อแบคทีเรีย และมีความเหมาะสมที่จะใช้ในสภาพที่มีโรคระบาดหรือมีโรคที่ติดมากับเมล็ดสูง ขณะที่พาทกเพียร อรัญนารถ, นงรัตน์ นิลพานิชย์, วิจิต สิริสันชนะ และสมคิด ดิสถาวร (2544) ศึกษาประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว พบว่าชีวภัณฑ์ 4 ชนิด คือ TRF สูตร A, TRF สูตร B, Larminar WP และ Agroguard Liq. มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวได้ดี ทั้งในสภาพเรือนทดลอง และแปลงทดลองในฤดูนาปี และนาปรัง แม้จะให้ผลไม่เท่ากับสารป้องกันกำจัดโรคพืช validacin 3% Liq. แต่ในด้านผลผลิตข้าว ชีวภัณฑ์ TRF สูตร A, TRF สูตร B และ Larminar WP

ให้ผลผลิตไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช validacin 3% Liq. ซึ่งทำให้เกิดแนวทางที่จะนำชีวภัณฑ์ *B. subtilis* มาทดแทนสารป้องกันกำจัดโรคพืช ในการป้องกันโรคกาบใบแห้งของข้าว และมีการใช้ *B. firmus* ควบคุมโรคใบจุดนูนของถั่วเหลือง (สุพจน์ กาเซิม และสุคฤดี ประเทืองวงศ์, 2546 ; รัชฎาพรรณ เดชมณี และสุคฤดี ประเทืองวงศ์, 2546) ศรีสุดา กวาศกุล (2536) รายงานว่า *Bacillus* spp. หลายชนิดสามารถควบคุมเชื้อรา *F. moliforme* Sheldon สาเหตุโรครากและลำต้นเน่าของอ้อยได้ *B. subtilis* NE1 และ NE2 ควบคุมเชื้อ *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ (สุมาลี เหลืองสกุล, เสริมสิน ศิริวัฒนา, สมใจ ศิริโชค และขจีนาฏ โพธิเวชกุล, 2542) นอกจากนี้ Shoda (2000) รายงานว่า *B. subtilis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, mycosubtilin, bacilysin, fengymycin และ mycobacillin ขึ้นอยู่กับอาหาร (substrate) ที่เหมาะสม ในขณะที่เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ FR-2 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ Iturin A ที่มีฤทธิ์ต่อต้านโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราในแดงกวาง โรคใบไหม้และโรคกาบใบแห้งของข้าว (Pusey, 1989) Rytter, Lukezic, Craig and Moorman (1989) รายงานว่าเชื้อ *B. subtilis* เข้าไปเจริญและทำลายสปอร์ของเชื้อราสนิมในพืชพวกไม้ดอก นอกจากนี้เชื้อ *B. subtilis* ยังมีความสามารถในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) โดยการผลิตสาร toxic metabolite บางชนิดที่เป็นประโยชน์ในการชักนำหรือกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotinia sclerotium* (นลินี จาริกภากร, พาณี หนูเนียม, บุญมี วารินสอาด และมนูญ อนุชชัย, 2535) *Bacillus* spp. มีการผลิต hydrolytic enzyme ขึ้นมาซึ่งเป็นกลไกในการควบคุมโรคจากงานทดลองของ Manjula, Kishore and Podile (2004) รายงานว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* AF1 สามารถสร้าง Chitinases ในการควบคุมโรคราสนิม ของถั่วลิสง ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Puccinia arachidis* โดยได้ทดลองใช้รูปแบบต่างของ *B. subtilis* AF1 คือ fresh cell, cell-free culture filtrate (CCF) และ β -1, 4-N-acetylglucosaminidase (NAGase) (chitinase) พบว่าทั้งสามรูปแบบมีผลในการยับยั้งการงอกของ uredospore ได้ 90.2, 86.4 และ 96.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และยังทำให้ germ tube มีความยาวลดลง โดยไปทำให้ cytoplasm มีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ และ germ tube จะถูกย่อยสลาย และย่อยสลาย chitin ในผนังเซลล์ เมื่อนำเซลล์ของ *B. subtilis* AF1 จากระยะ log phase และ alginate formulation, CCF และ NAGase มาควบคุมโรคโดยเทคนิค detached leaf พบว่าทั้งสี่รูปแบบมีผลทำให้พัฒนาการของโรคราสนิมลดลง โดย fresh cell ของ *B. subtilis* AF1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมมากที่สุด ตามด้วย alginate formulation, NAGase และ CCF ตามลำดับ ในขณะที่ Eldoksch, Atteia and Abdel-Moity (2001) พบว่า *B. subtilis* สามารถลดความรุนแรงของโรคราสนิมในข้าวสาลี ได้ถึง 57.14 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น subtilin, bacillin, bacillomycin, subtenolin, mycosubtilin, toximycin, bacitracin, xanthobacidin, iturin, subtilosin และ subsporin complex ขณะที่ Niranjana Raj,

Chaluvaraju, Amruthesh and Shetty (2003) พบว่า *Bacillus* spp. มีคุณสมบัติเป็น plant growth promotion rhizobacteria (PGPR) และมีคุณสมบัติในการชักนำให้ pearl millet (*Pennisetum glaucum*) เกิดความต้านทานโรคราน้ำค้าง โดย *Bacillus* spp. ส่งเสริมการงอกของเมล็ดพืชให้สูงขึ้น และส่งเสริมการเจริญทางด้าน vegetative growth เช่น ความสูง พื้นที่ใบ จำนวนของ tillers และส่งเสริมการเจริญทางด้าน reproductive growth เช่น เพิ่มขนาด ความยาวของผล เพิ่มน้ำหนักผลผลิตให้สูงขึ้น แต่ไม่มีการทดลองว่ามีกลไกอย่างไรบ้าง นอกจากนี้ยังลดการเกิดโรค ซึ่งความต้านทานโรคอาจเนื่องมาจาก *Bacillus* spp. ทำให้พืชมีการสร้างสาร phenols เพิ่มขึ้น แต่จะลดปริมาณ sugar ซึ่งมีผลทำให้พืชมีความต้านทานโรคสูงขึ้น (El-Rafai, Asswah and Awdalla, 2003)

นอกจากนี้ประไพศรี สมใจ, พวงเพ็ญ สุยะนันท์, บัณฑิต ผึ้งสินธุ์, ภูษิตา วรรณิสสร และจิราภรณ์ วัฒนะกุล (2540) พบว่าสารชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ TISTR1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราโรคพืชได้ สุมาลี เหลืองสกุล และคณะ (2542) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *B. subtilis* จากดินเพื่อควบคุมเชื้อ *F. oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ พบว่า *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ดี และสามารถคงทนอยู่ในดินได้นานหลังเก็บเกี่ยวผลผลิตเป็นเวลา 8 เดือน ปรากฏว่ายังพบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์นี้อยู่ในดินสำหรับความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคพืชชนิดอื่น ๆ แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช

ชนิดของ <i>Bacillus</i> sp.	เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง	โรค	ที่มา
<i>B. subtilis</i>	<i>Puccinia recondita</i>	Brown leaf rust of wheat	Eldoksch, Atteia, and Abdel – Moity, 2001
<i>B. subtilis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	Vascular wilt of lentil	EL-Hassan. and Gowen, 2006
<i>B. subtilis</i>	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Fusarium wilt of tomato	El – Rafai, Asswah, and Awdalla, 2003
	<i>Verticillium dahliae</i>	Verticillium wilt of tomato	
	<i>Alternaria solani</i>	Early blight of tomato	
<i>B. subtilis</i> GB03	<i>Rhizobium solani</i>	Dry bean root rot	Estevez de Jensen, Percich and Graham, 2002
<i>B. subtilis</i> KS03	<i>Gloeosporium gloeosporioides</i>	Anthraxnose of vegetables and fruits	Cho, Lee, Cha, Kim, and Shin, 2003
<i>B. subtilis</i> QRD137	<i>Monilinia vaccinii-corymbosi</i>	Mummy berry of blueberry	Scherm, Ngugi, Savelle and Edwards, 2004
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Botrytis cinerea</i>	Grey mould of grapevine	Paul, Chereyathmanjijil, Masih, Chapuis and Benoit, 1998
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Phytophthora capsici</i>	Phytophthora blight of bell pepper	Jiang, Guo, Li, Qi, and Guo, 2006
<i>B. subtilis</i>	} <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Black rot in cabbage	Wulff, Mguni, Giese, Fels, Lubeck and Hockenull , 2002
<i>B. pumilus</i>			
<i>B. amyloliquefaciens</i>			
<i>B. megaterium</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	Fire blight of apple and pear	Jock, Volksch, Mansvelt and Geider, 2002
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Root rot of soya bean	Souto, Correa, Montecchia, Kerber, Pucheu and Bachur, 2004
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Anthraxnose of watermelon	Kim and Chung., 2004
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Botrytis elliptica</i>	Grey mould of grapevine	Chiou and Wu, 2001

2.7 ลักษณะทั่วไปและความสำคัญของเชื้อ *Streptomyces* spp.

เชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Streptomycetaceae เป็นสกุลที่มีจำนวนมากและสำคัญที่สุดในแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะคล้ายเชื้อราอาศัยอยู่ทั่วไปในดิน ปุ๋ยหมัก น้ำ ละอองฝุ่น อากาศ เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ฝังลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ลักษณะเส้นใยไม่มีผนังกัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่เส้นใยอากาศจะสร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ ซึ่งมีรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ แบบเส้นตรง (rectiflexibile) แบบลูกปัด (retinaculiaperti) และแบบเวียนเกลียว (spiral) ลักษณะผิวสปอร์ มี 5 แบบ คือ ผิวเรียบ (smooth) ผิวเป็นหนาม (spiny) ผิวเป็นขน (hairy) ผิวเป็นปุ่มปม (warty) และผิวขุ่น (rugose) (Tresner, Davies and Backus, 1961 ; Dietz and Methews, 1971) ลักษณะโคโลนีในระยะแรกผิวโคโลนีเรียบ เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยอากาศจะพัฒนาเป็นสปอร์ ทำให้ผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายแป้ง (powdery) หรือกำมะหยี่ (velvet) มีหลายสี ได้แก่ ขาว เทา แดง เหลือง เขียว น้ำเงิน และม่วง ซึ่งเป็นสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบน ส่วนด้านล่างโคโลนีมีเส้นใยอาหารเป็นสีน้ำตาลส่วนใหญ่ แต่อาจพบสีอื่น เช่นเดียวกับสีสปอร์ *Streptomyces* spp. สร้างรงควัตถุหลายชนิด นอกจากนี้ยังผลิตสาร geosmin (Trans-1, 10-dimethyl decalol) มีกลิ่นคล้ายกลิ่นดิน (earth odor) *Streptomyces* spp. ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตเป็นพวก chemo-organotrophic เมตาบอลิซึม เป็นแบบ oxidative สามารถรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนโตรท ย่อยอะดีนีน (adenime) เอสคูลิน (esculin) เคซีน (casein) เจลาติน (gelatin) ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) แป้ง และไทโรซีน (L-tyrosine) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส pH 6.5-8.0 ส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile มีบางชนิดที่เป็นพวก psychrophile และ thermophile เปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์มีส่วนประกอบหลักเป็น L-diaminopimelic (LL-DAP) และไกลซีน (Lechevalier and Lechevalier, 1970) ใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงาน เช่น กลูโคส กลิเซอรอล และเปปโติน เป็นต้น ทนเค็มได้ดีที่ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ บางชนิดทนได้ถึง 13 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการสร้างสารปฏิชีวนะ *Streptomyces* spp. จำเป็นต้องใช้แร่ธาตุบางชนิดได้แก่ โซเดียม แมกนีเซียม แคลเซียม และฟอสเฟต เป็นต้น (Williams, Goodfellow and Alderson, 1989)

Streptomyces spp. สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย (anti-bacterial agent) เช่น ampicillin, penicillin-N ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงเบต้าแลคแทม (β -lactamring) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย โอลินโดมัยซิน (oleandomycin) เป็นสารพวกแมคโครไลด์ (macrolide) ผลิตโดย *S. antibioticus* (Swan, Rodriguez, Vilches, Mendez and Salas, 1994) ซึ่งจะจับกับไรโบโซมและยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

สารต่อต้านเชื้อรา (anti-fungal agent) เช่น แคนดิซิดิน (candicidin) เป็นสารพวกโพลีอินแมคโครไลด์ (polyene macrolide) ผลิตโดย *S. griseus* (Lechevalier, Acker, Corke, Haenseler and Waksman, 1953) มีฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ของเชื้อรา nystatin มีโครงสร้างเป็น polyene มีสมบัติฆ่าเชื้อราได้หลายชนิด polyoxin มีโครงสร้างเป็น nucleoside มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์เชื้อรา anthracycline นอกจากเป็นสารต่อต้านเชื้อรายังเป็นสารต่อต้านมะเร็งด้วย โดยมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II ในเชื้อรา ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองดีเอ็นเอได้

นอกจากสารปฏิชีวนะแล้ว *Streptomyces* spp. ยังสร้างสารต่อต้านมะเร็ง (anti-tumour agent) เช่น บลีโอมัยซิน (bleomycin) เป็นสารพวกไกลโคเปปไทด์ (glycopeptide) ผลิตโดย *S. verticillus* (Umezawa, Maeda, Takeuchi and Okami, 1966) มีผลทำให้สายดีเอ็นเอขาด limocrocin ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค สารปฏิชีวนะที่สร้างโดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดแสดงในตารางที่ 2.2 และลักษณะของการออกฤทธิ์ของสารเหล่านั้นแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 สารปฏิชีวนะบางชนิดที่ผลิตจากเชื้อในสกุล *Streptomyces* spp. และฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (ที่มา : อนันต์ วงเจริญ, 2547)

สารปฏิชีวนะ	<i>Streptomyces</i> sp. ที่ผลิต	เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง
Amphotericin B	<i>S. nodosus</i>	เชื้อรา
Chloramphenicol	<i>S. venezuelae</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ริกเกตเซีย และไวรัส
Erythromycin	<i>S. erythraeus</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และ โปรโตซัว
Kanamycin	<i>S. kanamyceticus</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และ โปรโตซัว
Vancomycin	<i>S. orientalis</i>	แบคทีเรียแกรมบวก
Aureomycin	<i>S. aureofaciens</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Streptomycin	<i>S. griseus</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Neomycin	<i>S. fradiae</i>	แบคทีเรียแกรมลบ
Tetracycline	<i>S. rimosus</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Novobiocin	<i>S. spheroids</i>	แบคทีเรียแกรมบวก
Coumermycin	<i>S. rishiriensis</i>	แบคทีเรียแกรมบวก
Clorobiocin	<i>S. roseochromogens</i>	แบคทีเรียแกรมบวก
Lincomycin	<i>S. lincolnensis</i>	แบคทีเรีย
Rapamycin	<i>S. hygroscopicus</i>	เชื้อรา

ตารางที่ 2.3 ลักษณะการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* spp.

สารปฏิชีวนะ	ลักษณะการออกฤทธิ์	ชนิดของ	ที่มา
<i>Streptomyces</i> sp.			
Avermectin	Antiparasitic	<i>S. avermitilis</i>	Burg, <i>et al.</i> , 1979
Anthracyclins	Antitumor	<i>S. galileus</i>	Fujii and Ebizuka, 1997
Bafilomycin	ATPase-inhibitor of micro-organisms, plant and animal cells	<i>S. griseus</i> <i>S. halstedii</i>	Werner, Hagenmaier, Drautz, Baumgartner, and Zahner, 1984 Frandberg, Petersson, Lundgren, and Schnurer, 2000
Chloramphenicol	Antibacterial, inhibitor of protein biosynthesis	<i>S. venezuelae</i>	Bewick, Williams, and Veltkamp, 1976
Hygromycin	Antimicrobial, immunosuppressive	<i>S. hygrosopicus</i>	Omura, Nakagawa, Fujimoto, Saito, Ootoguro and Walsh, 1987 Uyeda, Mizukami, Yokomizo, and Suzuki, 2001
Lincomycin	Antibacterial, inhibitor of protein biosynthesis	<i>S. lincolnensis</i>	Peschke, Schmidt, Zhang and Piepersberg, 1995
Mitomycin C	Antitumor, binds to double-stranded DNA	<i>S. lavendulae</i>	Mao, Varoglu and Sherman, 1999
Rapamycin	Immunosuppressive, antifungal	<i>S. hygrosopicus</i>	Vezina, Kudelski and Sehgal, 1975
Streptomycin	Antimicrobial	<i>S. griseus</i>	Egan, Wiener, Kallifidas and Wellington, 1998
Streptozotocin	Diabetogenic	<i>S. achromogenes</i>	Herr, Jahnke and Argoudelis, 1967
Tetracyclines	Antimicrobial	<i>S. aureofaciens</i> <i>S. rimosus</i>	Saleh, Mahmoud, El-Haddad and Abdel-Fatah, 1985 Hansen, Ferrari, Sorensen, Veal and Sorensen, 2001
Valinomycin	Ionophor, toxic for prokaryotes and eukaryotes	<i>S. griseus</i>	Andersson, <i>et al.</i> , 1998

Streptomyces spp. สามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์เป็นสารฆ่าแมลง (insecticidal agent) ได้แก่ นิกโกมัซซิน (nikkomycin) เป็นสารพวกนิวคลีโอไซด์ (nucleoside) ผลิตโดย *S. tendae* (Muller, Further, Zahner and Rast, 1981) มีผลต่อการสังเคราะห์โคตินและสารในกลุ่ม macrolide เช่น avermectin ซึ่งมีผลยับยั้งการลอกคราบของแมลง และยังพบสารฆ่าวัชพืช (herbicidal agent) เช่น ไบอะลาฟอส (bialaphos) เป็นสารพวกเปปไทด์ ผลิตโดย *S. hygroscopicus* มีผลต่อเอนไซม์กลูตามีนซินทีเทส (glutamine synthetase) (Tachibana and Kaneko, 1986)

นอกจากนี้มีการนำ *Streptomyces* spp. ไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม และทางการแพทย์ เพราะมีความจำเพาะกับสับสเตรทและความคงตัวสูงกว่าเอนไซม์จากแบคทีเรียหรือเชื้อราอื่น ๆ เช่น เอนไซม์ glucose isomerase ซึ่งมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลฟรุกโตส ซึ่งให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลทรายหลายเท่า (Crawford, Barder, Pometto and Crawford, 1982 ; McCarthy, 1987 ; Pasti-Grigsby, Paszczynski, Goszczynski, Crawford and Crawford, 1992) เอนไซม์อื่นที่มีความสำคัญทางการค้า เช่น chitinase, cellulase, amylase, protease (Taguchi., Kojima, Terabe, Kumazawa, Suzuki, Miura And Momose, 1997) xylanases (Wateewuthajam and Pinphanichakarn, 2000) และ lipases (Vujaklijal, 2003)

2.8 เชื้อ *Streptomyces* spp. กับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

มีการศึกษาการใช้ *Streptomyces* spp. เพื่อควบคุมแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรคในมะเขือเทศ พบว่าเมื่อนำเมล็ดของมะเขือเทศเคลือบด้วยสปอร์ของสเตรปโตมัซซิทก่อนนำไปปลูก สามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด และจากการทดลองในสภาพห้องทดลอง น้ำเลี้ยงเชื้อของ *S. pulcher* หรือ *S. canescens* เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Verticillium alboatrum* และ *A. solani* (El-Abyad, El-Abyad, El-Shanshoury and El-Sabbagh, 1993) สารปฏิชีวนะที่ *Streptomyces* spp. สร้างส่วนใหญ่จะเป็นสารต่อต้านแบคทีเรีย (Anti-bacterial agent) เช่น โอลีนโดมัซซิน (Oleandomycin) เป็นสารพวกแมโครไลด์ (Macrolide) ผลิตโดย *S. antibioticus* (Swan, Rodriguez, Vilches, Mendez and Salas, 1994) ซึ่งจะไปจับกับไรโบโซม และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน สาร clavams ผลิตโดย *S. clavuligerus* (Muller, Toome, Pruess, Blount and Weigele, 1983) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบตาแลคแทมเมส (β -lactamase) ที่ผลิตโดย *Staphylococci* และแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด สเตรปโตมัซซินผลิตโดย *S. griseus* (Herzog, 1964) และนีโอมัยซิน (neomycin) ผลิตโดย *S. fradiae* (Sasarman, Horodniceanu, Gritaenco, Antohi and Surdeanu, 1964) ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบชนิดแท่งและกลมบางชนิด รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกชนิดกลมบางชนิด และยังมีผลต่อ *Mycobacterium tuberculosis* ด้วย นอกจากนี้ Blastocidin S ผลิตโดย *S. griseochromogenes* (Takeuchi, Hirayama, Ueda, Sakai

and Yonehara, 1958) ต่อด้านเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคพืชบางชนิด โดยยับยั้งการพัฒนาเส้นใย การสังเคราะห์โปรตีน การงอกของสปอร์และการสร้างสปอร์ของ *Pyricularia oryzae* โดยออกฤทธิ์ เหมือน organomercuric fungicide แต่มีความเป็นพิษน้อยกว่าสาร Kasugamycin ผลิตโดย *S. kasuagensis* และ *S. kasugaspinus* ออกฤทธิ์ต่อด้านยีสต์และเชื้อรารวมทั้ง *P. oryzae* และแบคทีเรีย บางชนิด เช่น *Pseudomonas* โดยจะยับยั้งการพัฒนาเส้นใยของ *P. oryzae* ในข้าว ยับยั้งการ สังเคราะห์โปรตีน แต่ไม่ปรากฏว่ายับยั้งการงอกของสปอร์ (Sato, 1983) Polyoxin ผลิตโดย *S. cacaoi* var. *asoensis* จะไปยับยั้งการสังเคราะห์ไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา และทำให้เซลล์เกิดการบวม (Isono, Nagatsu, Kobinata, Sasaki and Suzuki, 1965) นอกจากนี้ Mahadevan และ Crawford (1997) พบว่า *S. lydicus* WYEC108 สามารถสร้าง chitinase ซึ่งมี คุณสมบัติในการต่อด้านเชื้อราได้หลายชนิด โดยสารดังกล่าวจะเข้าไปย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อ ราสาเหตุโรคพืช ขณะที่ Ranjeet *et al.*, (2002) พบว่า *S. lydicus* WYEC108 นอกจากสามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราได้แล้วยังสามารถเพิ่มขยายจำนวนบริเวณรอบรากต้นถั่ว (*Pisum sativum*) ได้ ดี และได้มีการนำมาผลิตในชื่อการค้า Actinovate (Brain and Deborah, 2002) เช่นเดียวกับ *S. griseoviridis* ที่ได้นำมาใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ เช่น *Alternaria* sp., *Stemphylium* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Helminthosporium* sp. และ *Botrytis* sp. ซึ่งได้นำมาผลิตในชื่อการค้า Mycostop นอกจากนี้เชื้อยังสามารถเจริญได้บริเวณ รอบรากพืช ทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชเพิ่มมากขึ้น

การศึกษาประสิทธิภาพของ *Streptomyces* spp. ในการป้องกันกำจัดโรคพืชชนิดต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างการศึกษาการใช้ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคพืช

<i>Streptomyces</i> sp.	โรคพืช	เชื้อสาเหตุ	ที่มา
<i>Streptomyces</i> sp. S99	Clubroot of crucifers	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	Ceath, Kent and Gowers, 2001
<i>Streptomyces</i> sp.	Fusarium wilt of tomato	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Kopperl and Mitchell, 1998
	Fusarium crown rot of tomato	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>	
<i>Streptomyces</i> sp.	Bacterial leaf spot of pepper	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Jones and Samac, 1996
<i>Streptomyces</i> sp. Di-944	Damping-off of vegetables	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Sabaratnam, 2002
<i>S. lydicus</i> WYEC180	Seed and root rot	<i>Pythium ultimum</i>	Yuan and Crawford, 1995
<i>Streptomyces</i> sp. 93	Damping-off of vegetables	<i>Phytophthora</i> sp.	Jones and Samac, 1996
<i>S. diastatochromogenes</i> PonSSII	Potato scab	<i>Streptomyces scabies</i>	Neeno, 2001
<i>Streptomyces</i> sp.	Basal rot of narcissus	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>narcissi</i>	Lea, 1995
<i>S. viridodiasticus</i>	Basal drop	<i>Sclerotinia minor</i>	Tarabily, 2000
<i>Streptomyces</i> sp.	Stem rot of chrysanthemum	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Yesim, 2003
<i>Streptomyces</i> sp.	Root rot of soybean	<i>Phytophthora medicaginis</i> , <i>P. sojae</i>	Xiao, Kinkel and Samac, 2001
<i>S. hygrosscopicus</i> 10-22	Rice sheath blight	<i>Pellicularia sasakii</i>	Pang, 2002
	Seedling blight	<i>P. filamentosa</i>	
<i>S. exfoliatus</i>	Chocolate spot of faba bean	<i>Botrytis fabae</i>	Mahmoud, Ebrahim and Aly, 2004
<i>Streptomyces</i> sp. AMG-P1	Blight and rots of plant	<i>Phytophthora</i> sp. <i>Pythium</i> sp.	Lee, Kim, Kim, Choi, Park, Kim and Jung, 2005
<i>S. griseorubiginosus</i>	Fusarium wilt of banana	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	Cao, Qiu, You, Tan and Zhou, 2005
<i>Streptomyces</i> sp. Di-944	Damping – off of tomato	<i>Rhizoctonia solani</i>	Sabaratnam and Traquair, 2002
<i>Streptomyces</i> sp. DAUFPE 11470 and DAUFPE 14632	Ear rot of maize	<i>Stenocarpella maydis</i>	Bressan and Figueiredo, 2005

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. จากดิน

3.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกองุ่นในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สวนเกษตรกร อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี ทั้งจากแปลงที่มีและไม่มี การแพร่ระบาดของโรค โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินตามแนวเส้นทแยงมุมในแปลงขนาด 30x30 เมตร ที่ความลึก 0-15 เซนติเมตร จำนวน 5 จุด ๆ ละ 500 กรัม รวมเป็นหนึ่งตัวอย่างต่อหนึ่งพื้นที่ปลูก แล้วนำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.

3.1.2 การแยกเชื้อ *Bacillus* spp.

แยกเชื้อ *Bacillus* spp. ตามวิธีการของ สุรางค์ สุทธิราชู (2538) โดยวิธี streak plate method โดยชั่งตัวอย่างดิน 20 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำ 60 มิลลิลิตร คนให้ละลายและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10-20 นาที หรือ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำสารแขวนลอยดังกล่าวมา streak บนอาหาร *Bacillus* Medium (ภาคผนวก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1-2 วัน เลือกเก็บโคโลนีที่เชื้อมีรูปร่างของเซลล์เป็นท่อนและเป็นแกรมบวกเท่านั้น จากนั้นนำมาเลี้ยงให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ก่อนเก็บเชื้อลงใน Nutrient Agar (NA) slant เพื่อไว้ทดลองต่อไป

3.1.3 การแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

แยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ตามวิธีการของ วชิร ใจภักดี (2544) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.1.3.1 การเตรียมตัวอย่างดิน (pre-treatment)

นำตัวอย่างดินมาทำให้แห้ง 2 วิธี คือ ผึ่งลม 2-3 วัน หรืออบในตู้อบอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างดินมาตัวอย่างละ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที

3.1.3.2 การแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

นำสารแขวนลอยที่ผ่านการทำ pre-treatment มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ทำการแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยวิธี spread plate method บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) (ภาคผนวก) หรือ M3 Agar (ภาคผนวก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) เป็น

เวลา 1-4 สัปดาห์ เก็บโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะตัวของเชื้อ *Streptomyces* spp. คือเซลล์คล้ายเส้นใย เชื้อราแต่มีการเจริญเติบโตช้า เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เส้นใยมีขนาดเล็กกว่าเชื้อราเพื่อไว้ทดลองต่อไป

3.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*)

ทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นตัวแทนเชื้อใน class เดียวกันกับเชื้อสาเหตุโรคองุ่นที่ต้องการศึกษา คือ โรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิม เนื่องจากเชื้อโรคราน้ำค้างและราสนิมไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ เจริญได้ช้ามากจึงต้องทำการทดสอบกับเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหารทดสอบ โดยวิธี dual culture บนอาหาร PDA โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 5-7 วัน เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. บนอาหาร NA เป็นเวลา 1-2 วัน และ *Streptomyces* spp. บนอาหาร Oatmeal Agar (OA) (ภาคผนวก) เป็นเวลา 10-14 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราแต่ละชนิด ย้ายชิ้นวุ้น 2 ชิ้น ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชลงบนอาหาร PDA แล้วปลูกเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในด้านตรงข้ามเว้นระยะห่างเท่ากันโดยทำแยกกันแต่ละเชื้อ ใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) ย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อแต่ละชนิดลงบนอาหาร PDA โดยปล่อยให้เจริญเป็นอิสระเพื่อใช้เปรียบเทียบ (control) บันทึกผลการทดลองโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อโรคในงานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมและในงาน control

ประเมินศักยภาพเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. แต่ละไอโซเลต โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (Percent Inhibition of Diameter Growth = PIDG) ตามวิธีการของ เกษม สร้อยทอง (2532) ดังนี้

$$PI = (D1 - D2)/D1 \times 100 \text{ โดย}$$

D1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อโรคใน control

D2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อโรคในงานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

ทำการเปรียบเทียบระดับการเกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่อต้าน โดยให้เป็นระดับคะแนนดังนี้

4 = > 75 PIDG (Very high antagonistic activity)

3 = 61-75 PIDG (High antagonistic activity)

2 = 51-60 PIDG (Moderate antagonistic activity)

1 = < 50 PIDG (Low antagonistic activity)

3.3 การทดสอบผลกระทบของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ต่อใบอ่อน

3.3.1 การเตรียมเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.

นำเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 อันดับแรก จากข้อ 3.2 และ *B. subtilis* ที่ผลิตในรูปของการค้า มาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมให้อยู่ในระยะ log phase (เชื้อ *Bacillus* spp. อายุ 1-2 วัน สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. อายุ 5 วัน) และ stationary phase (เชื้อ *Bacillus* spp. อายุ 2-3 วัน และเชื้อ *Streptomyces* spp. อายุ 14 วัน) จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกตะกอนของเชื้อออกเพื่อนำมาทำเป็น cell suspensions เพื่อไว้ทดลองต่อไป นำส่วนน้ำใส (supernatant) ที่ได้ไปกรองผ่านเยื่อกรองที่มีรูกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บไว้เพื่อทดสอบต่อไป

3.3.2 การเตรียม cell suspensions ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.

นำ cell suspensions ของเชื้อ *Bacillus* spp., *B. subtilis* และ *Streptomyces* spp. จากข้อ 3.3.1. มาปรับระดับความเข้มข้นให้มีระดับความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (โดยนำสารแขวนลอยของเชื้อปรับปริมาณโดยใช้ค่าดูดซับแสง OD_{600nm} เท่ากับ 0.4 สำหรับเชื้อ *Bacillus* spp. และ OD_{600nm} เท่ากับ 70 สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp.) (Harris and Adkins, 1999 ; Xiao, Kinkel and Samac, 2001) เก็บไว้ทดสอบต่อไป

3.3.3 การตรวจสอบผลของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ต่อใบอ่อน

เพื่อเป็นการทดสอบผลกระทบของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ต่อใบอ่อน ก่อนนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืช นำส่วน cell suspensions (จากการเตรียมในข้อ 3.3.2) และ culture filtrate (จากการเตรียมในข้อ 3.3.1) ฉีดพ่นบนใบอ่อนพันธุ์ไวม์มะละกาในสภาพใบตัด (detached leaf) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เปรียบเทียบกับการใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบนใบอ่อน

3.4 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในรูปของ cell suspensions ในการยับยั้งโรคน้ำค้ำง สแคบ และราสนิมในอ่อน

นำ cell suspensions ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในแต่ละระยะการเจริญเติบโต ที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.3.2 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคในอ่อนพันธุ์ไวม์มะละกาในสภาพใบตัด โดยฉีดพ่นเชื้อปฏิภักย์ก่อนทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค 24 ชั่วโมง ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคโดยการหยดลงบนใบจำนวน 10 หยดต่อใบ ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อหยด วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ โดยการทดลองทำแยกกันอย่างอิสระในแต่ละระยะการเจริญเติบโตและแต่ละเชื้อ โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.4.1 การทดสอบเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง

1. เชื้อ *Bacillus* Isolate ที่ 1 กับ เชื้อ *P. viticola*
2. เชื้อ *Bacillus* Isolate ที่ 2 กับ เชื้อ *P. viticola*
3. เชื้อ *Bacillus* Isolate ที่ 3 กับ เชื้อ *P. viticola*
4. เชื้อ *Bacillus* Isolate ที่ 4 กับ เชื้อ *P. viticola*
5. เชื้อ *Bacillus* Isolate ที่ 5 กับ เชื้อ *P. viticola*
6. เชื้อ *B. subtilis*. กับ เชื้อ *P. viticola*
7. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ กับ เชื้อ *P. viticola* (control)

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-21 วัน ทำการนับจำนวนแผลที่เกิดขึ้นบนใบเมื่อวิธีการควบคุม (control) แสดงอาการของโรค วัดขนาดแผลเฉลี่ย และนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค

3.4.2 การทดสอบเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งโรคสแคบ (*S. ampelinum*) และโรคราสนิม (*Ph. ampelopsidis*) ใช้วิธีการและการเก็บข้อมูลเหมือนกับข้อ 3.4.1

3.4.3 การทดสอบเชื้อ *Streptomyces* spp ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง (*P. viticola*), โรคสแคบ (*S. ampelinum*) และโรคราสนิม (*Ph. ampelopsidis*) ใช้วิธีการและเก็บข้อมูลเหมือนกับข้อ 3.4.1 แต่ไม่ใช่ *B. subtilis* เป็นตัวเปรียบเทียบ

3.4.4 การหาระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น

นำส่วนของ cell suspensions ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. (ในแต่ละระยะการเจริญเติบโต) ที่มีศักยภาพดีที่สุดในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น มาปรับระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 10^5 , 10^7 , 10^9 และ 10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ฉีดพ่นบนใบองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาค่อนปลูกเชื้อราสาเหตุโรค เปรียบเทียบกับการใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-21 วัน ทำการนับจำนวนแผลที่เกิดขึ้นบนใบเมื่อวิธีการควบคุม (control) แสดงอาการของโรค วัดขนาดแผลเฉลี่ย และนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคต่อไป

3.5 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในรูปของ culture filtrate ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น

การวางแผนการทดลอง วิธีการและการเก็บข้อมูลเหมือนกับข้อ 3.4 ถึง 3.4.3 โดยใช้ culture filtrate (จากการเตรียมในข้อ 3.3.1) แทน cell suspensions

3.6 การทดสอบผลกระทบของการใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ร่วมกัน ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น

นำเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ไอโซเลตที่มีศักยภาพดีที่สุดในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในองุ่นแต่ละชนิดในการทดลองที่ 3.4 และ 3.5 ฉีดพ่นบนใบองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา พร้อมกันก่อนทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อ *Bacillus* spp. หรือ *Streptomyces* spp. อย่างเดียว วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-21 วัน ทำการนับจำนวนแผลที่เกิดขึ้น วัดขนาดแผล และนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่อใบ เมื่อวิธีการควบคุม (control) แสดงอาการของโรค

3.7 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายเชิงกึ่งปริมาณ

นำเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิม จากข้อ 3.4 และ 3.5 มาทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ได้แก่ chitinase, protease และ β -1, 3-1, 4-glucanase

3.7.1 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase

ทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ Water Agar ผสม 0.05% Lichenan (ภาคผนวก) เป็น medium โดยเจาะรูให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำส่วน culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* spp. หยดลงในหลุม จำนวน 20 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการเท 0.1% Congo red ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ 5 นาที ถ้ามีวงใสรอบ ๆ หลุมรูที่หยอด culture filtrate แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase ได้ให้ผลเป็นบวก ถ้าเป็นสีแดงทั้งหมดแสดงว่าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ให้ผลเป็นลบ ทำการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในเชื้อ *Streptomyces* spp. กระทำโดยนำเชื้อ *Streptomyces* spp. มาเลี้ยงบนอาหาร M9 medium agar ผสม 0.05% Lichenan (ภาคผนวก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบผลโดยใช้วิธีการเดียวกับที่ใช้กับเชื้อ *Bacillus* spp.

3.7.2 ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Protease

ทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ Water Agar ผสม 1% gelatin (ภาคผนวก) ที่ละลายใน 0.1M Phosphate buffer, pH 7.0 เป็น medium ในการทดสอบ โดยเจาะรูให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำส่วน culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* spp. หยดลงในหลุม จำนวน 40 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการวาดสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ((NH₄)₂SO₄) ที่อิ่มตัวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีวงใสรอบ ๆ หลุมวุ้นที่หยอด culture filtrate แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ protease ย่อยโปรตีนได้ให้ผลเป็นบวก ทำการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นมาเชื้อ

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในเชื้อ *Streptomyces* spp. กระทำโดยนำเชื้อ *Streptomyces* spp. มาเลี้ยงบนอาหาร M9 medium agar ผสม 1% gelatin (ภาคผนวก) ที่ละลายใน 0.1M Phosphate buffer, pH 7.0 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบผลโดยใช้วิธีการเดียวกับที่ใช้กับเชื้อ *Bacillus* spp.

3.7.3 ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase

ทดสอบในงานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ Water Agar ผสม 2.4% colloidal chitin (ภาคผนวก) pH 6.0 เป็น medium ในการทดสอบ โดยเจาะวุ้นให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมต่องานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำส่วน culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* spp. หยดลงในหลุม จำนวน 40 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบผลโดยการวาด 0.1% Congo red ให้ท่วมอาหารถ้ามีวงใสรอบหลุมวุ้นที่หยอด culture filtrate แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ออกมาย่อย chitin ได้ให้ผลเป็นบวก ถ้าเป็นสีแดงทั้งหมดแสดงว่าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ให้ผลเป็นลบ ทำการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นมาเชื้อ

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในเชื้อ *Streptomyces* spp. กระทำโดยนำเชื้อ *Streptomyces* spp. มาเลี้ยงบนอาหาร M9 medium agar ผสม 2.4% colloidal chitin (ภาคผนวก) pH 6.0 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบผลโดยใช้วิธีการเดียวกับที่ใช้กับเชื้อ *Bacillus* spp.

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองในข้อ 3.4-3.7.3 มาวิเคราะห์ข้อมูลของแต่ละกรรมวิธีโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows V.13.0 ตามแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกรรมวิธีทดลองโดยวิธีการของ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.9 การระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่ผ่านการคัดเลือก

3.9.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

นำเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคพืชทั้ง 3 ชนิด จากข้อ 3.4 มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังต่อไปนี้

3.9.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. มาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA และอาหาร OA ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *Bacillus* spp. และ 5-7 วัน สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. ศึกษาลักษณะโคโลนี สีโคโลนี รูปร่างและขนาดของเซลล์ การผลิตสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.9.1.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.9.1.2.1 การติดสีแกรม

การทดสอบการติดสีแกรม กระทำตั้งแต่ระยะการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น โดยนำเชื้อแต่ละไอโซเลตมาเกลี่ยเป็นผิวบาง (smear) บนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ปล่อยให้แห้ง จากนั้นตรึงด้วยความร้อนโดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หยด crystal violet บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง หยดสารละลาย Lugol's iodine ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที ล้างน้ำสะอาด หยด safranin บนรอยเกลี่ย ประมาณ 15-30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายของเลนส์วัตถุ 100 เท่า ถ้าเชื้อแบคทีเรียเป็นแกรมบวกจะติดสีม่วงของ crystal violet และแกรมลบจะติดสีแดงของ safranin

3.9.1.2.2 การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis test)

นำเชื้อแต่ละไอโซเลต อายุ 24-48 ชั่วโมง ปลูกเชื้อบนผิวหน้าอาหาร starch agar (ภาคผนวก) บ่มเชื้อ 24 ชั่วโมง ทดสอบการไฮโดรไลซ์แป้ง โดยเท Lugol's iodine ให้ท่วมผิวอาหาร ถ้ามีการไฮโดรไลซ์แป้งจะเกิดโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรีย เนื่องจากแป้งบริเวณนั้นถูกไฮโดรไลซ์หมดไป (แสดงผลบวก) ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถไฮโดรไลซ์แป้งจะเป็นสีน้ำเงินเช่นเดียวกับงานเปรียบเทียบ (ไม่ได้ปลูกเชื้อ)

3.9.1.2.3 การทดสอบแคตาเลส (Catalase Test)

เป็นการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการสลาย H_2O_2 โดยเอนไซม์แคตาเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบหายใจของแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนเป็นโมเลกุลรับอิเล็กตรอน ปฏิกิริยาของอิเล็กตรอนกับออกซิเจนจะทำให้เกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียจะมีเอนไซม์แคตาเลสไปทำลาย H_2O_2 ให้เป็นน้ำกับก๊าซออกซิเจน แบคทีเรียพวกนี้จึงเจริญในสภาพที่มีออกซิเจนได้ โดยไม่เป็นอันตราย การทดสอบกระทำโดยนำเชื้อแต่ละไอโซเลต ที่เลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง อายุ 18-24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ที่มี 3% H_2O_2 1 หยด ผสมให้เข้ากัน ถ้าเกิดฟองแก๊สแสดงผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดฟองแสดงผลเป็นลบ

3.9.1.2.4 การทดสอบการย่อยเคซีน (Casein Test)

นำเชื้อเลี้ยงบนอาหาร casein agar (ภาคผนวก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจสอบการย่อยสลายเคซีน ทุก 2-3 วัน โดยดูจากวงใสรอบๆ บริเวณที่เชื้อเจริญหรือตรงได้โคโลนี

3.9.1.2.5 การทดสอบการย่อยเจลาติน (Gelatin Liquefaction Test)

นำเชื้อเลี้ยงในอาหาร gelatin media (ภาคผนวก) ในลักษณะ stab บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบการย่อยเจลาตินทุกสัปดาห์ โดยนำหลอดเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง ถ้าแข็งตัวแสดงว่าเจลาตินยังไม่ถูกย่อยให้นำอาหารนั้นไปบ่มต่อ และทดสอบซ้ำในสัปดาห์ต่อไป ถ้าเจลาตินอยู่ในสภาพเหลวหลังจากนำเข้าสู่ตู้เย็นแสดงผลเป็นบวก

3.9.1.2.6 การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate Fermentation Test)

นำเชื้อ *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลตเลี้ยงในอาหาร carbohydrate fermentation broth (ภาคผนวก) ซึ่งใช้ Andrade's เป็น indicator (ภาคผนวก) ผสมสารละลายน้ำตาลที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน membrane ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ glucose xylose, maltose, lactose, fructose, sucrose และ manitol บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง ดูการเปลี่ยนสีของอาหาร และการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงผลบวกหากอาหารเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีแดง แต่ไม่มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้เฉพาะกรดหรืออาหารเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีแดงและมีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้กรดและแก๊ส แสดงผลลบหากอาหารไม่เปลี่ยนสีคือเป็นสีน้ำตาลเหมือนเดิม แสดงว่าเชื้อไม่สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตได้

3.9.1.2.7 การทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. บนอาหาร OA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน จากนั้นใช้ loop ตะสปอร์ของเชื้อมาขีดเป็นแนวตรง 2 แนว บนผิวหน้าอาหาร basal mineral salts medium (ภาคผนวก) ซึ่งเติมคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ D-glucose, fructose, manitol, inositol, sucrose, xylose ความเข้มข้นสุดท้าย 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน ตรวจสอบผลโดยใช้ D-glucose เป็น positive control และอาหาร basal mineral salts medium ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนเป็น negative control ถ้าการเจริญของเชื้อมากกว่า negative control ให้ผลเป็นบวก ถ้าเชื้อเจริญน้อยกว่าหรือเท่ากับ negative control ให้ผลเป็นลบ และถ้าเชื้อเจริญมากกว่า negative control เล็กน้อยให้ผลการทดลองเป็นบวก/ลบ

3.9.1.2.8 การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ ความร้อน และความ เป็นกรด – ต่าง

การทนเกลือ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอาหาร Nutrient Agar ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 2, 5, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลภายในเวลา 7 วัน

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหาร Waksman Agar (ภาคผนวก) ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 4, 7, 10 และ 13 เปอร์เซ็นต์ (w/v) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลภายใน 2 สัปดาห์

การทนความร้อน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอาหาร Nutrient Agar นำไปเลี้ยงในตูบ่มที่ระดับอุณหภูมิ 5, 10, 30, 40, 50, 55 และ 65 องศาเซลเซียส pH 7 ตรวจสอบผลภายใน 7 วัน

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหาร Waksman Agar นำไปเลี้ยงในตูบ่มที่ระดับอุณหภูมิ 4, 10, 37 และ 45 องศาเซลเซียส pH 7 ตรวจสอบผลภายใน 2 สัปดาห์

การทนความเป็นกรด ต่าง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอาหาร Nutrient Agar pH 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 และ 9 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลภายใน 2 สัปดาห์

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหาร Waksman Agar pH 4, 5, 7 และ 9 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลภายใน 2 สัปดาห์

3.9.1.3 การระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การยืนยันชนิดเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโรคของงู่น กระทำโดยใช้ primer ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับ 16S rDNA ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการเพิ่มปริมาณชิ้นของ DNA โดยวิธี PCR ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

3.9.1.3.1 การเตรียมเชื้อและดีเอ็นเอของเชื้อ *Bacillus* spp.

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคพืชทั้ง 3 ชนิด จากข้อ 3.4 ในอาหาร NB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย 1.5 มิลลิลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย TEN

buffer 500 ไมโครลิตร (ภาคผนวก) เติม 20% sucrose ใน TEN buffer 200 ไมโครลิตร, 10% SDS 100 ไมโครลิตร, lysozyme 20 ไมโครลิตร, RNase 32 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติม 5M NaCl 75 ไมโครลิตร และ 10% SDS 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเบา ๆ เติม phenol : chloroform : Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บน้ำใสส่วนบนใส่ลงใน microcentrifuge tube ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณหนึ่งเท่าตัว ผสมกับ 3M sodium acetate (ปริมาณ 1 : 10) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 400 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ผึ่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.9.1.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน of 16S rDNA ด้วยเทคนิค

Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณในส่วน of ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ บริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (B-K1/F, 5'-TCACCAAGGCACGATGCG-3') และ (B-K1/R1, 5'-CGTATTCACCGCGCATG-3') (Wu, Walker, Hornitzky and Chin, 2005) ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาดังนี้ genomic DNA 0.25 ไมโครลิตร, 5X PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTP 2 ไมโครลิตร, B-K1/F primer (20 pMol) 0.5 ไมโครลิตร, B-K1/R1 primer (20 pMol) 0.5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 1.5 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร ปรับปริมาณให้ได้ 25 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปเข้าเครื่อง Thermal cycle ที่สภาวะ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 25 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ใน 1X TBE ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 30 นาที และนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) โดยการส่งไปยัง MacroGen Service Center Advancing through Genomics ประเทศเกาหลี จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการศึกษาและเป็นฐานข้อมูลสาธารณะของ GenBank ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> ซึ่งทำให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* แต่ละไอโซเลตได้

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละไอโซเลตและจาก GenBank มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยโปรแกรม Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW จากทางเว็บไซต์ <http://align.genome.jp>

3.9.1.3.3 การเตรียมเชื้อและดีเอ็นเอของเชื้อ *Streptomyces* spp.

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคของงูทั้ง 3 ชนิด จากข้อ 3.3 ในอาหาร Yeast extract malt extract broth (YEMEB)(ภาคผนวก) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน คูดสารแขวนลอยแบคทีเรีย 1.5 มิลลิลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที ล้างตะกอนเซลล์ ด้วย TEN buffer 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติม TE buffer ที่มี lysozyme 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เติม 10% SDS 75 ไมโครลิตร และ 5M NaCl ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 6 นาที บ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที และในน้ำแข็ง นาน 10 นาที เติม RNase ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม phenol : chloroform : Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตรหนึ่งเท่า นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที ใต้น้ำใสส่วนบนใน microcentrifuge tube ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรหนึ่งเท่าตัว บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน นำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 400 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ฝั่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ใต้น้ำเย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.9.1.3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน of 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณในส่วน of ไรโบโซมดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ STR1F (5'-TCACGGAGAGTTTGATCCTG-3') และ STR1530R (5'-AAGGAGAT CCAGCCGCA-3') (เทพิน เดชนันทรรัตน์, 2546) ผสมส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาดังนี้ genomic DNA 0.25

ไมโครลิตร, 5X PCR buffer 4 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTP 1.6 ไมโครลิตร, STR1F primer (20 pMol) 0.5 ไมโครลิตร, STR1530R primer (20 pMol) 0.5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 1.2 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase 0.25 ไมโครลิตร ปรับปริมาณให้ได้ 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปเข้าเครื่อง Thermal cycle ที่สภาวะ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 31 รอบ และ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ใน 1X TBE ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 30 นาที และนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) โดยการส่งไปยัง MacroGen Service Center Advancing through Genomics ประเทศเกาหลี จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการศึกษา และเป็นฐานข้อมูลสาธารณะของ GenBank ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> ซึ่งทำให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อ *Streptomyces* แต่ละ ไอโซเลตได้ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละ ไอโซเลตและจาก GenBank มาวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยโปรแกรม Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW จากทางเว็บไซต์ <http://align.genome.jp>

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. จากดิน

4.1.1 การแยกเชื้อ *Bacillus* spp.

จากการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกองุ่น จำนวน 2 แหล่งคือ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา จากแปลงที่มีและไม่มีการแพร่ระบาดของโรค ทำการแยกเชื้อโดยวิธี streak plate method บนอาหาร Bacillus Medium พบเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมด 135 ไอโซเลต โดยจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แยกได้ 55 ไอโซเลต จากแปลงที่ไม่มีการแพร่ระบาดของโรค จำนวน 24 ไอโซเลต (code SN) และแปลงที่มีการแพร่ระบาดของโรค จำนวน 31 ไอโซเลต (code SD) จากพื้นที่ปลูกองุ่นที่อำเภอปากช่อง แยกได้ 80 ไอโซเลต จากแปลงที่ไม่มีการแพร่ระบาดของโรค จำนวน 53 ไอโซเลต (code PN) แปลงที่มีการแพร่ระบาดของโรค จำนวน 27 ไอโซเลต (code PD) (ตารางที่ 4.1)

4.1.2 การแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

จากตัวอย่างดินปลูกองุ่น จำนวน 4 แหล่ง คือ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี และสวนของเกษตรกรในอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (สวนคุณสมยศ และสวน Holiday) สามารถแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ได้ทั้งหมด 109 ไอโซเลต คือจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 37 ไอโซเลต โดย 19 ไอโซเลต ได้จากดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (code SR) และ 18 ไอโซเลต ได้จากดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส (code SH) จากสวนองุ่นอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี 20 ไอโซเลต โดย 19 ไอโซเลต ได้จากดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (code UR) และ 1 ไอโซเลต จากดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส (code UH) สวนคุณสมยศ อำเภอปากช่อง 21 ไอโซเลต ซึ่งทั้ง 21 ไอโซเลต ได้จากดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (code YR) และสวน Holiday อำเภอปากช่อง 31 ไอโซเลต โดย 27 ไอโซเลต ได้จากดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (code HR) และ 4 ไอโซเลต ได้จากดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส (code HH) เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ มีลักษณะและสีของโคโลนีแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มาและจำนวนไอโซเลตของเชื้อ *Bacillus* spp. (B) ที่แยกได้จากดินพื้นที่ปลูก
องุ่น

แหล่งที่มา	ลักษณะแปลงปลูก	จำนวน	ไอโซเลต
ฟาร์ม มทส.(S)	แปลงที่ไม่มีมีการแพร่ ระบาดของโรค (N)	24	101, 102, 103, 104
			201, 202, 203, 204 301, 302, 303 401, 402, 403, 404, 405, 406 502, 504 601, 602, 603, 604, 605
	แปลงที่มีการแพร่ ระบาดของโรค (D)	31	101, 102, 103, 104
			201, 202, 203, 204 301, 302, 303, 304, 305, 306 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408 501, 502, 503, 504, 505 601, 602, 603, 604
รวม		55	
อ. ปากช่อง (P)	แปลงที่ไม่มีมีการแพร่ ระบาดของโรค (N)	53	101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 201, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 213, 214 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407
			แปลงที่มีการแพร่ ระบาดของโรค (D)
รวม		80	
รวมทั้งหมด		135	

ตารางที่ 4.2 แหล่งที่มาและจำนวนไอโซเลตของเชื้อ *Streptomyces* spp. (S) ที่แยกได้จากพื้นที่ปลูก
อู่จุ่น

แหล่งที่มา	อุณหภูมิที่ใช้บดดิน ก่อนแยกเชื้อ	จำนวน	ไอโซเลต
ฟาร์ม มทส. (S)	ห้อง (27-30 ⁰ C) (R)	19	101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 114, 116, 117 201, 202, 203, 204, 205
	120 ⁰ C (H)	18	101, 102 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216
รวม		37	
อ. เมือง จ. อุบลราชธานี (U)	ห้อง (27-30 ⁰ C) (R)	19	101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113 201, 202, 203, 204, 205, 206
	120 ⁰ C (H)	1	201
รวม		20	
สวนคุณสมยศ อ. ปากช่อง (Y)	ห้อง (27-30 ⁰ C) (R)		101, 102, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 210, 211, 212
	120 ⁰ C (H)		-
รวม		21	
สวน Holiday อ. ปากช่อง (H)	ห้อง (27-30 ⁰ C) (R)	27	102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217
	120 ⁰ C (H)	4	201, 202, 203, 204
รวม		31	
รวมทั้งหมด		109	

4.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*)

4.2.1 เชื้อ *Bacillus* spp.

จากการนำเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้จากดินแปลงปลูกองุ่น มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อที่ไม่เป็น obligate parasite ใน class เดียวกันกับเชื้อราสาเหตุโรคน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น ที่ต้องการศึกษาการควบคุม ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีจากแปลงที่ไม่มีการแพร่ระบาดของโรค จำนวน 19 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ 47.77-69.44 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งเชื้อ *C. ampelinum* ได้ 53.05-73.33 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 ไอโซเลต และจำนวน 13 ไอโซเลต ยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ 53.61-69.72 เปอร์เซ็นต์ โดยพบ 6 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ทั้ง 3 ชนิด 8 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ 2 ชนิด และ 8 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเพียง 1 ชนิด (ตารางที่ 4.3)

จากแปลงที่มีการแพร่ระบาดของโรค พบ 17 ไอโซเลต ที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ โดย 10 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aphanidermatum* ได้ 51.60-66.11 เปอร์เซ็นต์ 15 ไอโซเลตยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. ampelinum* ได้ 50.83-84.44 เปอร์เซ็นต์ และ 16 ไอโซเลต ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ 50.72-84.75 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนนี้มี 8 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 ชนิดได้ 8 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 2 ชนิด และมีเพียง 1 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ 1 ชนิด (ตารางที่ 4.3)

สำหรับเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา จากแปลงที่ไม่มีการแพร่ระบาดของโรค พบ 17 ไอโซเลต ที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ โดยมี 3 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aphanidermatum* ได้ 51.00-54.32 เปอร์เซ็นต์ 15 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. ampelinum* ได้ 50.00-57.00 เปอร์เซ็นต์ และ 2 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ 50.00-51.00 เปอร์เซ็นต์ มี 3 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 2 ชนิด และ 14 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ 1 ชนิด โดยไม่พบไอโซเลตใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 4.4)

จากแปลงที่มีการแพร่ระบาดของโรค พบ 5 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ โดยมี 4 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. ampelinum* ได้ 49.50-56.00 เปอร์เซ็นต์ และพบ 1 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfisii* ได้ 52.45 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่พบไอโซเลตใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aphanidermatum* ได้ โดย 5 ไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้เพียง 1 ชนิด เท่านั้น (ตารางที่ 4.4)

เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 61 ไอโซเลตจาก 135 ไอโซเลตที่มีความสามารถสูงในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 ชนิด มาจัดอันดับพบว่า 5 อันดับแรกของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aphanidermatum* ได้แก่ ไอโซเลต BSN502, BSD604, BSN501, BSD502 และ BSD603 สำหรับเชื้อ *C. ampelinum* ได้แก่ ไอโซเลต BSD101, BSN603, BSN501, BSD604 และ BSD406 และสำหรับเชื้อ *S. rolfisii* ได้แก่ ไอโซเลต BSD203, BSD405, BSN304, BSN201 และ BSN301 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชของเชื้อ *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลตแสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.1-4.3

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Bacillus* spp. (B) ที่แยกได้จากฟาร์ม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จากแปลงอุนที่ไม่มีอาการแพร่ระบาดของโรค (SN) และมีการแพร่ระบาดของโรค (SD)

ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ		
	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>C. ampelinum</i>	<i>S. rolfsii</i>
BSN104	50.49	55.27	53.61
BSN201	50.00	53.05	67.22
BSN202	54.44	53.05	64.72
BSN203	54.44	-	-
BSN204	47.77	54.16	55.00
BSN301	50.75	54.44	66.38
BSN302	56.11	53.61	-
BSN303	50.00	-	-
BSN304	55.00	-	69.72
BSN305	-	-	55.83
BSN306	50.00	-	57.22
BSN401	54.00	-	62.50
BSN402	-	55.55	61.11
BSN403	-	54.44	65.00
BSN407	53.05	-	-
BSN408	51.66	-	-
BSN501	65.83	72.20	57.50
BSN502	69.44	-	65.83
BSN503	52.70	-	-
BSN602	54.70	-	-
BSN603	55.27	73.33	-
BSN604	50.00	-	-
BSD101	-	84.44	55.60
BSD102	51.60	50.83	50.72
BSD103	-	-	54.72
BSD104	-	53.88	60.55
BSD203	-	51.66	84.75
BSD204	54.72	-	50.72
BSD301	55.00	58.88	51.38
BSD303	-	53.61	52.77
BSD402	53.22	56.38	55.49
BSD404	-	53.05	56.05
BSD405	54.72	52.50	84.16
BSD406	51.66	66.11	-
BSD502	56.11	72.22	58.33
BSD601	-	57.77	50.79
BSD603	55.45	51.38	52.75
BSD604	66.11	66.66	55.27
BSD605	53.44	60.00	56.11

-- ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ทดสอบได้

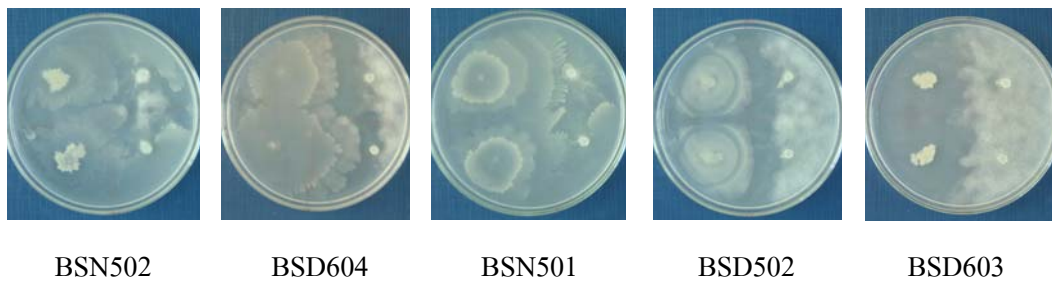
ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Bacillus* spp. (B) ที่แยกได้จาก อัมถอปากช่อง จากแปลงงุ่นที่ไม่มีการแพร่ระบาดของโรค (PN) และมีการแพร่ระบาดของโรค (PD)

ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ		
	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>C. ampelinum</i>	<i>S. rolfsii</i>
BPN201	-	55.77	-
BPN202	-	55.98	-
BPN203	-	51.00	-
BPN205	-	53.00	-
BPN206	-	54.56	-
BPN207	-	54.75	-
BPN208	53.65	56.75	-
BPN209	-	57.00	-
BPN210	-	53.45	-
BPN211	-	54.75	-
BPN213	54.32	53.00	-
BPN214	-	55.00	-
BPN302	-	-	50.00
BPN303	51.00	-	-
BPN402	-	50.83	-
BPN403	-	50.00	51.00
BPN405	-	51.55	-
BPD101	-	56.00	-
BPD102	-	52.45	-
BPD104	-	-	52.45
BPD203	-	51.66	-
BPD505	-	49.50	-

-- ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ทดสอบได้

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*,
Colletotrichum ampelinum และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลตที่มี
 ประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรก

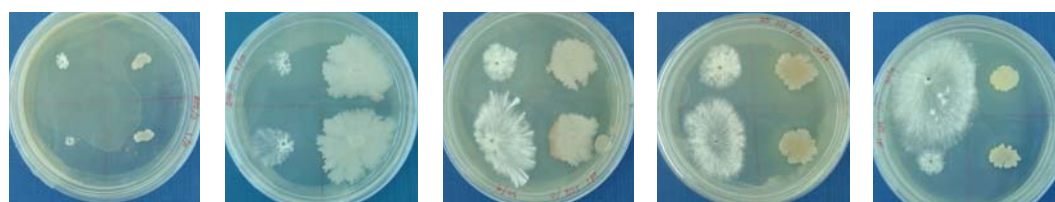
<i>P. aphanidermatum</i>		<i>C. ampelinum</i>		<i>S. rolfsii</i>	
Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)
BSN502	69.44	BSD101	84.44	BSD203	84.75
BSD604	66.11	BSN603	73.33	BSD405	84.16
BSN501	65.83	BSD502	72.22	BSN304	69.72
BSD502	56.11	BSD604	66.66	BSN201	67.22
BSD603	55.45	BSD406	66.11	BSN301	66.38



รูปที่ 4.1 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ
Pythium aphanidermatum



รูปที่ 4.2 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ
Colletotrichum ampelinum



BSD203

BSD405

BSN304

BSN201

BSN301

รูปที่ 4.3 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

4.2.2 เชื้อ *Streptomyces* spp.

เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มี 29 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ โดย 5 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aphanidermatum* ได้ 12.00-28.00 เปอร์เซ็นต์ 27 ไอโซเลต ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. ampelinum* ได้ 39.44-61.66 เปอร์เซ็นต์ และมี 17 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ 5.00-43.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.6)

เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากแปลงอุ่นที่อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี มี 8 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยมี 2 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ 17.00-28.00 เปอร์เซ็นต์ มี 6 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. ampelinum* ได้ 44.44-54.44 เปอร์เซ็นต์ และ 6 ไอโซเลต ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ 5.50-17.20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมี 2 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทั้ง 3 ชนิด พบ 2 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 2 ชนิด และมี 4 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 1 ชนิด (ตารางที่ 4.7)

ในขณะที่เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากแปลงอุ่นของคุณสมยศ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา พบ 9 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ โดยมี 6 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ 8.00-46.00 เปอร์เซ็นต์ มี 7 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. ampelinum* ได้ 47.22-61.11 เปอร์เซ็นต์ และ 3 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ 11.00-50.00 เปอร์เซ็นต์ โดยมี 3 ไอโซเลต ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 ชนิด มี 1 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 2 ชนิด และมี 5 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 1 ชนิด (ตารางที่ 4.8)

เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากแปลงอุ่นสวน Holiday อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา มี 27 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ โดยมี 13

ไอโซเลต ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้ 12.00-42.00 เปอร์เซ็นต์ 25 ไอโซเลต ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. ampelinum* ได้ 37.77-63.88 เปอร์เซ็นต์ และ 12 ไอโซเลต ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ 5.00-17.00 เปอร์เซ็นต์ โดยมี 6 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 ชนิด พบ 11 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 2 ชนิด และพบ 10 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 1 ชนิด (ตารางที่ 4.9)

เมื่อนำ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 73 ไอโซเลต มาจัดอันดับพบว่า 5 อันดับแรกของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aphanidermatum* ได้แก่ ไอโซเลต SYR107, SHR103, SYR205, SHH202 และ SSR107 ในขณะที่เชื้อ *C. ampelinum* ได้แก่ ไอโซเลต SHH202, SSR203, SYR107, SHR106 และ SSH213 และเชื้อ *S. rolfsii* ได้แก่ ไอโซเลต SYR205, SSH209, SSH216, SSH213 และ SSH211 เปอร์เซ็นต์และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละไอโซเลตแสดงในตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.4-4.6 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. (S) ที่แยกได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี(S)

ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ		
	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>C. ampelinum</i>	<i>S. rolfsii</i>
SSR104	12.00	-	13.88
SSR107	28.00	52.22	9.40
SSR108	-	44.44	6.00
SSR109	-	44.44	5.50
SSR110	-	43.88	8.33
SSR111	-	45.00	9.44
SSR112	23.00	55.55	8.33
SSR114	-	47.22	-
SSR116	-	-	11.11
SSR117	-	53.33	6.66
SSR201	-	46.11	-
SSR202	-	43.88	-
SSR203	-	61.66	-
SSR204	-	53.33	-
SSH101	-	45.55	5.00
SSH102	-	54.44	8.33
SSH202	-	51.11	-
SSH203	-	46.11	-
SSH204	-	46.11	-
SSH205	-	39.44	-
SSH206	-	46.66	-
SSH207	17.00	52.77	-
SSH208	-	46.66	6.66
SSH209	-	52.77	43.33
SSH211	-	50.00	19.44
SSH213	-	58.33	22.22
SSH214	19.00	55.55	-
SSH215	-	46.11	8.33
SSH216	-	50.55	41.66

R = ดินทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง, H = ดินทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส, - = ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ทดสอบได้

ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. (S) ที่แยกได้จากอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี (U)

ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ		
	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>C. ampelinum</i>	<i>S. rolfsii</i>
SUR103	-	51.66	12.00
SUR105	-	50.00	-
SUR109	17.00	52.22	5.50
SUR110	-	44.44	-
SUR111	28.00	53.33	17.20
SUR112	-	-	6.66
SUR205	-	-	13.80
SUR206	-	54.44	8.33

R = ดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง, - = ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ทดสอบได้

ตารางที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. (S) ที่แยกได้จากสวนคุณสมยศ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (Y)

ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ		
	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>C. ampelinum</i>	<i>S. rolfsii</i>
SYR101	13.00	-	-
SYR107	46.00	61.11	12.00
SYR110	22.00	51.11	11.00
SYR205	40.00	58.33	50.00
SYR206	10.00	-	-
SYR207	-	47.22	-
SYR208	-	54.44	-
SYR210	8.00	52.77	-
SYR212	-	52.77	-

R = ดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง, - = ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ทดสอบได้

ตารางที่ 4.9 เเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. (S) ที่แยกได้จากสวน Holiday (H) อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (H)

ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ		
	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>C. ampelinum</i>	<i>S. rolfsii</i>
SHR102	-	47.77	-
SHR103	42.00	46.66	10.50
SHR104	-	50.00	-
SHR105	16.00	55.55	-
SHR106	19.00	58.88	-
SHR107	-	54.44	-
SHR108	18.00	55.55	-
SHR109	-	44.44	8.33
SHR202	-	57.22	-
SHR203	19.00	-	-
SHR204	15.00	52.22	-
SHR205	-	51.11	11.00
SHR206	-	50.00	11.00
SHR207	13.00	53.33	5.00
SHR208	-	52.77	-
SHR209	15.00	52.77	5.50
SHR210	-	-	16.00
SHR211	-	50.55	17.00
SHR212	-	50.00	5.50
SHR213	28.00	55.55	15.00
SHR214	18.00	54.44	-
SHR215	17.00	52.77	9.00
SHR216	-	52.77	-
SHR217	-	51.11	-
SHH201	-	37.77	-
SHH202	38.00	63.88	15.00
SHH203	12.00	40.00	-

R = ดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง, H = ดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส, - = ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ทดสอบได้

ตารางที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อ *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. (S) ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรก

<i>P. aphanidermatum</i>		<i>C. ampelinum</i>		<i>S. rolfsii</i>	
Isolate ^{1/}	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)
SYR 107	46.00	SHH 202	63.88	SYR 205	50.00
SHR 103	42.00	SSR 203	61.66	SSH 209	43.33
SYR 205	40.00	SYR 107	61.11	SSH 216	41.66
SHH 202	38.00	SHR 106	58.88	SSH 213	22.22
SSR 107	28.00	SSH 213	58.33	SSH 211	19.44

^{1/}แหล่งที่มาของดินที่ทำการแยกเชื้อ S = ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, U = จังหวัดอุบลราชธานี, Y = สวนกุหลาบสมยศ, H = สวน Holiday



SYR107

SHR103

SYR205

SHH202

SSR107

รูปที่ 4.4 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium aphanidermatum*



SHH202

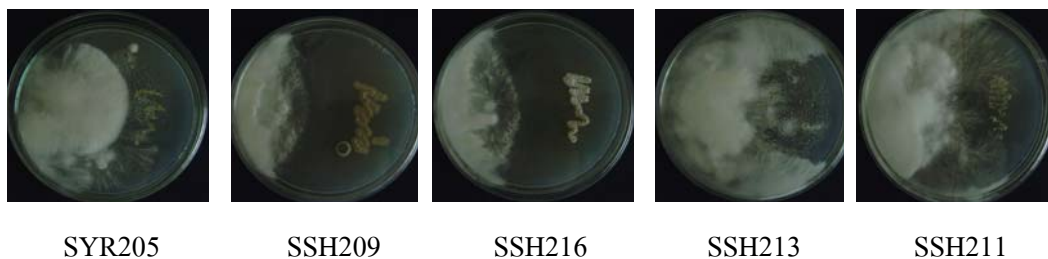
SSR203

SYR107

SHR106

SSR213

รูปที่ 4.5 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum ampelinum*



รูปที่ 4.6 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

4.3 การทดสอบผลกระทบของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ต่อใบองุ่น

เมื่อนำ cell suspensions ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่ระดับความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ฉีดพ่นบนใบองุ่น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน พบว่าใบองุ่นมีสภาพปกติ แสดงว่า cell suspensions ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ไม่มีผลกระทบต่อใบองุ่น แต่เมื่อนำส่วนของ culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. มาทดสอบในลักษณะเดียวกันกับการใช้ cell suspensions พบว่า culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* spp. มีผลกระทบต่อใบองุ่น โดยทำให้ใบเกิดเป็นแผลสีน้ำตาลขนาดใหญ่เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 1-2 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.7 หลังจากปรับลดระดับความเข้มข้นของอาหาร NB เป็น 1/2, 1/3 และ 1/4 เท่าของสูตรปกติ ก่อนนำมาเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. พบว่าที่ความเข้มข้นอาหาร 1/4 เท่า ไม่มีผลกระทบต่อใบองุ่น สำหรับ culture filtrate ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไม่มีผลกระทบต่อใบองุ่น



รูปที่ 4.7 ลักษณะของใบองุ่นภายหลังการฉีดพ่นด้วย culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* spp.

- ก. Culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เลี้ยงใน nutrient broth ความเข้มข้นปกติ
 ข. Culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เลี้ยงใน nutrient broth เจือจาง ¼ เท่า

4.4 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในรูปของ cell suspensions ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น

การทดสอบความสามารถของ cell suspensions ของเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSD502, BSD603, BSD604, BSN501, BSN502 และ *B. subtilis* ในระยะ log phase ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง พบว่าจำนวนการเกิดแผลและขนาดของแผลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) แต่มีแนวโน้มว่าไอโซเลต BSN502 และ *B. subtilis* ทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด ในขณะที่ไอโซเลต BSD603 และ BSD604 มีผลทำให้แผลมีขนาดเล็กที่สุด ขณะที่ทุกกรรมวิธีมีผลทำให้เชื้อสร้างจำนวนสปอร์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยไอโซเลต BSN502 ทำให้เชื้อราน้ำค้างสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.11)

สำหรับในระยะ stationary phase ไอโซเลต BSD502, BSD603, BSD604, BSN501, BSN502 และ *B. subtilis* ไม่มีผลทำให้จำนวนของแผล และขนาดแผลมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม แต่ทุกกรรมวิธีมีผลทำให้เชื้อสร้างสปอร์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยไอโซเลต BSD603 มีผลทำให้เชื้อราน้ำค้างสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.11)

การทดสอบความสามารถของ cell suspensions ของเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSD101, BSD406, BSD502, BSD604, BSN603 และ *B. subtilis* ในระยะ log phase ในการยับยั้งโรคสแคบ พบว่าเชื้อที่ทดสอบสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกัน โดยพบว่าการเกิดแผล และขนาดของแผลมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต BSD502 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด และขนาดแผลเล็กที่สุด (ตารางที่ 4.12)

สำหรับในระยะ stationary phase พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งโรคสแคบได้แตกต่างกัน ทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต BSN603 มีผลทำให้แผลจำนวนน้อยที่สุดและขนาดแผลเล็กที่สุด (ตารางที่ 4.12)

การทดสอบความสามารถของ cell suspensions ของเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSD203, BSD405, BSN201, BSN301, BSN304 และ *B. subtilis* ในระยะ log phase ในการยับยั้งโรคราสนิม พบว่าเชื้อที่ทดสอบสามารถยับยั้งการเกิดโรค และการสร้างสปอร์ของเชื้อได้ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) แต่มีแนวโน้มว่าไอโซเลต BSN301 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด และขนาดแผลเล็กที่สุด ในขณะที่ไอโซเลต BSN201 ทำให้เชื้อราสนิมสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.13)

สำหรับในระยะ stationary phase พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเกิดโรคราสนิมได้แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต BSN301 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด แผลมีขนาดเล็กที่สุด และทำให้เชื้อราสนิมสร้างสปอร์ได้น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 4.11 ผลของ *Bacillus* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกันในรูปแบบ cell suspensions ต่อการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่น ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	การเกิดโรคราน้ำค้าง		
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)	จำนวนสปอร์ ($\times 10^3$ spore/ใบ)
Cell suspensions from log phase			
BSD502	9.50	0.36	257.25 bc ^{1/}
BSD603	9.75	0.34	135.75 a
BSD604	10.00	0.34	158.75 ab
BSN501	9.50	0.38	242.50 abc
BSN502	9.25	0.42	135.50 a
<i>B. subtilis</i>	9.25	0.42	307.00 c
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00	0.47	334.50 c
F - test	NS	NS	**
CV (%)	10.22	19.73	32.57
Cell suspensions from stationary phase			
BSD502	10.00	0.41	135.00 bc
BSD603	9.00	0.35	58.50 a
BSD604	9.25	0.42	113.00 abc
BSN501	8.50	0.36	89.00 ab
BSN502	9.75	0.38	84.00 ab
<i>B. subtilis</i>	7.75	0.36	92.75 ab
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00	0.43	171.50 c
F - test	NS	NS	**
CV (%)	17.29	16.15	35.97

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.01$ โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.12 ผลของ *Bacillus* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป cell suspensions ต่อการเกิดโรคสแคบในกุ้ง ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	การเกิดโรคสแคบ	
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)
Cell suspensions from log phase		
BSD101	8.75 abc ^{1/}	0.29 bc
BSD406	5.00 ab	0.22 ab
BSD502	4.50 a	0.14 a
BSD604	9.50 bc	0.29 bc
BSN603	9.25 bc	0.29 bc
<i>B. subtilis</i>	9.25 bc	0.31 bc
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 c	0.37 c
F - test	*	*
CV (%)	36.87	32.79
Cell suspensions from stationary phase		
BSD101	6.75 ab	0.25
BSD406	5.25 ab	0.25
BSD502	5.75 ab	0.34
BSD604	6.50 ab	0.28
BSN603	4.00 a	0.15
<i>B. subtilis</i>	4.75 ab	0.22
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 b	0.36
F - test	*	NS
CV (%)	57.93	56.50

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.13 ผลของ *Bacillus* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป cell suspensions ต่อการเกิดโรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	การเกิดโรคราสนิม		
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)	จำนวนสปอร์ (x10 ³ spore/ใบ)
Cell suspensions from log phase			
BSD203	8.25	0.43	140.00
BSD405	9.50	0.50	161.00
BSN201	9.00	0.50	103.50
BSN301	7.50	0.37	188.25
BSN304	9.75	0.50	116.00
<i>B. subtilis</i>	9.25	0.50	152.75
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00	0.50	234.00
F - test	NS	NS	NS
CV (%)	24.42	21.21	69.31
Cell suspensions from stationary phase			
BSD203	8.75 b ^{1/}	0.41 bc	44.25 ab
BSD405	10.00 b	0.50 c	75.50 ab
BSN201	9.00 b	0.30 b	63.75 ab
BSN301	2.00 a	0.11 a	15.75 a
BSN304	9.25 b	0.47 c	88.75 abc
<i>B. subtilis</i>	8.25 b	0.48 c	115.75 bc
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 b	0.50 c	170.00 c
F - test	**	**	*
CV (%)	20.36	17.74	70.77

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ (*) และ $P \leq 0.01$ (**) โดยวิธี DMRT.

ผลของ cell suspensions ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSR107, SHH202, SHR103, SYR205 และ SYR107 ในระยะ log phase ในการยับยั้งโรคราน้ำค้างในสภาพใบตัด พบว่าเชื้อสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต SHH202 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด นอกจากนี้ทุกไอโซเลตมีผลทำให้แผลมีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยไอโซเลต SHR103 มีผลทำให้แผลขนาดเล็กที่สุด และพบว่าทุกกรรมวิธีมีการสร้างสปอร์ของเชื้อแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยไอโซเลต SHH202 ทำให้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.14)

ส่วนในระยะ stationary phase พบว่าทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้างได้แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยไอโซเลต SHR103 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด ขนาดแผลเล็กที่สุด และทำให้เชื้อราน้ำค้างสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.14)

ผลของ cell suspensions ของเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SSR203, SSH213, SYR107, SHH202 และ SHR106 ในระยะ log phase ในการยับยั้งโรคสแคบ ในสภาพใบตัด พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต SHH202 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด และแผลมีขนาดเล็กที่สุด (ตารางที่ 4.15)

สำหรับในระยะ stationary phase พบว่าทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต SHH202 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด และมีขนาดแผลเล็กที่สุด (ตารางที่ 4.15)

การทดสอบความสามารถของ cell suspensions ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSH209, SSH211, SSH213, SSH216 และ SYR205 ในระยะ log phase ในการยับยั้งโรคราสนิม พบว่าเชื้อสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต SSH216 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด ขณะที่ไอโซเลต SSH209 มีผลทำให้แผลมีขนาดเล็กที่สุด และไอโซเลต SSH216 มีผลทำให้เชื้อราสนิมสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.16)

สำหรับในระยะ stationary phase พบว่าทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต SSH211 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด ขณะที่ไอโซเลต SSH213 มีผลทำให้แผลมีขนาดเล็กที่สุด และไอโซเลต SSH211 ทำให้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.16)

ตารางที่ 4.14 ผลของ *Streptomyces* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป cell suspensions ต่อการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่นในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	การเกิดโรคราน้ำค้าง		
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)	จำนวนสปอร์ ($\times 10^3$ spore/ใบ)
Cell suspensions from log phase			
SSR107	7.00 bc ^{1/}	0.19 ab	25.87 a
SHH202	2.75 a	0.14 a	10.62 a
SHR103	4.62 ab	0.12 a	22.75 a
SYR205	8.37 cd	0.29 bc	41.00 ab
SYR107	6.50 bc	0.24 abc	52.37 ab
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 d	0.33 c	81.37 b
F - test	**	**	*
CV (%)	38.27	54.20	78.17
Cell suspensions from stationary phase			
SSR107	7.25 b	0.24	39.87 a
SHH202	7.25 b	0.19	31.75 a
SHR103	3.75 a	0.19	21.37 a
SYR205	7.37 b	0.30	52.25 a
SYR107	8.62 b	0.24	59.37 ab
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 b	0.31	112.87 b
F - test	*	NS	*
CV (%)	40.56	42.80	105.85

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ (*) และ $P \leq 0.01$ (**) โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.15 ผลของ *Streptomyces* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป cell suspensions ต่อการเกิดโรคสแคบในองุ่น ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	การเกิดโรคสแคบ	
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)
Cell suspensions from log phase		
SSR203	8.25 bc ^{1/}	0.17 b
SSH213	8.00 bc	0.16 b
SYR107	6.25 b	0.18 b
SHH202	1.50 a	0.05 a
SHR106	5.75 b	0.18 b
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 c	0.22 b
F - test	**	**
CV (%)	26.92	33.81
Cell suspensions from stationary phase		
SSR203	7.50 b	0.18 b
SSH213	7.25 b	0.20 b
SYR107	5.50 b	0.15 b
SHH202	0.00 a	0.00 a
SHR106	6.75 b	0.18 b
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 c	0.20 b
F - test	**	**
CV (%)	26.89	29.50

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.01$ โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.16 ผลของ *Streptomyces* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป cell suspensions ต่อการเกิดโรคราสนิมในองุ่นในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	การเกิดโรคราสนิม		
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)	จำนวนสปอร์ (x10 ³ spore/ใบ)
Cell suspensions from log phase			
SSH209	7.50 ab ^{1/}	0.22 a	56.00 ab
SSH211	6.00 a	0.25 a	39.00 ab
SSH213	10.00 b	0.32 b	115.25 b
SSH216	5.25 a	0.24 a	27.50 a
SYR205	10.00 b	0.38 b	203.00 c
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 b	0.38 b	224.75 c
F - test	**	**	**
CV (%)	27.78	14.99	44.95
Cell suspensions from stationary phase			
SSH209	10.00 b	0.32 bc	144.25 a
SSH211	4.75 a	0.20 a	44.75 a
SSH213	9.25 b	0.19 a	61.50 a
SSH216	10.00 b	0.31 bc	150.00 a
SYR205	9.75 b	0.26 ab	151.00 a
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 b	0.40 c	320.00 b
F - test	**	**	**
CV (%)	12.41	22.58	52.35

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น P ≤ 0.01 โดยวิธี DMRT.

4.5 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.

ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น

4.5.1 ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Bacillus* spp.

เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSD502 ที่ระยะ log phase ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 , 10^7 , 10^9 และ 10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคสแคบในองุ่น พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด โดยมีการเกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด และขนาดของแผลเล็กที่สุด รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.17)

จากการนำเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSN603 ที่ระยะ stationary phase ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 , 10^7 , 10^9 และ 10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคสแคบในองุ่น พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด โดยมีการเกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีขนาดของแผลเล็กที่สุด รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.17)

เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSN301 ที่ระยะ stationary phase ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 , 10^7 , 10^9 และ 10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคราสนิมในองุ่น พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด โดยมีการเกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด ขนาดของแผลเล็กที่สุด และพบการสร้างสปอร์ของเชื้อน้อยที่สุด รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.18)

ตารางที่ 4.17 ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Bacillus* และรูปแบบที่มีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรคสแคบในอรุ่น ในสภาพใบตัด

ไอโซเลต/ระดับความเข้มข้น (เซลล์/มิลลิลิตร)	การเกิดโรคสแคบ	
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)
BSD502 (CL) ^{1/}		
10 ⁵	10.00 b ^{3/}	0.23 b
10 ⁷	8.25 ab	0.21 ab
10 ⁹	5.50 a	0.10 a
10 ¹¹	6.75 ab	0.16 ab
Control	10.00 b	0.27 b
F - test	*	*
CV (%)	27.88	35.50
BSN603 (CS) ^{2/}		
10 ⁵	10.00 b	0.30
10 ⁷	9.75 b	0.28
10 ⁹	5.50 a	0.19
10 ¹¹	5.00 a	0.22
Control	10.00 b	0.33
F - test	*	NS
CV (%)	31.71	37.39

^{1/} Cell suspensions from log phase, ^{2/} Cell suspensions from stationary phase

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.18 ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSN301 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด

ระดับความเข้มข้น (เซลล์/ มิลลิลิตร)	การเกิดโรคราสนิม		
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)	จำนวนสปอร์ (x10 ³ spore/ใบ)
10 ⁵	10.00 c ^{1/}	0.18 a	32.00 a
10 ⁷	5.75 b	0.21 a	28.25 a
10 ⁹	1.50 a	0.09 a	14.50 a
10 ¹¹	3.75 b	0.13 a	25.50 a
Control	10.00 c	0.32 b	62.75 b
F - test	**	*	**
CV (%)	23.74	44.17	45.93

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น P ≤ 0.05 (*) และ P ≤ 0.01 (**) โดยวิธี DMRT.

4.5.2 ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Streptomyces* spp.

เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SHH202 ในระยะ log phase มาทดสอบหา ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งการเกิดโรคสแคบ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10¹¹ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด โดยพบการเกิดแผลน้อยที่สุด และขนาดของแผลเล็กที่สุด รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 10⁹ และ 10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.19)

ส่วนในระยะ stationary phase พบว่าทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเกิดโรคสแคบได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (ตารางที่ 4.19)

จากการนำเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SSH216 ในระยะ log phase และ SSH211 ในระยะ stationary phase มาทดสอบหา ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งการเกิดโรคราสนิม พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีความสามารถยับยั้งการเกิดโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าที่ความเข้มข้น 10⁹ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดแผลน้อยที่สุด ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 10¹¹ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีขนาดแผลเล็กที่สุด และทำให้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.20)

ตารางที่ 4.19 ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Streptomyces* และรูปแบบที่มีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรคสแคบในอรุุ่น ในสภาพใบตัด

ไอโซเลต/ระดับความเข้มข้น (เซลล์/มิลลิลิตร)	การเกิดโรคสแคบ	
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)
SHH202 (CL) ^{1/}		
10 ⁵	10.00 a ^{3/}	0.18 bc
10 ⁷	2.75 a	0.10 ab
10 ⁹	2.00 a	0.03 a
10 ¹¹	0.75 a	0.02 a
Control	10.00 b	0.21 c
F - test	**	**
CV (%)	38.39	48.47
SHH202 (CS) ^{2/}		
10 ⁵	0.00 a	0.00 a
10 ⁷	0.00 a	0.00 a
10 ⁹	0.00 a	0.00 a
10 ¹¹	0.00 a	0.00 a
Control	10.00 b	0.21 b
F - test	**	**
CV (%)	25.83	58.15

^{1/} Cell suspensions from log phase, ^{2/} Cell suspensions from stationary phase

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.01$ โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.20 ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Streptomyces* และรูปแบบที่มีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด

ไอโซเลต/ระดับความเข้มข้น (เซลล์/มิลลิลิตร)	การเกิดโรคราสนิม		
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)	จำนวนสปอร์ (x10 ³ spore/ใบ)
SSH216 (CL) ^{1/}			
10 ⁵	10.00	0.32 a ^{3/}	166.00 a
10 ⁷	10.00	0.36 a	133.25 a
10 ⁹	9.00	0.31 a	116.50 a
10 ¹¹	9.25	0.30 a	68.00 a
Control	10.00	0.48 b	336.25 b
F - test	NS	**	**
CV (%)	4.86	15.47	45.12
SSH211(CS) ^{2/}			
10 ⁵	10.00	0.38 bc	222.50 b
10 ⁷	7.75	0.27 ab	82.00 a
10 ⁹	6.00	0.25 a	93.75 a
10 ¹¹	7.50	0.20 a	97.00 a
Control	10.00	0.44 c	277.00 b
F - test	NS	**	**
CV (%)	21.72	22.77	35.15

^{1/} Cell suspensions from log phase, ^{2/} Cell suspensions from stationary phase

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น P ≤ 0.01 โดยวิธี DMRT.

4.6 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในรูปของ culture filtrate ในการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบและราสนิมในองุ่น

การทดสอบความสามารถของ culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSD502, BSD603, BSD604, BSN501, BSN502, *B. subtilis* และ nutrient broth ในระยะ log phase ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคและการสร้างสปอร์ของเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต BSD603 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.21)

สำหรับในระยะ stationary phase พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยไอโซเลต BSD502, BSD603 และ BSN502 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด สำหรับขนาดของแผลพบว่าทุกกรรมวิธีมีขนาดของแผลแตกต่างกันทางสถิติ โดยไอโซเลต BSD603 มีผลทำให้แผลมีขนาดเล็กที่สุด ในขณะที่ทุกกรรมวิธีพบการสร้างสปอร์ของเชื้อได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยไอโซเลต BSD502 ทำให้เชื้อรำนํ้าค้างสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.21)

ความสามารถของ culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSD101, BSD406, BSD502, BSD604, BSN603, *B. subtilis* และ nutrient broth ในระยะ log phase ในการยับยั้งโรคสแคบ พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (นํ้ากลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต BSD101 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด และแผลมีขนาดเล็กที่สุด (ตารางที่ 4.22)

สำหรับในระยะ stationary phase พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (นํ้ากลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต BSD101 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด ในขณะที่ทุกกรรมวิธีพบขนาดของแผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม แต่มีแนวโน้มว่าไอโซเลต BSD406 และ BSN603 มีผลทำให้แผลมีขนาดเล็กที่สุด (ตารางที่ 4.22)

การทดสอบความสามารถของ culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSD203, BSD405, BSN201, BSN301, BSN304, *B. subtilis* และ nutrient broth ในระยะ log phase ในการยับยั้งโรคราสนิม พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคและการสร้างสปอร์ของเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (นํ้ากลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต BSN201 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด แผลมีขนาดเล็กที่สุด และเชื้อราสนิมสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.23)

สำหรับในระยะ stationary phase พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเกิดโรคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (นํ้ากลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต BSN201 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด สำหรับขนาดของแผลพบว่าทุกวิธีการมีขนาดแผลแตกต่างกันทางสถิติ โดยไอโซเลต BSN201 มีผลทำให้แผลมีขนาดเล็กที่สุด ในขณะเดียวกันพบว่าทุกกรรมวิธีมีผลทำให้การสร้างสปอร์ของเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยไอโซเลต BSN201 ทำให้เชื้อราสนิมสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.23)

ตารางที่ 4.21 ผลของ *Bacillus* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป culture filtrate ต่อการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่น ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	การเกิดโรคราน้ำค้าง		
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)	จำนวนสปอร์ ($\times 10^3$ spore/ใบ)
Culture filtrate from log phase			
BSD502	2.75 a ^{1/}	0.22 b	86.25 ab
BSD603	0.00 a	0.00 a	0.00 a
BSD604	3.25 a	0.41 b	198.75 c
BSN501	1.75 a	0.25 b	132.00 bc
BSN502	7.50 b	0.29 b	31.50 ab
<i>B. subtilis</i>	3.00 a	0.24 b	62.00 ab
Nutrient broth (control)	10.00 b	0.29 b	209.50 c
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 b	0.46 b	214.50 c
F - test	**	**	**
CV (%)	43.38	37.54	62.36
Culture filtrate from stationary phase			
BSD502	2.50 a	0.31 abc	18.75 a
BSD603	2.50 a	0.15 a	46.50 a
BSD604	4.00 ab	0.20 ab	51.25 a
BSN501	4.25 ab	0.32 abc	56.00 a
BSN502	3.00 a	0.28 abc	89.75 a
<i>B. subtilis</i>	6.25 b	0.38 bc	123.75 a
Nutrient broth (control)	10.00 c	0.40 bc	266.50 b
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 c	0.45 c	363.00 b
F - test	**	*	**
CV (%)	37.55	40.67	71.97

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ (*) และ $P \leq 0.01$ (**) โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.22 ผลของ *Bacillus* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป culture filtrate ต่อการเกิดโรคสแคบในอู่น ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	การเกิดโรคสแคบ	
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)
Culture filtrate from log phase		
BSD101	2.50 a ^{1/}	0.07 a
BSD406	7.75 b	0.30 b
BSD502	8.50 b	0.29 b
BSD604	8.75 b	0.31 b
BSN603	6.75 b	0.22 b
<i>B. subtilis</i>	10.00 b	0.33 b
Nutrient broth (control)	10.00 b	0.32 b
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 b	0.34 b
F - test	**	**
CV (%)	30.50	28.16
Culture filtrate from stationary phase		
BSD101	3.00 a	0.35
BSD406	5.50 ab	0.29
BSD502	4.00 a	0.31
BSD604	4.75 a	0.30
BSN603	4.75 ab	0.29
<i>B. subtilis</i>	7.25 ab	0.33
Nutrient broth (control)	10.00 b	0.36
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 b	0.46
F - test	*	NS
CV (%)	27.41	41.36

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ (*), $P \leq 0.01$ (**) โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.23 ผลของ *Bacillus* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป culture filtrate ต่อการเกิด
โรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	การเกิดโรคราสนิม		
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)	จำนวนสปอร์ (x10 ³ spore/ใบ)
Culture filtrate from log phase			
BSD203	6.25 bc ^{1/}	0.21 bcd	5.75 a
BSD405	4.75 b	0.30 cd	9.50 ab
BSN201	0.50 a	0.07 a	0.00 a
BSN301	3.75 ab	0.15 ab	0.50 a
BSN304	7.25 bc	0.20 bc	8.25 ab
<i>B. subtilis</i>	6.50 bc	0.22 bcd	24.00 bc
Nutrient broth (control)	10.00 c	0.35 c	13.00 ab
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 c	0.31 cd	38.25 c
F - test	**	**	**
CV (%)	38.43	36.98	83.54
Culture filtrate from stationary phase			
BSD203	7.00 ab	0.32 ab	8.75 a
BSD405	8.75 b	0.35 abc	31.75 b
BSN201	3.25 a	0.25 a	2.50 a
BSN301	9.25 b	0.33 ab	4.00 a
BSN304	8.25 b	0.37 bc	40.25 b
<i>B. subtilis</i>	8.25 b	0.37 bc	47.00 bc
Nutrient broth (control)	10.00 b	0.38 bc	46.75 bc
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 b	0.46 c	65.00 c
F - test	**	*	**
CV (%)	32.27	19.99	47.53

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ (*) และ $P \leq 0.01$ (**) โดยวิธี DMRT.

ความสามารถของ culture filtrate ของเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SSR107, SHH202, SHR103, SYR205, SYR107 และ PDB ในระยะ log phase ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคและการสร้างสปอร์ของเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต SHR103 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด ในขณะที่ไอโซเลต SYR107 มีผลทำให้แผลมีขนาดเล็กที่สุด และไอโซเลต SHR103 ทำให้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.24)

สำหรับในระยะ stationary phase พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเกิดโรคและการสร้างสปอร์ของเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต SSR107 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด แผลมีขนาดเล็กที่สุด อีกทั้งทำให้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.24)

การทดสอบความสามารถของ culture filtrate ของเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SSR203, SSH213, SYR107, SHH202, SHR106 และ PDB ในระยะ log phase ในการยับยั้งโรคสแคบ พบว่าการเกิดแผล และขนาดของแผลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต SHH202 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด และแผลมีขนาดเล็กที่สุด (ตารางที่ 4.25)

สำหรับในระยะ stationary phase พบว่าทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งการเกิดโรคแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต SHR106 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด และไอโซเลต SYR107 มีผลทำให้แผลมีขนาดเล็กที่สุด (ตารางที่ 4.25)

การทดสอบความสามารถของ culture filtrate ของเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SSH209, SSH211, SSH213, SSH216, SYR205 และ PDB ในระยะ log phase ในการยับยั้งโรคราสนิม พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) สำหรับขนาดของแผลพบว่าทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยไอโซเลต SSH216 มีผลทำให้แผลมีขนาดเล็กที่สุด และพบว่าทุกกรรมวิธีมีการสร้างสปอร์ของเชื้อมีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งไอโซเลต SSH216 มีผลทำให้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.26)

สำหรับในระยะ stationary phase พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) โดยไอโซเลต SSH211 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด แผลมีขนาดเล็กที่สุด และทำให้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.26)

ตารางที่ 4.24 ผลของ *Streptomyces* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป culture filtrate ต่อการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่น ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	การเกิดโรคราน้ำค้าง		
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)	จำนวนสปอร์ (x10 ³ spore/ใบ)
Culture filtrate from log phase			
SSR107	6.81 ab ^{1/}	0.23 ab	36.00 a
SHH202	6.00 a	0.25 ab	50.81 a
SHR103	4.75 a	0.22 ab	28.87 a
SYR205	5.62 a	0.27 bc	35.25 a
SYR107	5.37 a	0.19 a	35.43 a
Potato dextrose broth (control)	8.68 bc	0.32 cd	79.93 b
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 c	0.34 c	101.43 b
F - test	**	**	**
CV (%)	40.52	34.40	73.00
Culture filtrate from stationary phase			
SSR107	3.93 a	0.18 a	23.00 a
SHH202	6.68 bcd	0.24 abc	25.62 a
SHR103	5.50 ab	0.23 ab	33.00 a
SYR205	6.06 abc	0.25 abc	42.81 a
SYR107	6.18 bc	0.21 a	52.50 a
Potato dextrose broth (control)	7.81 cd	0.33 c	107.00 b
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	8.75 d	0.32 bc	169.56 c
F - test	**	**	**
CV (%)	45.51	45.35	79.38

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น P ≤ 0.01 โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.25 ผลของ *Streptomyces* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป culture filtrate ต่อการเกิดโรคสแคบในองุ่น ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	การเกิดโรคสแคบ	
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)
Culture filtrate from log phase		
SSR203	3.50 ab ^{1/}	0.22 b
SSH213	7.00 bcd	0.38 c
SYR107	5.00 bc	0.38 c
SHH202	0.00 a	0.00 a
SHR106	4.25 b	0.23 b
Potato dextrose broth (control)	8.50 cd	0.36 c
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 d	0.40 c
F - test	**	**
CV (%)	48.70	31.54
Culture filtrate from stationary phase		
SSR203	5.75 ab	0.30 abc
SSH213	2.50 a	0.08 ab
SYR107	2.50 a	0.07 a
SHH202	5.25 ab	0.22 abc
SHR106	2.25 a	0.19 abc
Potato dextrose broth (control)	10.00 b	0.32 bc
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 b	0.40 c
F - test	*	*
CV (%)	64.91	68.64

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ (*) และ $P \leq 0.01$ (**) โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.26 ผลของ *Streptomyces* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ในรูป culture filtrate ต่อการเกิดโรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	การเกิดโรคราสนิม		
	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)	จำนวนสปอร์ (x10 ³ spore/ใบ)
Culture filtrate from log phase			
SSH209	10.00	0.37 a ^{1/}	135.25 a
SSH211	10.00	0.39 a	123.25 a
SSH213	9.75	0.36 a	118.00 a
SSH216	9.75	0.35 a	116.75 a
SYR205	9.75	0.40 a	153.00 a
Potato dextrose broth (control)	10.00	0.48 ab	180.25 ab
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00	0.53 b	246.25 b
F - test	NS	*	*
CV (%)	3.30	20.11	33.23
Culture filtrate from stationary phase			
SSH209	8.25 ab	0.30 ab	55.25 ab
SSH211	6.00 a	0.14 a	22.00 a
SSH213	9.75 b	0.37 bc	111.50 abc
SSH216	10.00 b	0.48 cd	151.51 bc
SYR205	8.25 ab	0.38 bcd	114.00 abc
Potato dextrose broth (control)	10.00 b	0.51 cd	167.75 bc
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	10.00 b	0.55 d	198.75 c
F - test	*	**	*
CV (%)	20.86	28.08	63.29

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น P ≤ 0.05 (*) และ P ≤ 0.01 (**) โดยวิธี DMRT.

4.7 การทดสอบผลกระทบของการใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ร่วมกัน ในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น

การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในรูป cell suspensions และ culture filtrate ในระยะ log phase และ stationary phase ในการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิม โดยคัดเลือกไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุดในแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4.27 มาทดสอบร่วมกัน

ตารางที่ 4.27 ไอโซเลตของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดใน การยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่นที่นำมาทดสอบร่วมกัน

รูปแบบของเชื้อ	ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง		
	โรคราน้ำค้าง	โรคสแคบ	โรคราสนิม
<i>Bacillus</i> spp.			
Cell suspensions from log phase	BSN502	BSD502	BSN301
Cell suspensions from stationary phase	BSD603	BSN603	BSN301
Culture filtrate from log phase	BSD603	BSD101	BSN201
Culture filtrate from stationary phase	BSD603	BSD101	BSN201
<i>Streptomyces</i> spp.			
Cell suspensions from log phase	SHH202	SHH202	SSH216
Cell suspensions from stationary phase	SHR103	SHH202	SSH211
Culture filtrate from log phase	SYR107	SHH202	SSH216
Culture filtrate from stationary phase	SSR107	SYR107	SSH211

ผลการทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง โดยการให้ BSN502, BHH202 และ BSN502 ร่วมกับ BHH202 ในรูป cell suspensions ในระยะ log phase พบว่าทุกวิธีการสามารถยับยั้งการเกิดโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) แต่มีแนวโน้มว่าการใช้ BSN502 พบการเกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด สำหรับขนาดของแผลพบว่า BSN502 ร่วมกับ SHH202 ให้ขนาดแผลเล็กที่สุด เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม นอกจากนี้ทุกกรรมวิธีทำให้เชื้อสร้างสปอร์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยการให้ BSN502 ร่วมกับ SHH202 ทำให้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.28)

สำหรับในระยะ stationary phase การใช้ BSD603, SHR103 และ BSD603 ร่วมกับ SHR103 พบจำนวนการเกิดแผล ขนาดของแผลมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม และการสร้างสปอร์ของเชื้อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยการใช้ BSD603 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด แผลมีขนาดเล็กที่สุด และทำให้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.28)

การใช้ BSD603, SYR107 และ BSD603 ร่วมกับ SYR107 ในรูปของ culture filtrate ในระยะ log phase พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าการใช้ BSD603 ร่วมกับ SYR107 มีผลทำให้เกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด แผลมีขนาดเล็กที่สุด และทำให้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.28)

สำหรับในระยะ stationary phase พบว่าการใช้ BSD603 ร่วมกับ SSR107 สามารถยับยั้งการเกิดโรคและการสร้างสปอร์ของเชื้อได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทางสถิติพบว่าทุกกรรมวิธีพบจำนวนแผล ขนาดของแผล และการสร้างสปอร์ของเชื้อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (ตารางที่ 4.28)

การยับยั้งการเกิดโรคสแคบ ในรูป cell suspensions ในระยะ log phase พบว่าการใช้ BSD502, SHH202 และ BSD502 ร่วมกับ SHH202 สามารถยับยั้งการเกิดโรคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม ซึ่ง SHH202 พบการเกิดแผลน้อยที่สุด ส่วน BSD502 ร่วมกับ SHH202 มีขนาดแผลเล็กที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทางสถิติพบว่าทุกกรรมวิธีมีขนาดของแผลแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.29)

สำหรับระยะ stationary phase พบว่าการใช้ BSN603, SHH202 และ BSN603 ร่วมกับ SHH202 พบการเกิดแผล และมีขนาดของแผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดย BSN603 ร่วมกับ SHH202 มีการเกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด และขนาดของแผลเล็กที่สุด (ตารางที่ 4.29)

สำหรับในรูป culture filtrate ในระยะ log phase พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเกิดโรคแตกต่างกัน โดยพบการเกิดแผล และขนาดของแผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยการใช้ SHH202 และ BSD101 ร่วมกับ SHH202 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.29)

ส่วนในระยะ stationary phase พบว่าการใช้ BSD101, SYR107 และ BSD101 ร่วมกับ SYR107 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม โดยการใช้ SYR107 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.29)

สำหรับการยับยั้งการเกิดโรคราสนิม ในรูป cell suspensions ในระยะ log phase พบว่าการใช้ SSH216 พบการเกิดแผลน้อยที่สุด และการสร้างสปอร์น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทางสถิติ พบว่าทุกกรรมวิธีพบจำนวนการเกิดแผล และการสร้างสปอร์ของเชื้อมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อ

เปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม ในขณะที่ขนาดของแผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม (ตารางที่ 4.30)

สำหรับในระยะ stationary phase พบว่าการใช้ BSN301, SSH211 และ BSN301 ร่วมกับ SSH211 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกัน โดยพบการเกิดแผลและการสร้างสปอร์ของเชื้อ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม ในขณะที่ทุกกรรมวิธีมีขนาดแผลแตกต่างกันทางสถิติ โดยการใช้ SSH211 พบการเกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด ขนาดของแผลเล็กที่สุด และทำให้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.30)

ส่วนในรูป culture filtrate ในระยะ log phase พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกัน โดยพบการเกิดแผลแตกต่างกันทางสถิติ และการสร้างสปอร์ของเชื้อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม ซึ่งการใช้ BSN201 ร่วมกับ SSH216 พบการเกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด ขนาดของแผลเล็กที่สุด และทำให้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.30)

และในระยะ stationary phase พบว่าการใช้ BSN201 ร่วมกับ SSH211 พบการเกิดแผลจำนวนน้อยที่สุด และขนาดของแผลเล็กที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทางสถิติพบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกัน โดยพบจำนวนแผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการควบคุม และขนาดของแผลมีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ทุกกรรมวิธีทำให้เชื้อสร้างสปอร์แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.30)

ตารางที่ 4.28 ผลของ *Bacillus* spp. ร่วมกับ *Streptomyces* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ต่อการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่น ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)	จำนวนสปอร์ (x10 ³ spore/ใบ)
Cell suspensions from log phase			
BSN502	1.25	0.14 ab ^{1/}	4.25 a
SHH202	2.75	0.30 bc	8.50 a
BSN502+SHH202	1.50	0.10 a	0.75 a
Control	3.00	0.38 c	27.50 b
F - test	NS	*	**
CV(%)	39.03	48.97	85.12
Cell suspensions from stationary phase			
BSD603	0.50 a	0.05 a	0.00 a
SHR103	2.00 bc	0.24 b	5.25 a
BSD603+SHR103	0.75 ab	0.14 ab	0.25 a
Control	2.25 c	0.29 b	24.25 b
F - test	*	*	**
CV(%)	28.01	59.37	113.84
Culture filtrate from log phase			
BSD603	1.75	0.18	7.50 a
SYR107	1.75	0.16	18.75 a
BSD603+SYR107	1.25	0.15	1.00 a
Control	2.00	0.26	44.50 b
F - test	NS	NS	**
CV(%)	38.94	14.49	130.38
Culture filtrate from stationary phase			
BSD603	2.00 a	0.13 ab	5.50 a
SSR107	1.25 a	0.23 b	3.25 a
BSD603+SSR107	0.75 a	0.06 a	0.25 a
Control	4.50 b	0.34 c	73.50 b
F - test	**	**	**
CV(%)	28.19	37.21	37.85

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ (*) และ $P \leq 0.01$ (**) โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.29 ผลของ *Bacillus* spp. ร่วมกับ *Streptomyces* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ต่อการเกิดโรคสแคปในอรุ่น ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)
Cell suspensions from log phase		
BSD502	4.50 a ^{1/}	0.10 a
SHH202	0.25 a	0.07 a
BSD502+SHH202	0.75 a	0.06 a
Control	10.00 b	0.31 b
F -test	**	*
CV(%)	43.36	84.45
Cell suspensions from stationary phase		
BSN603	8.25 b	0.18 b
SHH202	5.75 b	0.24 bc
BSN603+SHH202	1.50 a	0.05 a
Control	10.00 b	0.30 c
F - test	**	**
CV(%)	19.07	32.85
Culture filtrate from log phase		
BSD101	3.75 b	0.22 b
SHH202	0.00 a	0.00 a
BSD101+SHH202	0.00 a	0.00 a
Control	10.00 c	0.33 b
F - test	**	**
CV(%)	32.31	65.04
Culture filtrate from stationary phase		
BSD101	2.00 a	0.14 a
SYR107	0.00 a	0.00 a
BSD101+SYR107	1.25 a	0.05 a
Control	10.00 b	0.31 b
F - test	**	**
CV(%)	36.09	83.90

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ (*) และ $P \leq 0.01$ (**) โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.30 ผลของ *Bacillus* spp. ร่วมกับ *Streptomyces* spp. ที่ระยะการเจริญต่างกัน ต่อการเกิดโรคราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด

ระยะการเจริญของเชื้อ/ไอโซเลต	จำนวนแผล	ขนาดแผล (ซม.)	จำนวนสปอร์ (x10 ³ spore/ใบ)
Cell suspensions from log phase			
BSN301	7.00 ab ^{1/}	0.22	75.25 bc
SSH216	3.25 a	0.18	9.75 a
BSN301+SSH216	3.25 a	0.12	16.25 ab
Control	10.00 b	0.32	88.25 c
F - test	*	NS	*
CV(%)	31.91	64.61	83.09
Cell suspensions from stationary phase			
BSN301	3.25 a	0.12 a	14.50 ab
SSH211	1.25 a	0.05 a	3.25 a
BSN301+SSH211	4.00 a	0.15 a	21.25 b
Control	10.00 b	0.30 b	99.00 c
F -test	**	*	**
CV(%)	48.14	61.20	37.02
Culture filtrate from log phase			
BSN201	4.25 ab	0.20	15.00 a
SSH216	5.25 ab	0.21	28.50 a
BSN201+SSH216	2.25 a	0.15	5.50 a
Control	10.00 b	0.34	100.25 b
F -test	*	NS	**
CV(%)	64.20	57.65	63.89
Culture filtrate from stationary phase			
BSN201	1.75 a	0.14 a	5.75 a
SSH211	2.25 a	0.07 a	11.25 a
BSN201+SSH211	1.75 a	0.07 a	15.50 a
Control	10.00 b	0.31 b	42.50 b
F -test	**	*	*
CV(%)	29.00	50.61	85.43

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น P ≤ 0.05 (*) และ P ≤ 0.01 (**) โดยวิธี DMRT.

4.8 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

4.8.1 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase

เชื้อ *Bacillus* spp. มีกิจกรรมของเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบ 5 ไอโซเลตในระยะ log phase ได้แก่ ไอโซเลต BSD604, BSN301, BSD406, BSD502 และ BSD101 ที่ทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดกว้างที่สุด 5 อันดับแรก จาก 12 ไอโซเลต มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 1.87, 1.67, 1.62, 1.45 และ 1.42 เซนติเมตร ตามลำดับ และพบ 5 ไอโซเลต ในระยะ stationary phase ได้แก่ ไอโซเลต BSD502, BSN301, BSD604, BSD405 และ BSD406 ที่ทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดกว้างที่สุด 5 อันดับแรก จาก 13 ไอโซเลต มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 2.07, 2.05, 2.00, 1.68 และ 1.68 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.31, รูปที่ 4.8ก)

สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถสร้างเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ พบ 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต SYR107, SSR107, SSH213, SSH209 และ SSH211 ที่ทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดกว้างที่สุด 5 อันดับแรกจาก 10 ไอโซเลต เฉลี่ยเท่ากับ 3.51, 3.48, 2.65, 2.61 และ 2.35 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.32, รูปที่ 4.8ข)

4.8.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Protease

พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. มีกิจกรรมของเอนไซม์ protease ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งพบ 3 ไอโซเลต ในระยะ log phase ได้แก่ ไอโซเลต BSD604, BSD406 และ BSD101 ทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 1.95, 1.50 และ 1.30 เซนติเมตร ตามลำดับ และพบ 5 ไอโซเลต ในระยะ stationary phase ได้แก่ ไอโซเลต BSD604, BSD502, BSD406, BSD101 และ BSN301 ทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 2.00, 1.87, 1.72, 1.30 และ 1.12 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.31, รูปที่ 4.8ค)

ในขณะที่เชื้อ *Streptomyces* spp. ทุกไอโซเลตไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ protease (ตารางที่ 4.32)

4.8.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase

พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลตไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ได้ (ตารางที่ 4.31) ขณะที่เชื้อ *Streptomyces* spp. ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบ 6 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต SYR107, SSH211, SSR203, SYR205, SSH213 และ SSH216 ทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 4.10, 3.62, 2.90, 2.57, 2.47 และ 2.26 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.32, รูปที่ 4.8ง)

ตารางที่ 4.31 ความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการสร้างเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase protease และ chitinase โดยประเมินจากขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นจากการย่อย substrate เฉพาะ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหลุมวุ้นที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 0.5 เซนติเมตร)

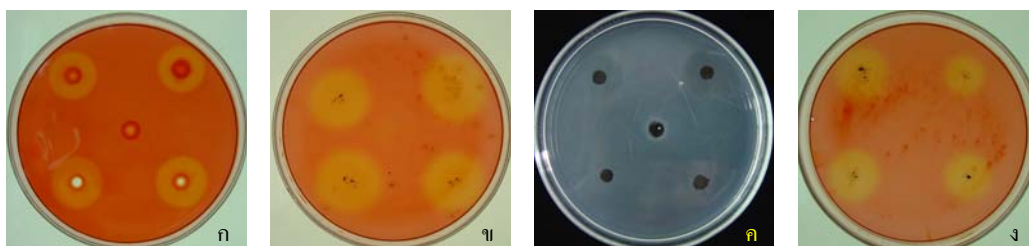
ไอโซเลต	ขนาดของวงใส (ซม.)					
	β -1, 3-1, 4-glucanase		protease		chitinase	
	FL ^{1/}	FS ^{2/}	FL	FS	FL	FS
BSD101	1.42 d ^{3/}	1.57 gh	1.30 b	1.30 c	0.50	0.50
BSD203	0.50 a	0.50 a	0.50 a	0.50 a	0.50	0.50
BSD405	1.05 b	1.68 h	0.50 a	0.50 a	0.50	0.50
BSD406	1.62 e	1.68 h	1.50 c	1.72 d	0.50	0.50
BSD502	1.45 d	2.07 i	0.50 a	1.87 e	0.50	0.50
BSD603	1.05 b	1.12 cd	0.50 a	0.50 a	0.50	0.50
BSD604	1.87 f	2.00 i	1.95 d	2.00 f	0.50	0.50
BSN201	1.05 b	1.25 de	0.50 a	0.50 a	0.50	0.50
BSN301	1.67 e	2.05 i	0.50 a	1.12 b	0.50	0.50
BSN304	0.50 a	0.81 b	0.50 a	0.50 a	0.50	0.50
BSN501	1.10 b	1.37 ef	0.50 a	0.50 a	0.50	0.50
BSN502	1.05 b	1.47 fg	0.50 a	0.50 a	0.50	0.50
BSN603	1.26 c	1.43 fg	0.50 a	0.50 a	0.50	0.50
<i>B. subtilis</i>	1.00 b	1.02 c	0.50 a	0.50 a	0.50	0.50
F - test	**	**	**	**	NS	NS
CV(%)	8.03	7.17	9.32	5.52	0.00	0.00

^{1/}FL = culture filtrate from log phase, ^{2/}FS = culture filtrate from stationary phase, ^{3/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.01$ โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4.32 ความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการสร้างเอนไซม์ β -1, 3-1, 4- glucanase, protease และ chitinase โดยประเมินจากขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นจากการย่อย substrate เฉพาะ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อทดสอบเท่ากับ 0.1 เซนติเมตร)

ไอโซเลต	ขนาดของวงใส (ซม.)		
	β -1, 3-1, 4-glucanase	protease	chitinase
SSR203	2.00 b ^{1/}	0.10	2.90 c
SSR107	3.48 e	0.10	0.10 a
SSH209	2.61 d	0.10	0.10 a
SSH211	2.35 cd	0.10	3.62 d
SSH213	2.65 d	0.10	2.47 b
SSH216	0.70 a	0.10	2.26 b
SYR205	0.10 a	0.10	2.57 b
SYR107	3.51 e	0.10	4.10 e
SHH202	1.96 b	0.10	0.10 a
SHR103	2.15 bc	0.10	0.10 a
SHR106	2.03 bc	0.10	0.10 a
F - test	**	NS	**
CV(%)	10.02	0.00	13.35

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.01$ โดยวิธี DMRT.



รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะของวงใสที่เกิดจากการย่อย substrate ที่เชื้อ *Bacillus* spp. และ

Streptomyces spp. สร้างขึ้น

ก. เอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase จากเชื้อ *Bacillus* spp.

ข. เอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase จากเชื้อ *Streptomyces* spp.

ค. เอนไซม์ protease จากเชื้อ *Bacillus* spp.

ง. เอนไซม์ chitinase จากเชื้อ *Streptomyces* spp.

4.9 การระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่ผ่านการคัดเลือก

4.9.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Bacillus* spp.

ผลการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 13 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าโคโลนีมีลักษณะแตกต่างกันทั้งขนาด และรูปร่าง โดยสามารถแบ่งลักษณะโคโลนีได้เป็น 5 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 โคโลนีค่อนข้างกลม โค้งนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร สีขาวถึงสีครีม ผิวเป็นมันแต่ไม่วาว เมื่อใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ตะโกโลนีจะเหนียวติดกับผิวหน้าอาหาร ได้แก่ ไอโซเลต BSD203 และ *B. subtilis*

กลุ่มที่ 2 โคโลนีค่อนข้างกลม หรือรูปร่างไม่แน่นอน แบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร ขอบเรียบหรือหยัก สีขาวถึงครีม ผิวด้านทึบแสง เมื่อใช้ลวดเขี่ยเชื้อตะโกโลนีจะเหนียวติดกับผิวหน้าอาหาร ได้แก่ ไอโซเลต BSD101, BSD603 และ BSN301

กลุ่มที่ 3 โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ลักษณะคล้ายหยักกลม นูนตรงกลาง ขอบเป็นหยัก สีขาวถึงครีม ผิวด้าน เมื่อใช้ลวดเขี่ยเชื้อตะโกโลนีหลุดออกได้ง่าย ได้แก่ ไอโซเลต BSD405, BSN201, BSN304, BSN502 และ BSN603

กลุ่มที่ 4 โคโลนีรูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน นูนตรงกลาง ขอบเรียบ สีขาวถึงครีม ทึบแสง เมื่อใช้ลวดเขี่ยเชื้อตะโกโลนีจะเหนียวติดกับผิวหน้าอาหาร ได้แก่ ไอโซเลต BSD406

กลุ่มที่ 5 โคโลนิรูปร่างกลมหรือไม่แน่นอน หนูนสูงทั้งโคโลนี ผิวเรียบถึงหยักเป็นลอน สีขาวถึงครีม เมื่อใช้ลวดเขี่ยเชื้อตะโคโลนีจะเหนียวติดกับผิวหน้าอาหาร ได้แก่ไอโซเลต BSD502, BSD604 และ BSD501

ลักษณะของเซลล์ ผลการศึกษาลักษณะของเซลล์โดยการย้อมด้วย crystal violet พบรูปร่างเป็น rod มีขนาดแตกต่างกันไป โดยมีขนาดตั้งแต่ 0.62-1.02x1.5-3.0 ไมโครเมตร ส่วนสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ ทรงกระบอก และกลม ตำแหน่งของสปอร์อยู่ตรงกลาง หรือก่อนไปทางปลายเซลล์ เซลล์ไม่โป่งออก ส่วนของเซลล์แบคทีเรียมีสีขาวไม่ติดสีย้อมของ malachite gree

4.9.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* spp.

1. การติดสีแกรม

พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลตย้อมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเชื้อเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

2. การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยแป้ง

จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลต บนอาหาร starch agar เมื่อเท Logol's iodine ท่วมผิวอาหาร พบบริเวณใสรอบโคโลนีของ *Bacillus* จำนวน 12 ไอโซเลต แสดงว่าสามารถย่อยแป้งได้ ยกเว้นไอโซเลต BSN502 ไม่สามารถย่อยแป้งได้ (ตารางที่ 4.34)

3. การทดสอบแคตาเลส

เมื่อหยด 3% H₂O₂ ลงบนสไลด์ที่มีเชื้อ *Bacillus* spp. พบว่าเกิดฟองแก๊สขึ้นทุกไอโซเลต แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้ (ตารางที่ 4.34)

4. การทดสอบการย่อยเคซีน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลต บนอาหาร casein agar เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่าทุกไอโซเลตสามารถย่อยเคซีนได้ (ตารางที่ 4.34)

5. การทดสอบการย่อยเจลาติน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ในอาหาร gelatin media ตรวจสอบผลทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อเอียงหลอดอาหารขณะที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่าหลอดที่ทำการปลูกเชื้อ *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลต มีลักษณะเหลวแสดงว่าทุกไอโซเลตสามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.34)

6. การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต

เมื่อทำการปลูกเชื้อ *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลต ในอาหาร carbohydrate fermentation broth ผสมแหล่งคาร์บอน พบว่าทุกไอโซเลตสามารถสร้างกรดจากน้ำตาล glucose, mannitol และ sucrose โดยเปลี่ยนสีอาหารจากสีน้ำตาลเป็นสีแดง ในขณะที่มีเฉพาะไอโซเลต BSD101, BSD203, BSD406, BSD405 และ BSN304 ที่สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล maltose ได้

และเฉพาะไอโซเลต BSD101, BSD203, BSN603, BSD406 และ BSD604 สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล xylose ได้ แต่ไม่พบว่ามีไอโซเลตใดที่สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล lactose หรือสร้างแก๊สจากน้ำตาลแต่ละชนิด (ตารางที่ 4.34, รูปที่ 4.9)

7. การทดสอบการทนเกลือ

พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลต สามารถเจริญบนอาหาร NA ผสม NaCl 2, 5, 7 และ 10% ได้ (ตารางที่ 4.34)

8. การทดสอบการทนความร้อน

พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลต มีความสามารถในการทนความร้อนแตกต่างกัน โดยสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-55 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.34)

4.9.3 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 14 ไอโซเลต มาสกัดดีเอ็นเอใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ในส่วน 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ B-K1/F และ B-K1/R1 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวได้ทุกไอโซเลต และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1.1 bp ดังรูปที่ 4.10 เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR จากบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 14 ไอโซเลต ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GenBank พบว่าข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลต มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *B. subtilis* ในระดับ 99 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.33

เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกไอโซเลตมีความเหมือนกับเชื้อ *B. subtilis* แต่ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก การระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จึงไม่สามารถนำมาใช้ได้

เมื่อนำข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* spp. มาใช้จัดจำแนกสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

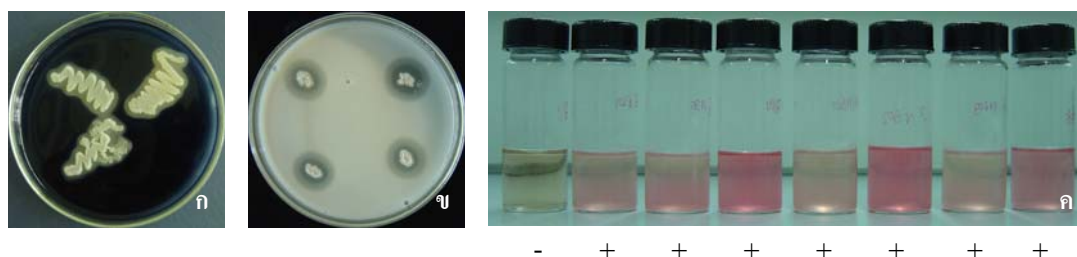
กลุ่มที่ 1 ได้แก่ไอโซเลต BSD101, BSD203 และ BSD604 ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม หรือไม่แน่นอน ผิวด้านหรือมัน อาจมีรอยย่น มีสีขาวครีมหรือน้ำตาล แพร่กระจายบนอาหารได้ดี สปอร์รูปไข่ ตำแหน่งอยู่กลางเซลล์ เซลล์ไม่โป่งออก สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล glucose, mannitol, sucrose, xylose และ fructose แต่ไม่สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล lactose สามารถเจริญได้ที่ pH 5 ทนเกลือได้ถึง 10% NaCl เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 50 องศาเซลเซียส ลักษณะดังกล่าว

ใกล้เคียงกับลักษณะของเชื้อ *B. subtilis* 98 เปอร์เซ็นต์ (Sneath, Mair, Sharpe and Holt, 1986) (ตารางที่ 4.34, รูปที่ 4.11)

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ไอโซเลต BSD405, BSD406, BSD502, BSN301 และ BSN304 ลักษณะโคโลนีมีความแตกต่างกัน สีขาวถึงครีม ผิวเรียบหรือหยาบขบยกสูง สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล glucose, mannitol, sucrose และ fructose แต่ไม่สร้างกรดจากน้ำตาล lactose, xylose เจริญได้ที่ pH 5 ทนเกลือได้ถึง 10% NaCl เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 50 องศาเซลเซียส จากลักษณะดังกล่าวใกล้เคียงกับลักษณะของเชื้อ *B. firmus* 97 เปอร์เซ็นต์ (Sneath, Mair, Sharpe and Holt, 1986) (ตารางที่ 4.3, รูปที่ 4.12)

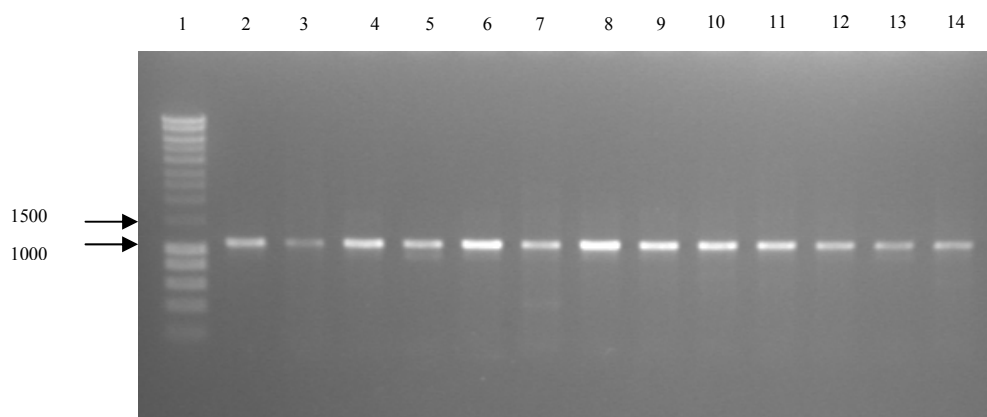
กลุ่มที่ 3 ได้แก่ไอโซเลต BSD603 และ BSN201 ลักษณะโคโลนีขึ้นจากอาหาร สีขาวถึงครีม ขอบหยาบหรือไม่แน่นอน สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล glucose, mannitol, sucrose และ fructose แต่ไม่สร้างกรดจากน้ำตาล maltose, lactose และ xylose เจริญได้ที่ pH 5 ทนเกลือได้ถึง 10% NaCl เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 55 องศาเซลเซียส จากลักษณะดังกล่าวใกล้เคียงกับลักษณะของเชื้อ *B. pantothenicus* 97 เปอร์เซ็นต์ (Sneath, Mair, Sharpe and Holt, 1986) (ตารางที่ 4.34, รูปที่ 4.13)

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ไอโซเลต BSN501, BSN502 และ BSN603 ลักษณะโคโลนีมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอาหาร สีขาวถึงครีม สปอร์มีลักษณะกลม สามารถสร้างกรดจากน้ำตาล glucose, mannitol, sucrose และ fructose แต่ไม่สร้างกรดจากน้ำตาล maltose, lactose และ xylose เจริญได้ที่ pH 5 ทนเกลือได้ถึง 10% NaCl เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 55 องศาเซลเซียส จากลักษณะดังกล่าวใกล้เคียงกับลักษณะของเชื้อ *B. megaterium* 98 เปอร์เซ็นต์ (Sneath, Mair, Sharpe and Holt, 1986) (ตารางที่ 4.34, รูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.9 ตัวอย่างการทดสอบเชื้อ *Bacillus* spp. ทางชีวเคมี

- ก. ลักษณะการย่อยแป้งเกิดเป็นบริเวณใสรอบโคโลนี
- ข. ลักษณะการย่อยเคซีนเกิดเป็นบริเวณใสรอบโคโลนี
- ค. ลักษณะการเกิดกรดจากการใช้น้ำตาล สีอาหารเปลี่ยนจากสีน้ำตาล (-) เป็นสีแดง (+)



รูปที่ 4.10 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วน 16S rDNA ของเชื้อ *Bacillus* spp. เมื่อเพิ่มปริมาณ
 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ B-K1/F และ B-K1/R1
 แถวที่ 1 : 100 bp DNA marker
 แถวที่ 2-14 : เชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต BSD101, BSD203, BSD405,
 BSD406, BSD502, BSD603, BSD604, BSN201, BSN301, BSN304, BSN501,
 BSN502, BSN603 และ *Bacillus subtilis* ตามลำดับ

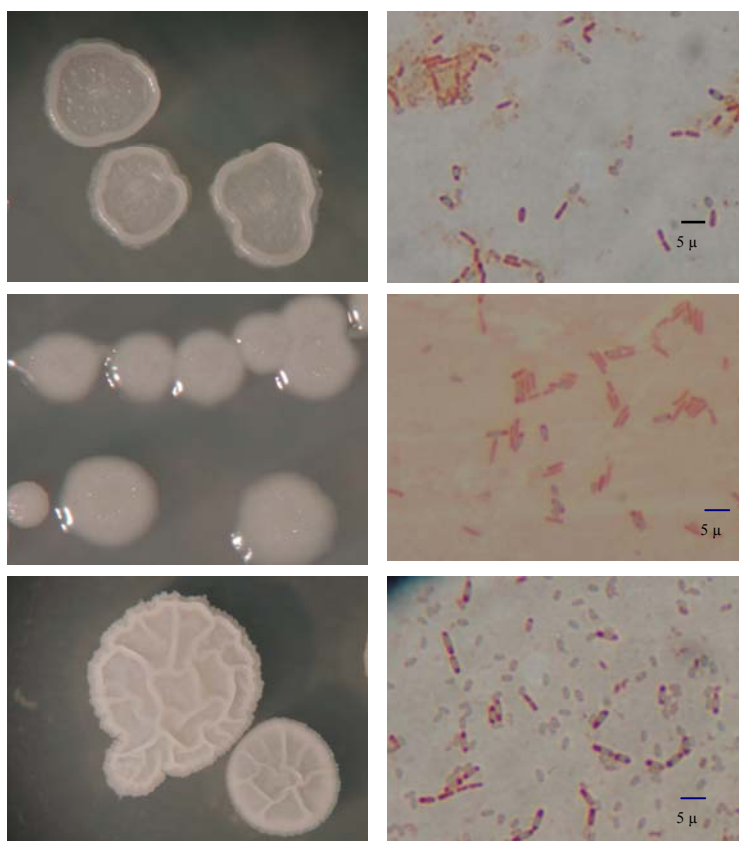
ตารางที่ 4.33 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ โดยการเปรียบเทียบลำดับ
นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank

ไอโซเลต	ชนิด	accession number	E value	ความเหมือน (%)
BSD101	<i>B. subtilis</i>	EF541143	0.0	99
BSD203	<i>B. subtilis</i>	EF541143	0.0	99
BSD405	<i>B. subtilis</i>	EF474343	0.0	99
BSD406	<i>B. subtilis</i>	EF541143	0.0	99
BSD502	<i>B. subtilis</i>	EF581127	0.0	99
BSD603	<i>B. subtilis</i>	EF541143	0.0	99
BSD604	<i>B. subtilis</i>	EF581127	0.0	99
BSN201	<i>B. subtilis</i>	EF581127	0.0	99
BSN301	<i>B. subtilis</i>	EF581127	0.0	99
BSN304	<i>B. subtilis</i>	EF541143	0.0	99
BSN501	<i>B. subtilis</i>	EF581127	0.0	99
BSN502	<i>B. subtilis</i>	EF541143	0.0	99
BSN603	<i>B. subtilis</i>	EF581127	0.0	99
<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	EF581127	0.0	99

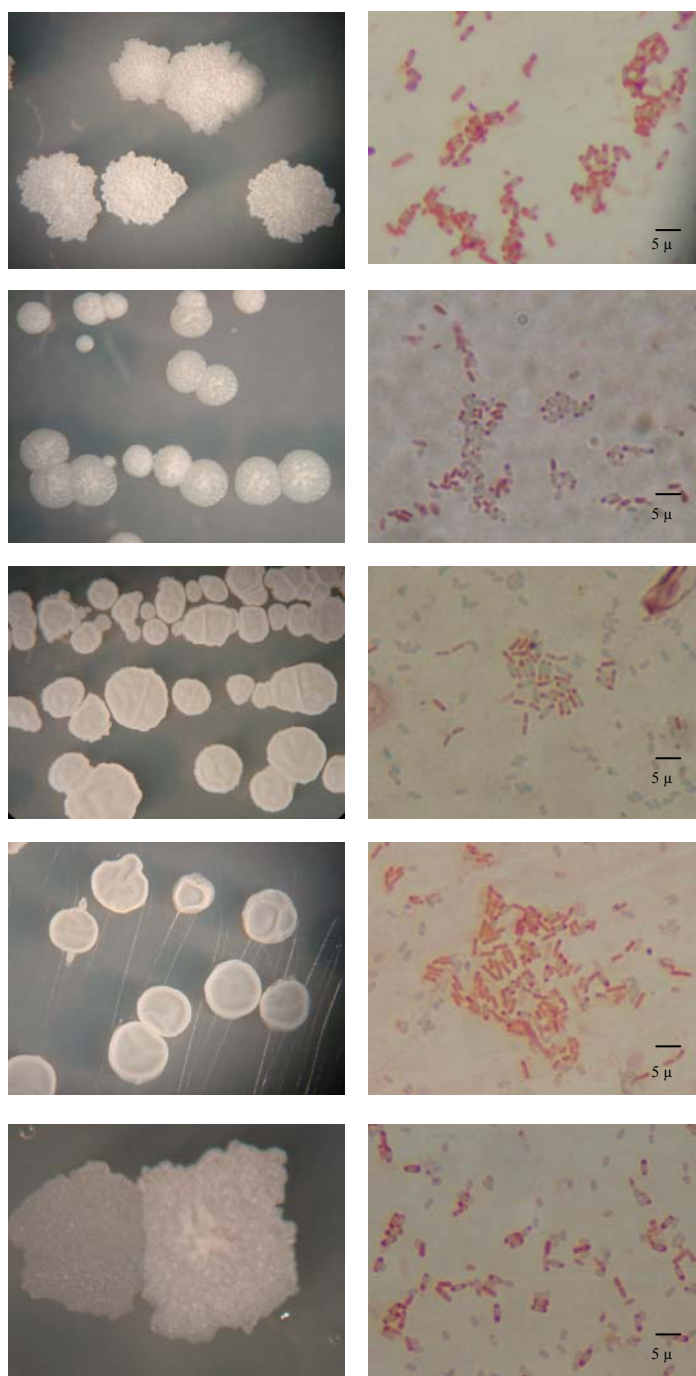
ตารางที่ 4.34 แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี ของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ผ่านการคัดเลือกประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกุ้งที่เกิดจากเชื้อรา เปรียบเทียบกับคุณสมบัติของ *B.subtilis* (BS), *B. firmus* (BF), *B. pantothenicus* (BP) และ *B. megaterium* (BM) อ้างอิงจาก Sneath, Mair, Sharpe and Holt (1986)

Property	BSD 101	BSD 203	BSD 604	BS	BSD 405	BSD 406	BSD 502	BSN 301	BSN 304	BF	BSD 603	BSN 201	BP	BSN 501	BSN 502	BSN 603	BM
Cell width (µm)	0.94	0.87	0.80	0.7- 0.8	0.97	0.94	1.02	0.98	0.91	0.6- 0.9	0.66	0.62	0.5- 0.7	0.93	0.80	0.99	1.2- 1.5
Cell length (µm)	2.16	2.39	2.59	2-3	2.54	2.53	2.59	2.48	2.72	1.2-4	1.95	1.96	2-5	2.86	2.45	2.47	2-5
Spore shape	E	E	E&S	E	E	E	E	E	E	E	E&S	E&S	E&S	E	E	E	E
Spore position	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T&C	T&C	T	C	C	C	C
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Casein test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from																	
Maltose	+/-	+/-	-	ND	+	+	-	-	+	ND	-	-	ND	-	-	-	ND
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	+	ND	-	-	-	-	-	ND	-	-	ND	-	-	-	ND
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	ND	+/-	+	ND	+	+	+	ND
Xylose	+	+	+	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+
Fructose	+	+	+/-	ND	+	+	+/-	+	+	ND	+/-	+/-	ND	+	+	+/-	ND
Growth at Temp																	
Minimum	15	15	15	10	15	15	15	15	15	10	15	15	30	15	15	15	5
Maximum	50	50	45	50	50	40	45	40	50	40	50	55	50	55	55	45	40
pH																	
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl tolerance (%w/v)																	
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	ND

+ = positive, - = negative, ND = no data available, E = ellipsoidal, S = spherical, C = central, T = terminal



รูปที่ 4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *B. subtilis*
 ภาพซ้าย : จากบนลงล่าง ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต BSD101, BSD203 และ BSD604
 ภาพขวา : จากบนลงล่าง ลักษณะสปอร์และเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต BSD101, BSD203 และ BSD604



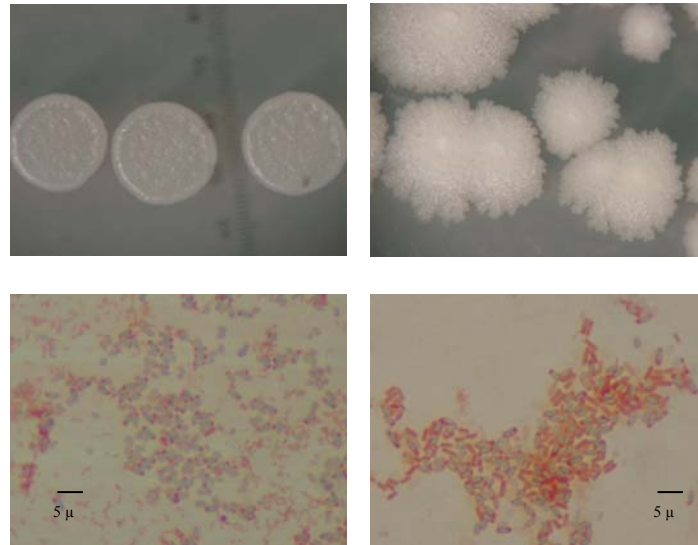
รูปที่ 4.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *B. firmus*

ภาพซ้าย : จากบนลงล่าง ลักษณะโคโลนิของเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต BSD405,

BSD406, BSD502, BSN301 และ BSN304

ภาพขวา : จากบนลงล่าง ลักษณะสปอร์และเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต

BSD405, BSD406, BSD502, BSN301 และ BSN304



รูปที่ 4.13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ

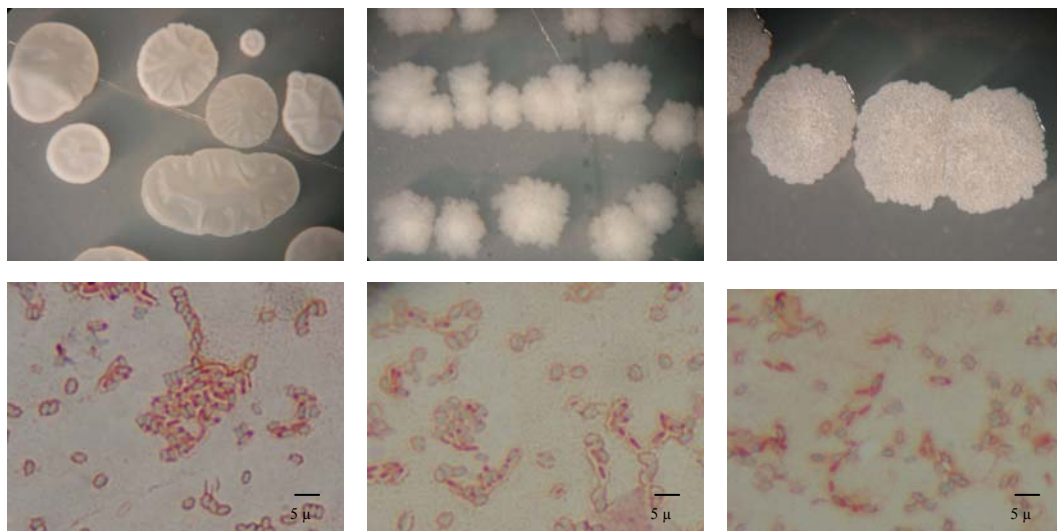
B. pantothenicus

ภาพบน : จากซ้ายไปขวา ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต BSD603

และ BSN201

ภาพล่าง : จากซ้ายไปขวา ลักษณะสปอร์และเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต

BSD603 และ BSN201



รูปที่ 4.14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ

B. megaterium

ภาพบน : จากซ้ายไปขวา ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต BSN501, BSN502 และ BSN603

ภาพล่าง : จากซ้ายไปขวา ลักษณะสปอร์และเชลล์ของเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต BSN501, BSN502 และ BSN603

4.9.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Streptomyces* spp.

ผลการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 11 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA บ่มที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ตามสีของโคโลนี คือ

กลุ่มที่ 1 โคโลนีสีเทาอมดำ ได้แก่ ไอโซเลต SSR203, SSR107, SSH211, SSH213, SYR107 และ SHH202

กลุ่มที่ 2 โคโลนีสีเทาอมขาว ได้แก่ ไอโซเลต SSH209, SSH216 และ SYR205

กลุ่มที่ 3 โคโลนีสีม่วงอมขาว ได้แก่ ไอโซเลต SHR103

กลุ่มที่ 4 โคโลนีสีเขียวอมเทา ได้แก่ ไอโซเลต SHR106

จากลักษณะของสายสปอร์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ไอโซเลตที่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็นสายตรง ได้แก่ ไอโซเลต SSR203, SSR107, SSH216 และ SYR205 และไอโซเลตที่สร้างสปอร์ที่มีลักษณะเป็นเกลียว ได้แก่ ไอโซเลต SSH209, SSH211, SSH213, SYR107, SHH202, SHH103 และ SHH106

เมื่อจัดแบ่งตามสีของอาหารที่เปลี่ยนหลังการเลี้ยงเชื้อ สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ทำให้อาหารมีสีเปลี่ยนจากเดิม ได้แก่ ไอโซเลต SSR203, SSR107, SSH209, SSH216, SYR205, SYR107, SHH202, SHR103 และ SHR106 กลุ่มที่ 2 ไม่ทำให้สีของอาหารเปลี่ยน ได้แก่ ไอโซเลต SSH211 และ SSH213

4.9.5 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptomyces* spp.

1. การติดสีแกรม

พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ทุกไอโซเลตย้อมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเชื้อเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

2. การทดสอบการย่อยเคซีน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ทุกไอโซเลต บนอาหาร casein agar เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบบริเวณใสรอบโคโลนีเพียง 2 ไอโซเลต คือ SSH211 และ SSH213 ที่สามารถย่อยเคซีนได้ (ตารางที่ 4.36)

3. การทดสอบการย่อยเจลาติน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในอาหาร gelatin media ตรวจสอบผลทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อเอียงหลอดอาหารขณะที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลต SSR107, SSH209, SSH211, SSH213, SHH202, SHR103 และ SHR106 มีลักษณะเหลว แสดงว่าสามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.36)

4. การทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อทำการปลูกเชื้อ *Streptomyces* spp. แต่ละไอโซเลต บนอาหาร basal mineral salts medium ผสมแหล่งคาร์บอน พบว่าทุกไอโซเลตสามารถใช้น้ำตาล glucose และ manitol เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ในขณะที่ไอโซเลต SSH211, SHR103 และ SHR106 ไม่สามารถใช้ น้ำตาล fructose ไอโซเลต SSR107 ไม่สามารถใช้น้ำตาล inositol ไอโซเลต SSR107 และ SSH211 ไม่สามารถใช้น้ำตาล sucrose และเฉพาะ SSH211 และ SHR103 ไม่สามารถใช้น้ำตาล xylose ได้ (ตารางที่ 4.36)

5. การทดสอบการทนเกลือ

พบว่า *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSH209, SYR205 และ SHH202 ไม่สามารถเจริญบนอาหาร Waksman Agar ผสม NaCl 4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลต SSR203, SSR107, SSH211, SSH213, SSH216, SYR107, SHR103 และ SHR106 สามารถเจริญบนอาหาร Waksman Agar ผสม NaCl ได้สูงสุดไม่เกิน 7 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.36)

6. การทดสอบการทนความร้อน

พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. แต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการทนความร้อนได้แตกต่างกัน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้ 10 องศาเซลเซียส ได้แก่ ไอโซเลต SSR203, SSR107, SSH209 และ SSH216 และอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้ 45 องศาเซลเซียส ได้แก่ ไอโซเลต SSR203, SSH211, SSH213 และ SYR107 (ตารางที่ 4.36)

4.9.6 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 11 ไอโซเลต มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ในส่วน 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ STR1F และ STR1530R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณดังกล่าวได้ทุกไอโซเลต และจากการวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1.5 bp ดังรูปที่ 4.15 เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR จากบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 11 ไอโซเลต ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GenBank พบว่าข้อมูลนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Streptomyces* spp. ใน GenBank ดังตารางที่ 4.35

เมื่อนำข้อมูลทางพันธุกรรม และคุณสมบัติทางชีวเคมี และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการเปรียบเทียบสามารถจัดจำแนกเชื้อ *Streptomyces* spp. ได้ทั้งหมด 10 ชนิด คือ

ชนิดที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลต SSR203 โคโลนีมีสีเทาอมเขียว เมื่ออายุของเชื้อมากจะมีสีเทาอมดำ สปอร์เป็นสายตรงผสมกับแบบเกลียว เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีน้ำตาล ไม่สร้าง melanin pigment สามารถใช้น้ำตาล glucose, fructose, manitol, inositol, sucrose และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุด 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ที่ pH 7 ทนเกลือได้ถึง 7% NaCl ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. cellulosa* (Williams, Sharpe, and Holt, 1989) (ตารางที่ 4.36, รูปที่ 4.16) แต่เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กลับมีความคล้ายกับเชื้อ *Cupriavidus respiraculi* และ *C. taiwanensis* แต่เดิมจัดอยู่ในจีนัส *Ralstonia* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เป็นพวก chemoheterotrophic หรือ chemolithotrophic สามารถเจริญได้สภาพที่มีความเข้มข้นของสารพิษพวกโลหะหนัก (Vandamme and Coenye, 2004) (ตารางที่ 4.34)

ชนิดที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลต SSR107 โคโลนีมีสีเทาอมดำ ระยะแรกโคโลนีมีสีเหลืองอมเขียว เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองอมน้ำตาล ไม่สร้าง melanin pigment สปอร์เป็นสายตรงผสมกับแบบเกลียว สามารถใช้น้ำตาล glucose, fructose, manitol และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี เจริญได้ที่ pH 7 ทนเกลือได้ถึง 7% NaCl สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุด 37 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ มีความคล้ายกับเชื้อ *S. globisporus* และ *S. spectabilis* แต่เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. globisporus* มากกว่า *S. spectabilis* (Williams, Sharpe, and Holt, 1989) (ตารางที่ 4.36, รูปที่ 4.17)

ชนิดที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลต SSH209 โคโลนีมีสีเทาอมขาว เปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำตาล สร้าง melanin pigment สปอร์เป็นสายตรงผสมแบบเกลียว สามารถใช้น้ำตาล glucose, fructose, manitol, inositol, sucrose และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เจริญได้ที่ pH 7 ไม่สามารถทนเกลือที่ความเข้มข้น 4% NaCl สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุด 37 องศาเซลเซียส มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. aureovorticillatus* 97 เปอร์เซ็นต์ (Williams, Sharpe, and Holt, 1989) (ตารางที่ 4.36, รูปที่ 4.18) ซึ่งผลไปในแนวทางเดียวกันกับการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 4.34)

ชนิดที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลต SSH211 โคโลนีมีสีเทาอมดำ ในระยะโคโลนีมีสีเขียวอมเทา สปอร์เป็นสายตรงผสมแบบเกลียว สามารถใช้น้ำตาล glucose, manitol, inositol และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี เจริญได้ที่ pH 7 ทนเกลือได้ถึง 7% NaCl สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุด 45 องศาเซลเซียส มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. gancidicus* 95 เปอร์เซ็นต์ (Williams, Sharpe, and Holt, 1989) (ตารางที่ 4.36, รูปที่ 4.19) ซึ่งผลไปในแนวทางเดียวกันกับการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 4.34)

ชนิดที่ 5 ได้แก่อโซเลต SSH213 โคโลนิมีสีเทาอมดำ ระยะแรกโคโลนิมีสีเหลืองอมเขียว สปอร์เป็นสายตรง สามารถใช้น้ำตาล glucose, fructose, manitol, inositol, sucrose และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เจริญได้ที่ pH 7 ทนเกลือได้ถึง 7% NaCl สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุด 45 องศาเซลเซียส มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. ghanaensis* 91 เปอร์เซ็นต์ (Williams, Sharpe, and Holt, 1989) (ตารางที่ 4.36, รูปที่ 4.20) ซึ่งผลไปในแนวทางเดียวกันกับการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 4.34)

ชนิดที่ 6 ได้แก่อโซเลต SSH216 โคโลนิมีสีเทาอมขาว เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีน้ำตาล สปอร์เป็นสายตรงผสมแบบเกลียว สามารถใช้น้ำตาล glucose, fructose, manitol, inositol, sucrose และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เจริญได้ที่ pH 7 ทนเกลือได้ถึง 7% NaCl สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุด 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. chattanoogaensis* (Williams, Sharpe, and Holt, 1989) (ตารางที่ 4.36, รูปที่ 4.21) แต่เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ มีความคล้ายกับเชื้อ *Brucella pinnipediae* และ *B. melitensis* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแบบ coccobacillus ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต เป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคแท้งติดต่อในสัตว์ (Brucellosis) สามารถติดต่อถึงคนได้โดยการสัมผัสหรือกินผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (2004) (ตารางที่ 4.34)

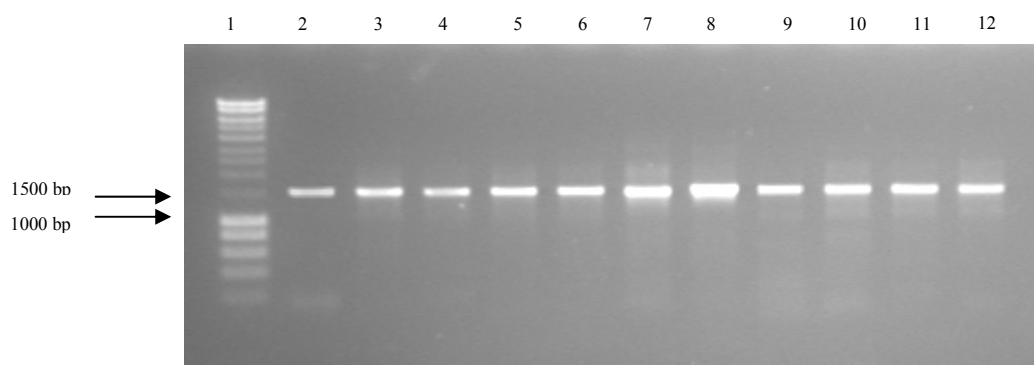
ชนิดที่ 7 ได้แก่อโซเลต SYR205 โคโลนิมีสีเทาอมขาว เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีน้ำตาล สร้าง melanin pigment สปอร์เป็นสายตรง สามารถใช้น้ำตาล glucose, fructose, manitol, inositol, sucrose และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี เจริญได้ที่ pH 7 ไม่สามารถทนเกลือที่ความเข้มข้น 4% NaCl สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. noboritoensis* (Williams, Sharpe, and Holt, 1989) (ตารางที่ 4.36, รูปที่ 4.22) แต่เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายกับเชื้อ Arsenic resistant soil bacterium เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นของสารโลหะหนัก (ตารางที่ 4.34)

ชนิดที่ 8 ได้แก่อโซเลต SYR107 โคโลนิมีสีเทาอมดำ เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีน้ำตาล สร้าง melanin pigment สปอร์เป็นสายตรงผสมแบบเกลียว สามารถใช้น้ำตาล glucose, fructose, manitol, inositol, sucrose และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี เจริญได้ที่ pH 7 ทนเกลือได้ถึง 7% NaCl สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุด 45 องศาเซลเซียส มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. rameus* 99 เปอร์เซ็นต์ (Williams, Sharpe, and Holt, 1989) (ตารางที่ 4.36, รูปที่ 4.23) ซึ่งผลไปในแนวทางเดียวกันกับการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 4.34)

ชนิดที่ 9 ได้แก่อโซเลต SHH202 โคโลนิมีสีเทาอมดำ เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีน้ำตาล สปอร์เป็นสายตรงผสมแบบเกลียว สามารถใช้น้ำตาล glucose, fructose, manitol, inositol และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เจริญได้ที่ pH 7 ไม่สามารถทนเกลือได้ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. malaysiensis* 95 เปอร์เซนต์ (Williams, Sharpe, and Holt, 1989) (ตารางที่ 4.36, รูปที่ 4.24) ซึ่งผลไปในแนวทางเดียวกันกับการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 4.34)

ชนิดที่ 10 ได้แก่ไอโซเลต SHR103 และ SHR106 โคโลนิมีสีเทาอมเขียว สีม่วงอมขาว หรือสีม่วง เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีน้ำตาลหรือสีส้มแดงอมม่วง สร้าง melanin pigment สปอร์เป็นเกลียวผสมแบบสายตรง สามารถใช้น้ำตาล glucose, manitol, inositol, sucrose และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี เจริญได้ที่ pH 7 ทนเกลือได้ถึง 7% NaCl สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. cyaneus* 97 เปอร์เซนต์ (Williams, Sharpe, and Holt, 1989) (ตารางที่ 4.36, รูปที่ 4.25 และ 4.26) ซึ่งผลไปในแนวทางเดียวกันกับการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 4.34)



รูปที่ 4.15 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วน 16S rDNA ของเชื้อ *Streptomyces* spp. เมื่อเพิ่ม

ปริมาณด้วยเทคนิค PCR จากการใช้ไพรเมอร์ STR1F และ STR1530R

แถวที่ 1 : 100 bp DNA

แถวที่ 2-12 : เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSH203, SSR107, SSH209, SSH211,

SSH213, SSH216, SYR205, SYR207, SHH202, SHR103 และ SHR106

ตามลำดับ

ตารางที่ 4.35 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ โดยการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank

ไอโซเลต	ชนิด	accession number	E value	ความเหมือน (%)
SSR203	<i>Cupriavidus respiraculi</i>	AY860237	0.0	92
	<i>C. taiwanensis</i>	AY752959	0.0	90
SSR107	<i>S. globisporus</i>	AB184066	0.0	99
SSH209	<i>S. abreoverticillatus</i>	AY999774	0.0	97
SSH211	<i>S. gancidicus</i>	AB184660	0.0	95
SSH213	<i>S. ghanaensis</i>	AB184662	0.0	91
	<i>S. spectabilis</i>	AB184393	0.0	88
SSH216	<i>Brucella pinnipediae</i>	AM158981	0.0	93
	<i>B. melitensis</i>	AY594215	0.0	93
SYR205	Arsenic resistant soil bacterium	AF308875	0.0	97
SYR107	<i>S. rameus</i>	AJ781379	0.0	99
SHH202	<i>S. malaysiensis</i>	AB249918	0.0	95
SHR103	<i>S. cyaneus</i>	AB184872	0.0	99
SHR106	<i>S. cyaneus</i>	AB184872	0.0	97

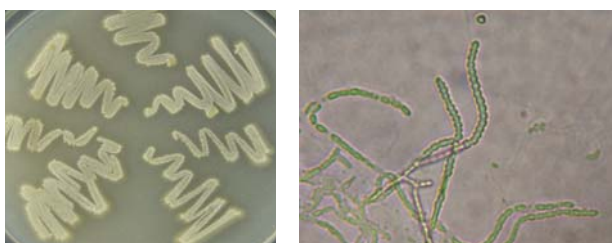
ตารางที่ 4.36 แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคของงุ่นที่เกิดจากเชื้อราเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของ *S. cellulosa* (SC), *S. globisporus* (SG), *S. aureverticillatus* (SA), *S. gancidicus* (SGa), *S. ghanaensis* (SGh), *S. spectabilis* (SS), *S. chattanoogensis* (SCh), *S. noboritoensis* (SN), *S. rameus* (SR), *S. malaysiensis* (SM), *S. cyaneus* (SCy) (Williams, Sharpe, and Holt, 1989)

Property	SSR 203	SC	SSR 107	SG	SSH 209	SA	SSH 211	SGa	SSH 213	SGh	SS	SSH 216	SCh	SYR 205	SN	SYR 107	SR	SHH 202	SM	SHR 103	SHR 106	SCy
Spore chain rectiflexibiles	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+		+	+	-	-	-	-	-	-	-
Spore chain spirales	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Diffusible pigment produced	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Utilization of																						
D-glucose	+	ND	+	ND	+	ND	+	+	+	ND	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	+	ND
Fructose	+	ND	+	ND	+	ND	-	+	+	ND	ND	+		+	ND	+	+	+	ND	-	-	ND
Manitol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Xylose	+	ND	+	ND	+	ND	+	+	+	ND	ND	+	ND	+	ND	+	+	+	ND	-	+	ND
Casein test	-	ND	-	ND	-	ND	+	ND	+	ND	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	+	-	-	ND
Gelatin test	-	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	ND	-	ND	-	ND	-	ND	+	ND	+	+	ND
Growth at																						
4°C	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	-	ND
10°C	+	ND	+	ND	+	ND	-	ND	-	ND	ND	+	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	-	ND
37°C	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	+	ND
45°C	+	+	-	-	-	-	+	ND	+	ND	-	-	-	-	-	+	ND	-	ND	-	-	-
pH																						
4	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	-	ND
5	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	ND	+	ND	-	ND	+	ND	+	ND	+	+	ND
7	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	+	+	+	ND
9	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+	+	ND
NaCl tolerance (%w/v)																						
4	+		+	ND	-	ND	+	ND	+	ND	ND	+	ND	-	ND	+	ND	-	ND	+	+	ND
7	+	+	+	+	-	-	+	ND	+	+	-	+	+	-	-	+	ND	-	-	+	+	-

+ = positive, - = negative, ND = no data



รูปที่ 4.16 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSR203 ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. cellulosa*



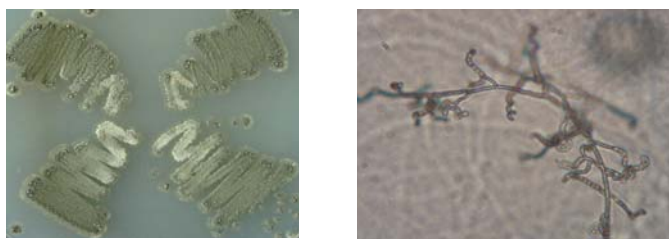
รูปที่ 4.17 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSR107 ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. globisporus*



รูปที่ 4.18 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSH209 ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. aureovercillatus*



รูปที่ 4.19 ลักษณะ โคลินีและสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSH211 ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. gancidicus*



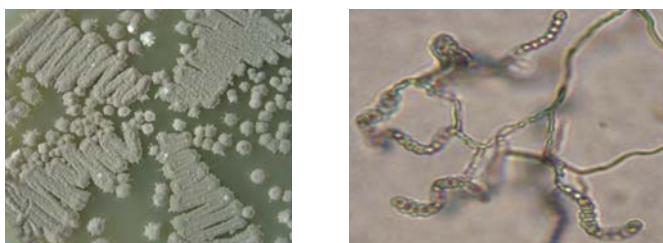
รูปที่ 4.20 ลักษณะ โคลินีและสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSH213 ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. ghanaensis*



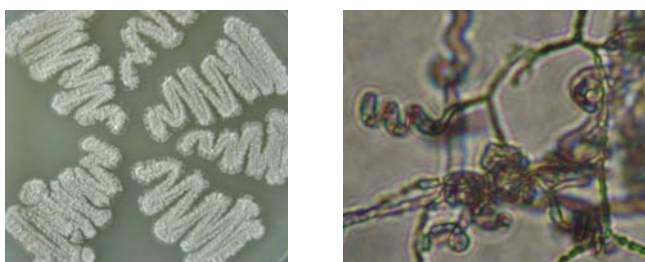
รูปที่ 4.21 ลักษณะ โคลินีและสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSH216 ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. chattanoogensis*



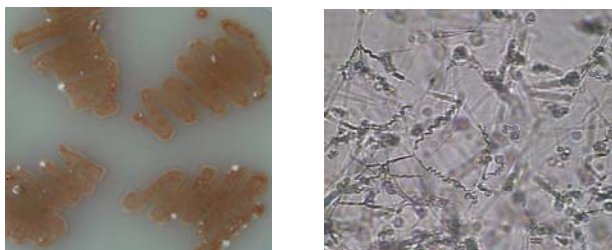
รูปที่ 4.22 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SYR205 ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. noboritoensis*



รูปที่ 4.23 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SYR107 ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. rameus*



รูปที่ 4.24 ลักษณะโคโลนีและสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SHH202 ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. malaysiensis*



รูปที่ 4.25 ลักษณะ โคลินี้และสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SHR103 ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. cyaneus*



รูปที่ 4.26 ลักษณะ โคลินี้และสายสปอร์ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SHR106 ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *S. cyaneus*

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. จากดินในแหล่งปลูกองุ่นในเขต จังหวัดนครราชสีมา และอุบลราชธานี นำมาทดสอบประสิทธิภาพ และศึกษากลไกในการควบคุม เชื้อราสาเหตุโรคน้ำค้ำง สแคบ และราสนิมในองุ่นในสภาพห้องปฏิบัติการ จนถึงระยะบูนิดของ เชื้อที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคขององุ่นสามารถสรุปผลการศึกษาทดลองได้ดังนี้

5.1 การแยกเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. จากดิน

5.1.1 การแยกเชื้อ *Bacillus* spp.

สามารถแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ได้ 55 ไอโซเลตจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี จากแปลงที่ไม่มีอาการระบาดของโรค จำนวน 24 ไอโซเลต จากแปลงที่มีการระบาดของ โรคจำนวน 31 ไอโซเลต และ 80 ไอโซเลตจากอำเภอปากช่อง โดย 53 ไอโซเลตได้จากแปลงที่ ไม่มีอาการระบาดของโรค และ 27 ไอโซเลต จากแปลงที่มีการระบาดของโรค การแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ในแต่ละสภาพแปลงปลูกสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทุกแหล่งและมีความ หลากหลาย เนื่องจากเชื้อ *Bacillus* spp. มักพบทั่วไปในธรรมชาติ ทุกสภาพแวดล้อม เพราะสปอร์ที่ แบคทีเรียสร้างทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันทำให้ จำนวนและชนิดของ *Bacillus* spp. มีความหลากหลาย จากการแยกเชื้อ *Bacillus* spp. โดยวิธีการนำ มาผ่านความร้อนโดยการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10-20 นาที หรือที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นั้นทำให้แยกเชื้อ *Bacillus* spp. ได้เฉพาะที่อยู่ในระยะที่สร้างสปอร์เท่านั้น เนื่องจาก สามารถทนความร้อนสูงได้ ในขณะที่ระยะ vegetative cell ของเชื้อจะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 70 องศา เซลเซียส นาน 10 นาทีขึ้นไป วิธีการดังกล่าวนี้อาจทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีอยู่ ทั้งหมดได้ สำหรับจำนวนเชื้อที่แยกได้หากพิจารณาจากแปลงที่มีและไม่มีอาการระบาดของโรคของ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีแล้วจะเห็นว่ามีความแตกต่างกันน้อยมาก เมื่อเทียบกับแปลง ของเกษตรกรในอำเภอปากช่อง ที่พบเชื้อ *Bacillus* spp. มากกว่าเกือบสองเท่าในแปลงที่มีการ ควบคุมโรค (ไม่มีอาการระบาดของโรค) เหตุที่เป็นเช่นนั้นอาจเป็นเพราะความแตกต่างของชนิดดินที่ ใช้ปลูก คือดินในแปลงมหาวิทยาลัยเป็นดินชุดลพบุรี ลักษณะดินเป็นดินตะกอนเหนียวจัด ระบาย น้ำเร็ว ขณะที่ดินอำเภอปากช่องเป็นดินชุดปากช่อง ดินมีลักษณะร่วนปนทราย มีความอุดมสมบูรณ์ สูง ระบายน้ำดี อีกทั้งความเป็นกรด-ด่างของดิน ซึ่งมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในดิน

โดยมุกดา สุขสวัสดิ์ (2544) กล่าวว่าไว้ว่าระดับ pH ของดินมีผลกระทบต่อกิจกรรมและปริมาณของ จุลินทรีย์ในดิน เช่น แบคทีเรียทำงานได้ดีเมื่อดินมีระดับ pH ใกล้เคียงเป็นกรดอ่อนหรือเป็นกลาง และ เมื่อดินเป็นกรดมากขึ้นกิจกรรมของจุลินทรีย์จะน้อยลงตามลำดับ และ Priest (1989) อ้างถึงใน Rosovitz *et al.*, (1998) พบว่า *Bacillus* spp. ที่พบจะแตกต่างกันตามชนิดของดิน เช่น *B. subtilis*, *B. lichemiformis* และ *B. cereus* ไม่ต้องการสารประกอบในอาหารมากนัก สามารถพบได้ในดินที่มีแร่ ธาตุต่ำ *B. polymyxa* และ *B. azotofixans* พบในดินรอบ ๆ รากพืชที่มีธาตุอาหาร ส่วน *B. macerans* และ *B. circulans* ต้องการสารประกอบอาหารที่ซับซ้อนและพบในเศษซากพืชที่ย่อยสลาย นอกจากนี้ เหตุผลดังกล่าวแล้วความแตกต่างของจำนวนเชื้อที่แยกได้อาจเกิดจากวิธีการและชนิดของสารเคมีที่ใช้ ในแปลงมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งมีการใช้สารเคมีตามคำแนะนำของนักวิชาการและ ใช้เท่าที่จำเป็น ในขณะที่แปลงของเกษตรกรใช้สารเคมีพรวนพรวนมากกว่าและอาจใช้ชนิดที่ไม่ถูกต้องกับโรค การใช้สารเคมีในลักษณะดังกล่าวอาจส่งผลในการยับยั้งเชื้อที่เป็นปฏิปักษ์กับ *Bacillus* spp. ในดิน ทำให้แปลงที่ไม่มีการระบาดของโรค เนื่องจากมีการใช้สารกำจัดเชื้อราบ่อยครั้งมากกว่าสามารถ ตรวจพบจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. ได้มากกว่า การใช้สารกำจัดศัตรูพืชต่าง ๆ ที่ใช้กับพืชและดิน แม้ว่าจะสามารถควบคุมศัตรูพืช แต่อาจจะมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในดินได้ อย่างเช่น การใช้สาร กำจัดวัชพืชจำพวก 6, 7-dihydrodipyrido (1, 2-a : 2'-c) pyrazinedium (diquat) และ 4-hydroxy-3, 5-diiodobenzonitrile (ioxynil) ที่ระดับความเข้มข้น 25 µg/ml, 1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium (paraquat) ที่ระดับความเข้มข้น 50 µg/ml และ pentachlorophenol (PCP) ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/ml มีผลในการยับยั้งเชื้อ *Erwinia carotovora* ส่วนเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ถูกยับยั้งโดย สารจำพวก paraquat และ pentachlorophenol ที่ระดับความเข้มข้น 25 µg/ml และ 4-amino-3, 5, 6-trichloropicolinic acid (picloram) ที่ระดับความเข้มข้น 50 µg/ml แต่จะถูกกระตุ้นด้วยสารจำพวก 4-(methylsulfonyl)-2, 6-dinitro-N, N-dipropylaniline (nitralin) ที่ระดับความเข้มข้น 25 µg/ml ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* spp. ถูกยับยั้งโดยสารจำพวก diquat ที่ระดับความเข้มข้น 25 µg/ml, ioxynil ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/ml, paraquat และ pentachlorophenol ที่ระดับความเข้มข้น 5 µg/ml (Breazeale and Camper, 1972)

5.1.2 การแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

การแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากดินที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิสูง (120 องศาเซลเซียส) นาน 1-2 ชั่วโมงนั้น มีสาเหตุเนื่องจากคู่อุปมีปัญหาในการควบคุมอุณหภูมิและเวลา ซึ่ง ปกติใช้เวลาเพียง 5-10 นาที เพื่อให้ดินแห้งเท่านั้น สามารถแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ได้จำนวน น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับดินที่ทำให้แห้งโดยการฝังลมที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) ในขณะที่ดินจากแปลงคุณสมบัติไม่พบเลย อาจมีสาเหตุจากอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่ใช้อบใช้ เวลานานเกินไป วิธีการแยกเชื้อโดยวิธีดังกล่าวจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้แยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

การใช้อุณหภูมิสูงอบดินก่อนนำมาแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ใช้หลักการที่ว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ส่วนใหญ่สามารถเจริญอยู่ในกองปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิสูงได้ การกระทำดังกล่าวจึงช่วยฆ่าเชื้ออื่น ๆ ที่ไม่ทนความร้อนและช่วยคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพทนความร้อนและความแห้ง ซึ่งเป็นสภาพที่เชื้อจะต้องประสบเมื่อนำไปใช้เป็นเชื้อปฏิปักษ์ ถึงแม้ว่าการใช้อุณหภูมิสูงสามารถลดปริมาณเชื้อปนเปื้อนอื่นได้มาก แต่ก็ทำให้จำนวนของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ลดลง โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่สูงถึง 40-70 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปวิธีการที่ใช้แยกเชื้อ *Streptomyces* spp. มีหลายวิธีการขึ้นอยู่กับตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อ ตัวอย่างเช่น อนันต์ วงเจริญ (2547) พบว่าการฝังตัวอย่างดินให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ไม่ทนต่อความแห้ง หลังจากนั้นนำดินไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และแยกเชื้อในอาหารที่เป็น semi-selective media เช่น AGMA ผสม cycloheximide ปริมาณ 50 ppm ใช้แยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ในปุ๋ยหมักได้ดี ส่วนวชิร ใจภักดี (2544) แยกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากตัวอย่างดินจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย บริเวณป่าชายเลน รวม 8 แหล่ง โดยการนำตัวอย่างดินสิ่งลมให้แห้ง 2-3 วัน นำตัวอย่างดินมาแขวนลอยในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และแยกเชื้อในอาหาร SCA, SCAN, M3, RH และ HV พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถเจริญได้ทั้งหมด เชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เนื่องจากมีการเจริญเป็นเส้นใยและสามารถสร้างสปอร์ได้ ซึ่งสปอร์เป็นโครงสร้างที่สามารถคงอยู่ได้ในดินเป็นเวลานาน ได้มีการนำตัวอย่างดินที่เก็บไว้นานถึง 70 ปี (Morita, 1985 อ้างถึงในเทพิน เชนันทรรัตน์, 2546) มาเพาะเลี้ยง พบว่า *Streptomyces* spp. ยังสามารถเจริญได้ สปอร์สามารถคงอยู่ได้ในสภาวะที่มีสารอาหารและน้ำต่ำ ในขณะที่เส้นใยจะไม่สามารถทนสภาวะแห้งแล้งได้ (Karagouni *et al.*, 1993 อ้างถึงในเทพิน เชนันทรรัตน์, 2546) *Streptomyces* spp. อาศัยในชั้นผิวหน้าดินได้ดีและสามารถที่จะแข่งขันกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่อาศัยอยู่ชั้นผิวหน้าดินได้ดี ข้อได้เปรียบของ *Streptomyces* spp. คือ สามารถแพร่กระจายได้ในดินที่แห้งเนื่องจากการเจริญเป็นเส้นใย แต่ในดินที่เปียกแบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้ดีกว่า (Milus and Rothrock, 1993 อ้างถึงในเทพิน เชนันทรรัตน์, 2546)

5.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชเบื้องต้น

5.2.1 เชื้อ *Bacillus* spp.

เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากดินทั้งหมด 135 ไอโซเลต มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum*, *C. ampelinum* และ *S. rolfsii* โดยวิธี dual culture method พบเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์จำนวน 61 ไอโซเลต โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง 5 อันดับแรกในการยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้แก่ ไอโซเลต BSN502, BSD604, BSN501, BSD502 และ BSN603 ยับยั้งเชื้อ *C. ampelinum* ได้แก่ ไอโซเลต BSD101, BSN603, BSN501, BSD604 และ BSD406 และยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้แก่ ไอโซเลต BSD203, BSD405, BSN304, BSN201 และ BSN301 โดยเชื้อ *Bacillus* spp. ส่วนมากสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง แต่บางไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อ *P. aphanidermatum* และ *C. ampelinum* ได้ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ไอโซเลต BSD604 และ BSN501 ในขณะที่ไม่พบไอโซเลตใดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด เหตุที่เป็นเช่นนั้นอาจจะเป็นเพราะว่าสารปฏิชีวนะที่เชื้อ *Bacillus* spp. สร้างขึ้นมานั้นมีผลยับยั้งได้ดีกับเชื้อเฉพาะชนิด ดังรายงานของสุปรียา หมั่นกุล (2547) ได้แยกเชื้อ *Bacillus* spp. จากธรรมชาติจำนวน 440 ไอโซเลต มีเพียง 69 ไอโซเลต ที่มีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชเชิงชีววิธีได้ บางไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด ทั้งเชื้อสาเหตุโรคในดิน เช่นเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *S. rolfsii* และเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เชื้อสาเหตุโรคไม้ผลและโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว เช่นเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นต้น โดยพบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. มีกลไกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายแบบ บางไอโซเลตมีความสามารถครอบครองพื้นที่ ในขณะที่บางไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยการสร้างสารปฏิชีวนะโดยสังเกตเห็นวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อราและแบคทีเรียปฏิปักษ์ อย่างเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ AP01 สามารถเข้าครอบครองพื้นที่ก่อนการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium roseum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวและโคนเน่าของกล้วยไม้ และเชื้อ *Pythium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้มโอ (มณจันทร์ เมฆธน, 2536) ในขณะที่ สุมาลี เหลืองสกุลและคณะ (2542) รายงานว่าการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยเชื้อ *Bacillus* spp. น่าจะเกิดจากการสร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rosovitz et al., (1998) หรือเกิดจากการสร้าง biosurfactant (Edwards and Seddon, 1992) เอนไซม์ไคตินเนส หรือเอนไซม์อื่น ๆ (Frandsberg and Schnurer, 1994) ซึ่งสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Bacillus* spp. ทำให้เส้นใยเชื้อรา *R. solani* มีลักษณะผิดปกติ และผนังเซลล์ของเส้นใยววมมีผนังหนาขึ้น (สุปรียา หมั่นกุล, 2547)

5.2.2 เชื้อ *Streptomyces* spp.

เมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกจากดินทั้งหมด 109 ไอโซเลต มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum*, *C. ampelinum* และ *S. rolfsii* โดยวิธี dual culture method พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์มีจำนวน 73 โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรกในการยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้แก่ SYR107, SHR103, SYR205, SHH202 และ SSR107 ยับยั้งเชื้อ *C. ampelinum* ได้แก่ SHH202, SSR203, SYR107, SHR106 และ SSH213 ยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้แก่ SYR205, SSH209, SSH216, SSH213 และ SSH211 โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. บางไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อ *P. aphanidermatum* และ *C. ampelinum* ได้แก่ ไอโซเลต SYR107 และ SHH202 ยับยั้ง *P. aphanidermatum* และ *S. rolfsii* ได้แก่ ไอโซเลต SYR205 ยับยั้ง *C. ampelinum* และ *S. rolfsii* ได้แก่ ไอโซเลต SSH213 ในขณะที่ไม่พบไอโซเลตใดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด ความแตกต่างในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคอาจมีสาเหตุจากชนิดของสารปฏิชีวนะที่เชื้อผลิตได้ และปลดปล่อยออกมา นอกจากนั้นยังพบด้วยว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. aphanidermatum* และ *S. rolfsii* อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับความสามารถในการยับยั้ง *C. ampelinum* เนื่องจากเชื้อ *Streptomyces* spp. มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าเชื้อราทั้งสองชนิดดังกล่าว ทำให้เชื้อ *Streptomyces* spp. ถูกปกคลุมด้วยเชื้อที่ใช้ทดสอบทำให้เชื้อ *Streptomyces* spp. ไม่สามารถแสดงศักยภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ได้ทางการแก้ปัญหาในการครั้งนี้คือควรทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. ในจานอาหารทดสอบรวม 5-7 วัน ก่อนทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคในด้านตรงข้าม ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมกับเชื้อราที่มีการเจริญเติบโตเร็ว เช่น *Pythium* sp. และ *Sclerotium* sp.

5.3 การทดสอบผลกระทบของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ต่อใบองุ่น

จากทดสอบผลกระทบของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ต่อใบองุ่น ซึ่งทำการทดสอบก่อนนำไปใช้ในควบคุมโรค พบว่าส่วนของ culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เลี้ยงใน NB สูตรปกติ มีผลกระทบต่อใบองุ่น โดยทำให้เกิดแผลสีน้ำตาลเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 1-2 วัน ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจาก culture filtrate มีความเข้มข้นมากเกินไป เมื่อลดความเข้มข้นของอาหารเป็น 1/4 เท่า ก่อนการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ทำให้ได้ culture filtrate ที่ไม่เป็นพิษต่อใบองุ่น เพราะอาหารที่มีความเข้มข้นสูงมีผลทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตเร็ว และมีการสร้างสารปฏิชีวนะหรือสาร secondary metabolite อื่น ๆ ที่อาจเป็นพิษต่อใบองุ่นมากขึ้น แต่เมื่อลดความเข้มข้นของอาหารลดข่มส่งผลให้เชื้อมีการเจริญช้าลง การสร้างสารดังกล่าวก็จะน้อยลงไปด้วย ทำให้ได้ culture filtrate ที่มีความเข้มข้นน้อยลงจนไม่เป็นพิษต่อใบองุ่น

5.4 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในรูป cell suspensions และ culture filtrate ในการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และ ราสนิมในองุ่น

5.4.1 เชื้อ *Bacillus* spp.

รูปแบบของเชื้อ *Bacillus* spp. ในช่วงระยะเวลาการเจริญที่แตกต่างกันมีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่นได้แตกต่างกันไป แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Bacillus* spp. แม้จะอยู่ในรูปแบบเดียวกัน แต่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อต่างกันส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคต่างกัน ยกเว้นไอโซเลต BSN301 ทั้งสองระยะเวลาการเจริญของเชื้อที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคราสนิมได้ดี และมีประสิทธิภาพมากในช่วง stationary phase คล้ายกันกับเชื้อ *B. subtilis* strain KS03 ในรูปของ cell ที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อรา ได้แก่ iturinA และ lipopeptide ได้ดีในช่วงระยะใกล้สุดท้ายของระยะ stationary phase (Cho, Lee, Cha, Kim, and Shin, 2003) โดย Manjula, Kishore and Podile (2004) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* AF 1 ในรูปของ fresh cell สามารถสร้าง chitinases ในการควบคุมโรคราสนิมของถั่วลิสง ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Puccinia arachidis* โดยการยับยั้งการงอกของ uredospore ได้ 90.2 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งเชื้อ *B. subtilis* เข้าไปเจริญและทำลายสปอร์ของเชื้อราสนิมในพืชพวกไม้ดอก (Rytter, Lukezic, Craig and Moorman, 1989) และสามารถลดความรุนแรงของโรคราสนิมในข้าวสาลีได้ถึง 57.14 เปอร์เซ็นต์ (Eldoksch, Atteia and Abdel-Moity, 2001) fresh cell ของเชื้อ *B. subtilis* AF ในระยะ log phase มีผลทำให้พัฒนาการของโรคราสนิมลดลง (Manjula, Kishore and Podile, 2004)

ส่วนในรูปของ culture filtrate พบว่าไอโซเลต BSD603, BSD101 และ BSN201 ทั้งสองระยะเวลาการเจริญเติบโตสามารถยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมได้ดี ซึ่งแสดงถึงความคงตัวของ culture filtrate และประสิทธิภาพของ culture filtrate จะเพิ่มขึ้นเมื่อนำมาผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง และสแคบได้ดีขึ้น อีกทั้ง culture filtrate มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคที่ดีกว่าในรูปของ cell suspensions ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Manjula, Kishore and Podile (2004) ที่พบว่า *B. subtilis* AF 1 ในรูปของ cell-free culture filtrate ควบคุมโรคราสนิมของถั่วลิสง ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *P. arachidis* โดยมีผลในการยับยั้งการงอกของ uredospore ได้ถึง 96.0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ในรูปของ fresh cell ยับยั้งได้เพียง 90.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกลไกในการควบคุมโรคส่วนใหญ่ของเชื้อ *Bacillus* spp. น่าจะเกิดจากเชื้อมีการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น bacillomycin, iturin, mycosubtilin, bacilysin, fengymycin และ mycobacillin (Shoda, 2000) หรือเอนไซม์แล้วปลดปล่อยออกมาในอาหารเหลวสาเหตุหนึ่งของการใช้ cell suspensions ได้ผลไม่ดีเท่า culture filtrate เนื่องจากการฉีดพ่น cell

suspensions ลงบนใบพืชนั้น เชื้อปฏิภักษ์ไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ทำให้มีการสร้างเอนไซม์ หรือสารปฏิชีวนะได้น้อยจนถึงไม่ได้เลย เนื่องจากว่าเชื้อปฏิภักษ์ไม่มีอาหารสำหรับการเจริญเติบโต ดังรายงานของ Schmidt, Lorenz, Wolf and Jager (2001) การผสมสารเสริม ได้แก่ peptone และ methylcellulose ผสมกับ cell suspensions ของเชื้อ *B. subtilis* ก่อนฉีดพ่นบน grape wood 24 ชั่วโมง ก่อนทำการปลูกเชื้อ *Eutypa lata* สาเหตุโรค dieback พบว่าเชื้อ *B. subtilis* มีการเพิ่มจำนวน และมีการสร้างสารต้านทานเชื้อราเพิ่มมากขึ้นกว่าการฉีดพ่นด้วยเชื้อ *B. subtilis* เพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kishore and Pande (2007) การใช้ cell suspensions ของเชื้อ *B. cereus* CRS7 ผสมสารเสริม ได้แก่ colloidal chitin ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ก่อนการฉีดพ่นบนใบ chickpea ในการควบคุม Botrytis gray mold (BGM) สามารถลดความรุนแรงของโรค ได้ดีกว่าการใช้เชื้อ *B. cereus* CRS7 หรือ colloidal chitin เพียงอย่างเดียว และวิธีการควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) การเจริญของเชื้อในการทดลองครั้งนี้พบว่า เมื่อนำไปฉีดพ่นบนใบ พบว่าผิวของใบอ่อนจะถูกเคลือบมีลักษณะเป็นมันวาว เมื่อทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคเป็นไปได้ที่เชื้อไม่สามารถเข้าทำลายใบได้ หรือได้ในปริมาณที่ลดน้อยลง และเมื่อทำการทดสอบเบื้องต้นในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถสร้างเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase ทำหน้าที่ย่อยสลาย glucan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช และ protease ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างโดยเชื้อสาเหตุโรคพืชจึงส่งผลให้พัฒนาการของโรคลดลง ซึ่งปริมาณเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเชื้อ *Bacillus* spp. อยู่ในระยะ stationary phase ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงกลไกในการยับยั้งการเกิดโรคของเชื้อ *Bacillus* spp. ว่าอยู่ในรูปแบบใด และช่วงระยะเวลาการเจริญที่เชื้อมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีที่สุดเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

5.4.2 เชื้อ *Streptomyces* spp.

สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. ในรูป cell suspensions พบว่าแต่ละไอโซเลตและระยะเวลาการเจริญของเชื้อสามารถยับยั้งการเกิดโรคแตกต่างกัน เมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ พบว่าทุกไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์ β -1, 3-1, 4-glucanase และ chitinase ได้ นอกจากนี้ *Streptomyces* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น tetracyclines (Hansen, Ferrari, Sorensen, Veal and Sorensen, 2001) hygromycin (Uyeda, Mizukami, Yokomizo, and Suzuki, 2001) และ bafilomycin (Frandsberg, Petersson, Lundgren, and Schnurer, 2000) เป็นต้น โดยไอโซเลต SHR103, SSH216 และ SSH211 สามารถยับยั้งการเกิดโรคเพียงชนิดเดียว ในขณะที่ไอโซเลต SHH202 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 2 ชนิด คือโรคราน้ำค้าง และสแคบ และประสิทธิภาพของเชื้อขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเจริญของเชื้อ โดยระยะ log phase สามารถยับยั้งโรคได้ถึง 2 ชนิด ขณะที่ระยะ stationary phase สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้เพียง 1 ชนิด ซึ่งแสดงว่าช่วงระยะเวลาการเจริญของเชื้อมีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ ชนิด และปริมาณที่ผลิต

ส่วนในรูปของ culture filtrate ในระยะ log phase และ stationary phase สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้แตกต่างกัน มีเพียงไอโซเลต SYR107 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 2 ชนิด คือ โรคราน้ำค้าง และสแคบ ความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรดยังขึ้นกับอายุของเชื้อปฏิปักษ์ซึ่งมีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ และเมื่อนำ culture filtrate มาผ่านความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 0, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในการยับยั้งการเกิดโรคทั้ง 3 ชนิด (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

การใช้ cell suspensions และ culture filtrate ของเชื้อ *Streptomyces* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคในระดับที่ใกล้เคียงกัน แต่ถ้าอยู่ในรูปของ culture filtrate จะมีประสิทธิภาพมากกว่า อาจมีสาเหตุจากการใช้ cell suspensions จัดฟันบนใบโดยไม่มีอาหารให้กับเชื้อ ทำให้เชื้อปฏิปักษ์ไม่สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ ทำให้การสร้างสารปฏิชีวนะน้อยลงไปด้วย แต่เมื่อเปรียบเทียบการใช้ cell suspensions ของเชื้อ *Bacillus* spp. กับ *Streptomyces* spp. ความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่า นั้นเป็นเพราะว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. มีลักษณะคล้ายเส้นใยซึ่งสามารถทนในสภาพแห้งได้ดีกว่า

5.4.3 เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.

ในการยับยั้งการเกิดโรคแต่ละชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. พบว่าส่วนใหญ่ประกอบไปด้วย 2 ไอโซเลต ซึ่งมีช่วงระยะเวลาการเจริญที่แตกต่างกัน และในรูปแบบที่แตกต่างกัน หรือบางไอโซเลตอยู่ในรูปแบบเดียวกัน แต่ช่วงอายุต่างกัน สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้เหมือนกันหรือต่างกันก็ได้ ในขณะที่บางไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคเดียวกันแต่ต่างกันในรูปแบบของเชื้อ เช่น ไอโซเลต SSH216 และ SSH211 และพบว่าไม่มีไอโซเลตใดไอโซเลตหนึ่งที่อยู่ในรูปของ cell suspensions และ culture filtrate ในสองระยะการเจริญเติบโตที่จะสามารถยับยั้งการเกิดโรคทั้ง 3 ชนิดได้ ซึ่งเป็นเครื่องชี้ให้เห็นถึงความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเกิดโรค การนำไปใช้ประโยชน์ต้องทราบถึงช่วงอายุการเจริญของเชื้อ และรูปแบบของเชื้อที่จะนำไปใช้ต้องเหมาะสมกับโรคที่จะนำไปควบคุมด้วย

5.5 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. ร่วมกับ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น

เมื่อนำไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเกิดโรคของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. มาใช้ร่วมกันในการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิม ในการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง ในรูปของ cell suspensions พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่า รองลงมาคือการใช้ร่วมกัน ขณะที่อยู่ในรูปของ culture filtrate การใช้ *Bacillus* spp. ร่วมกับ *Streptomyces* spp. สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์เพียงชนิดเดียว แต่การ

ใช้ *Streptomyces* spp. เพียงอย่างเดียวสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคสแคบ ในรูปของ cell suspensions ในระยะ log phase การใช้ *Streptomyces* spp. สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด รองลงมาคือการใช้ร่วมกัน ส่วนในระยะ stationary phase การใช้ร่วมกันสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด รองลงมาคือการใช้ *Streptomyces* spp. ส่วนในรูปของ culture filtrate ในระยะ log phase การใช้ร่วมกัน และการใช้ *Streptomyces* spp. สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุดในระยะ stationary phase การใช้ *Streptomyces* spp. สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด รองลงมาคือการใช้ร่วมกัน ส่วนในการควบคุมโรคราสนิม ในรูปของ cell suspensions ในระยะ log phase การใช้ *Streptomyces* spp. และการใช้ร่วมกันมีความสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีไม่แตกต่างกัน แต่เมื่ออยู่ในระยะ stationary phase การใช้ *Streptomyces* spp. สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดี รองลงมาคือการใช้ *Bacillus* spp. ในรูปของ culture filtrate การใช้ร่วมกันสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด รองลงมาคือการใช้ *Bacillus* spp.

เมื่อนำส่วนของ cell suspensions มาใช้ร่วมกัน พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคมีน้อยกว่าการใช้ *Bacillus* spp. หรือ *Streptomyces* spp. เพียงอย่างเดียว อาจเนื่องจากความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองแตกต่างกัน โดยเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถเจริญได้รวดเร็วกว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. จึงสามารถแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีกว่า นอกจากนี้การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคยังมีผลต่อความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ หากเชื้อราสาเหตุโรคมีการเจริญที่ช้า ทำให้เชื้อปฏิปักษ์ที่เจริญช้า เช่น *Streptomyces* spp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะและปลดปล่อยออกมายับยั้งการเกิดโรคได้ ดังเช่นในการยับยั้งการเกิดโรคสแคบ และราสนิม การใช้ *Streptomyces* spp. เพียงอย่างเดียวสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้ *Bacillus* spp. ในขณะที่เมื่อนำส่วนของ culture filtrate ทั้งสองชนิดมาใช้ร่วมกัน สามารถยับยั้งการเกิดโรคทั้ง 3 ชนิดได้ดี และสามารถยับยั้งการเกิดโรคสแคบได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำ culture filtrate ของ *Bacillus* ไอโซเลต BSD101 ใช้ร่วมกับ SHH202 อาจเนื่องจาก culture filtrate เป็นแหล่งรวมสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ ที่เชื้อทั้งสองปลดปล่อยออกมาในขณะเลี้ยง เมื่อนำมาใช้จึงมีประสิทธิผลการยับยั้งการเกิดโรคได้สูงสุด รองลงมาคือการใช้ *Streptomyces* spp. เนื่องจากเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่าเชื้อ *Bacillus* spp.

จากการทดสอบการใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ร่วมกับ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคทั้ง 3 ชนิดนั้น เป็นการนำไอโซเลตที่ดีที่สุดในการยับยั้งการเกิดโรคแต่ละชนิด มาใช้ร่วมกัน เพื่อดูว่าการใช้เชื้อร่วมกันจะส่งเสริมประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคหรือไม่ หรือว่าเชื้อทั้งสองชนิดจะเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน จากการทดสอบดังกล่าวเป็นการยับยั้งการเกิดโรคใดโรคหนึ่งโดยเฉพาะที่เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ควบคุมได้ดีที่สุด ทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคชนิดหนึ่งจะสามารถยับยั้งการเกิดโรคอีกชนิดหนึ่งได้

หรือไม่ ซึ่งแนวทางปฏิบัติต่อไปควรมีการใช้เชื้อปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดมาใช้ร่วมกันในการยับยั้งโรค ทั้ง 3 ชนิดพร้อมกัน เพราะในสภาพแปลงปลูกการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในอุ้งนี้ มักจะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน หากสามารถทำได้จะเป็นการลดความยุ่งยากในการใช้เชื้อปฏิปักษ์หลายชนิด และลดปริมาณการใช้เชื้อปฏิปักษ์ได้อีกด้วย

5.6 การระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.

5.6.1 เชื้อ *Bacillus* spp.

การระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีค่อนข้างสูง ดังรายงานของ Rosovits *et al.* (1998) พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. มีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยากว้าง ลักษณะโคโลนีมีความแปรปรวนมากขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม คุณภาพ และปริมาณของอาหารเลี้ยง อนุโคโลนี และจำนวนโคโลนี ตลอดจนระยะเวลาการเจริญของเซลล์ก็มีผลต่อลักษณะโคโลนี ดังนั้นจึงเป็นการยากในการแยกชนิดด้วยลักษณะโคโลนี อย่างไรก็ตามในสภาพแวดล้อมเดียวกันลักษณะโคโลนีสามารถใช้ในการจำแนกได้ จากการทดลองสามารถแบ่งลักษณะโคโลนีได้เป็น 5 กลุ่ม นอกจากนี้ลักษณะของสปอร์และตำแหน่งของสปอร์ยังใช้ในการจัดแบ่งกลุ่มได้ ซึ่งเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 13 ไอโซเลต สร้างสปอร์ได้ โดยตำแหน่งของสปอร์ส่วนใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ เซลล์ไม่โป่งออก บางไอโซเลตเซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลม เช่น ไอโซเลต BSN502 และ BSN501 เมื่อนำไปใช้ประกอบกับข้อมูลทางชีวเคมี แต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างในการใช้น้ำตาล และอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ สำหรับในเรื่องอุณหภูมิในการเจริญของเชื้อ เนื่องจากเป็นเชื้อที่แยกได้มีความทนต่ออุณหภูมิสูง ทำให้ในบางไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจมาจากวิธีการแยกและสภาพของแปลงปลูกที่ตั้งอยู่ที่อุณหภูมิสูง อาจทำให้มีความแตกต่างจากเชื้อเปรียบเทียบในการจัดจำแนก เช่น *Bacillus cereus* โดยสามารถจำแนกเชื้อ *Bacillus* spp. 13 ไอโซเลต ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับ *Bacillus* spp. 4 ชนิด คือ *B. subtilis* มีจำนวน 3 ไอโซเลต, *B. firmus* จำนวน 5 ไอโซเลต, *B. pantothenicus* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *B. megaterium* จำนวน 3 ไอโซเลตเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 16S rDNA ของเชื้อ *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลต มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่า *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลต มีความเหมือนกับเชื้อ *B. subtilis* เพียงชนิดเดียว แต่จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี เห็นได้ชัดว่าเชื้อ *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก ซึ่งการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเพียงข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ แต่ไม่สามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ได้ทันที ต้องนำข้อมูลด้านอื่น ๆ มาใช้

ประกอบกันในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อด้วย ทำให้ข้อมูลส่วนนี้ไม่สามารถนำมาระบุชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. ได้ จึงได้ใช้ข้อมูลทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีมาใช้ในการระบุชนิดของเชื้อ อย่างไรก็ตามการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rDNA ก็ยังคงมีประโยชน์ในการเปรียบเทียบเพื่อจัดกลุ่มในระดับชนิดของเชื้อได้

5.6.2 เชื้อ *Streptomyces* spp.

สำหรับการระบุชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเชื้อมีความแตกต่างของสีโคโลนี สปอร์ ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต การทนเค็ม อุณหภูมิ และความเป็นกรด ต่าง ที่สามารถเจริญได้ การสร้าง melanin pigment ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการระบุชนิดของเชื้อ ดังรายงานของ Selman (1967) การศึกษากระบวนการ metabolism สามารถแยกความแตกต่างของแบคทีเรียได้ ได้แก่ ความไวต่อสารปฏิชีวนะ การสร้างรงควัตถุ การสร้าง diffusible pigment การทดสอบความเป็นกรด-ด่าง การเจริญบนแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ การใช้แหล่งไนโตรเจน การย่อยแป้ง การรีดิวซ์ไนเตรท และการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น catalase, chitinase เป็นต้น การเจริญเติบโตในอุณหภูมิต่าง ๆ โดยเมื่อนำลักษณะดังกล่าวมาประกอบกัน สามารถระบุชนิดของ *Streptomyces* spp. ได้ ซึ่งเชื้อ *Streptomyces* spp. แต่ละไอโซเลต มีความเฉพาะเจาะจงต่อการทดสอบ แต่ละไอโซเลตมีการสร้าง aerial mycelium และการสร้างรงควัตถุลงในอาหารแตกต่างกัน บางไอโซเลตมีการสร้าง aerial mycelium น้อยจนถึงไม่มี ทำให้ไม่สามารถเห็นสายสปอร์ได้ ซึ่งอาจเกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เหมาะสม ชนิดของอาหารต่างกันมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* spp. ต่างกัน อย่างเช่นเชื้อ *S. toxytricini* KS3-5 มีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี organic และ synthetic media เป็นส่วนประกอบ เช่นการสร้าง aerial mycelium สีขาวบนอาหาร Czapek, peptone yeast agar, oatmeal agar, potato plug ในขณะที่สร้าง aerial mycelium สีเทาบนน้ำตาลในอาหาร starch agar, YEME สร้างสปอร์ไม่ดีในอาหาร Czapek, minimal actinomycetes medium, peptone agar และ carrot plug ซึ่งลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันนี้อาจส่งผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะได้ (Wu and Chen, 1995) ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญเติบโตรวมทั้งการสร้าง aerial mycelium ซึ่งมีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ และ secondary metabolites เช่น เชื้อ *S. galbus* subsp. *achromogenes* 695 มีลักษณะโคโลนีที่หลากหลายถึง 4 แบบ แต่โคโลนีที่มีความหนาแน่นของ aerial mycelium มาก มีการสร้างสารปฏิชีวนะปริมาณสูงกว่าลักษณะโคโลนีแบบอื่น 20 เปอร์เซ็นต์ (Yocheva, 1999) ทำนองเดียวกับ *S. coelicolor* ผลิตสารปฏิชีวนะ actinorhodin ได้ เมื่อมีการสร้าง aerial mycelium (Brian, Riggle, Santos, and Champness, 1996) การจัดจำแนกเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยนำข้อมูล นิวคลีโอไทด์ในช่วง 16S rDNA ของเชื้อ *Streptomyces* spp. แต่ละไอโซเลต มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSR107, SSH209, SSH211, SSH213, SYR107, SHH202, SHR103 และ SHR106 มีความเหมือนกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *S. globisporus*, *S. aureoverticillatus*, *S. gancidicus*, *S. ghanaensis* (*S. spectabilis*), *S. rameus*, *S. malaysiensis*, *S. cyaneus* และ *S. cyaneus* ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลต SSR203, SSH216 และ SYR205 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับนิวคลีโอไทด์ของ *Cupriavidus respiraculi* (*C. taiwanensis*), *Brucella pinnipediae* (*B. melitensis*) และ Arsenic resistant soil bacterium ตามลำดับ แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งขัดแย้งกับลักษณะโคโลนีและแกรมของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต ซึ่งมีลักษณะของเชื้อ *Streptomyces* spp. อย่างชัดเจน กรณีดังกล่าวจึงไม่ใช่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในการเปรียบเทียบ เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี มาใช้ร่วมกันในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถแยกลักษณะได้ใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces* spp. 10 ชนิด ได้แก่ *S. globisporus* (SSR107), *S. aureoverticillatus* (SSH209), *S. gancidicus* (SSH211), *S. ghanaensis* (SSH213), *S. rameus* (SYR107), *S. malaysiensis* (SHH202), *S. cyaneus* (SHR103 และ SHR106), *S. cellulosa* (SSR203), *S. noboritoensis* (SYR205) และ *S. chattanoogensis* (SSH216) จากข้อมูลทั้ง 3 ลักษณะมีผลไปในแนวทางเดียวกัน อาจมีคุณสมบัติทางชีวเคมีแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในเรื่องของการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต ดังนั้นการระบุชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยอาศัยข้อมูลทางด้านดีเอ็นเอ สามารถยืนยันชนิดของเชื้อ *Streptomyces* spp. ได้ แต่ต้องอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี ประกอบด้วยเพื่อความแม่นยำยิ่งขึ้น

5.7 การประเมินความสำเร็จของการคัดเลือกเชื้อปฏิบัติเพื่อใช้ในการควบคุมโรคเชื้อรา ในองุ่นและแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

5.7.1 การแยกเชื้อ *Bacillus* spp. และ เชื้อ *Streptomyces* spp.

การคัดแยกเชื้อ *Bacillus* spp. จากดินปลูกองุ่นจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และแปลงของเกษตรกร อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา จากแปลงที่มีและไม่มีการแพร่ระบาดของโรคนั้น เชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเชื้อราในองุ่นทั้ง 3 ชนิด เป็นเชื้อที่แยกจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทั้งสิ้น โดยพบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกจากแปลงที่มีการแพร่ระบาดของโรค สามารถยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง และสแคบได้ดี ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกจากแปลงไม่มีการแพร่ระบาดของโรค สามารถยับยั้งการเกิดโรคราสนิมได้ดี เหตุที่พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเชื้อราในองุ่นเป็นเชื้อที่แยกจากแปลงที่มีการแพร่ระบาดของโรค อาจเกิดจากการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มีการใช้สารเคมีเท่าที่จำเป็น และใช้ในปริมาณที่เหมาะสมกับชนิด

ของโรค ซึ่งแตกต่างจากแปลงของเกษตรกรที่มีการใช้สารเคมีในปริมาณที่มากเกินไปจนความจำเป็นและอาจไม่ถูกต้อง อาจทำให้สารเคมีบางชนิดไปยับยั้งการเจริญของเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อ *Bacillus* spp. ได้

สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. ได้คัดแยกเชื้อจากแหล่งปลูกองุ่น 4 แหล่ง พบเชื้อ *Streptomyces* spp. จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีมากที่สุด รองลงมาคือสวน Holiday, สวนคุณสมยศ และจังหวัดอุบลราชธานี ตามลำดับ โดยเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่คัดแยกจากสวน Holiday ขณะที่เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งโรคราสนิมได้ดี และพบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิสูงก่อนทำการแยกเชื้อมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคทั้ง 3 ชนิดได้ดี

5.7.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. เบื้องต้น

เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพ 5 อันดับแรกในการยับยั้งเชื้อ *P. aphanidermatum*, *C. ampelinum* และ *S. rolfsii* นั้น เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น พบว่าทุกไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคในแต่ละชนิดได้ดีกว่าวิธีการควบคุม แต่อันดับในการยับยั้งการเกิดโรคจะเปลี่ยนไปจากอันดับของการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ทดสอบเบื้องต้น โดยไอโซเลตที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเมื่อมาทดสอบการยับยั้งโรคทั้ง 3 ชนิด บางไอโซเลตมีความสามารถในการยับยั้งโรคน้อยลง ยกเว้น *Bacillus* spp. ไอโซเลต BSN502, BSD101 ที่มี % PIDG สูงในการยับยั้ง *P. aphanidermatum*, *C. ampelinum* ยังคงมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง และสแคบ สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. พบไอโซเลต SYR107 และ SHH202 ที่มี %PIDG สูงในการยับยั้ง *P. aphanidermatum*, *C. ampelinum* ยังคงมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง และสแคบ ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการใช้เชื้อใน class เดียวกันที่สามารถเลี้ยงได้ง่ายเป็นเชื้อทดสอบเบื้องต้นก่อนนำไปใช้ทดสอบกับเชื้อที่เป็น obligate parasite หรือเชื้อเลี้ยงยากช่วยให้งานวิจัยในเรื่องดังกล่าวปฏิบัติได้ง่ายขึ้น

5.7.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น ครั้งนี้เป็นการทดลองในสภาพใบตัด ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคทั้ง 3 ชนิดได้ดีมาก จึงคาดได้ว่าหากนำไปใช้ในสภาพแปลงปลูกน่าจะให้ผลดีเช่นเดียวกัน การทดลองในขั้นตอนนี้ต่อไป

ที่จำเป็นต้องทำ คือ 1) การทดสอบหารูปแบบ วิธีการใช้ และอัตราการใช้ที่เหมาะสม และ 2) การทดสอบผลกระทบของเชื้อปฏิภักษ์ที่มีต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ และสภาพแวดล้อม

รายการอ้างอิง

- กรรณิการ์ เพ็ชรภักตร์ และ อุบล คือประโคน. (2537). โรคสแคบของงุ่นในประเทศไทย ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32 (หน้า 180-189). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กรรณิการ์ เพ็ชรภักตร์ วิรัช ชูบำรุง และอภิรัชต์ สมฤทธิ์. (2544). เชื้อรา *Sphaceloma* spp. สาเหตุโรคสแคบของพืชต่างๆ ในประเทศไทย. ใน รายงานการประชุมวิชาการอรัรักษพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5 (277-285). กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.
- กรรณิการ์ เพ็ชรภักตร์ อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และธนิตย์ ปล่องบรรจง. (2545). การแยกเชื้อราสาเหตุโรคสแคบของพืชต่างๆ ในประเทศไทย. *ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา* 12(1): 14-20.
- เกษม สร้อยทอง. (2532). การใช้ *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวโดยชีววิธี. *วารสารโรคพืช*. 9(1): 28-33.
- ขจีนาฏ โพธิเวชกุล สุมาลี เหลืองสกุล และสมใจ ศิริโชค. (2541). การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.* 14(2): 18-32.
- จรรยา จันทร์ไพแสง นิพนธ์ ทวีชัย สุดาวรรณ เขยชมศรี ทิพย์วดี อรรถธรรม และสมนึก วงศ์ทอง. (2534). การแยกและจำแนกสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* ที่พบในประเทศไทย. ใน เอกสารการประชุมทางวิชาการสาขาพืช ครั้งที่ 29 กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. (2544). การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ โครงการ การถ่ายทอดเทคโนโลยีทางด้านคลินิกสุขภาพพืช (หน้า 1-20). นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- ดวงพร คันธโชติ. (2537). *อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรียและปฏิบัติการ*. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- นันทกร บุญเกิด. (2546). *คู่มือการสร้างสวนงุ่น*. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- นิพนธ์ วิสารทานนท์. (2542). *โรคงุ่น เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการหลักสูตรหมอพืช-ไม้ผล ฉบับที่ 5*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นลินี จาริกภากร พาณี หนูนิ่ม บุญมี วารินสะอาด พิรุณ จันทนกุล และมณูญ เอนกชัย. (2534). การป้องกันกำจัดโรคข้าวโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*. *ว. วิจัยข้าว*. 1: 42-53.

- นลินี จาริกภากร พาณี หนูนิ่ม บุญมี วารินสอาด และมนัญญู เอนกชัย. (2535). การควบคุมโรคข้าวด้วยวิธีคลุกเมล็ดด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis*. ว. วิชาการเกษตร. 10: 85-89.
- เทพิน เดชนันท์รัตน์. (2546). การคัดแยกแอสคิโนมัยสียที่สร้างสารต่อต้านเชื้อรา และศึกษาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) และ Ribotyping. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาพันธุศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บรรจบ วันกิ่ง. (2549). การจำแนกชนิด *Streptomyces* ปฏิบัติของเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, สาเหตุโรคผลเน่าแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช วิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ประไพศรี สมใจ พวงเพ็ญ สุยะนันท์ บัณฑิต ผังสินธุ์ ภูษิตา วรรณิสสร และจิราภรณ์ วัฒนะกุล. (2540). การผลิตสารชีวภาพมีฤทธิ์ต้านทานเชื้อราโรคพืชจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. เกษตร. 25(2): 66-72.
- ปิยะ เฉลิมกลิ่น. (2544). การปลูกองุ่น. [http : //www.tistr or.th](http://www.tistr.or.th).
- พากเพียร อรัญนารถ นงรัตน์ นิลพานิชย์ วิจิต ศิริสันธนะ และสมคิด ดิสถาพร. (2544). ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. ว. วิชาการเกษตร. 19(1): 4-12.
- มณจันทร์ เมฆธน. (2536). ศักยภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* AP01 ในการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุของโรคพืช. ว. วิทยาศาสตร์ มก. 11: 9-20.
- มุกดา สุขสวัสดิ์. (2544). ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. โอ.เอส.พรินติ้งเฮาส์ : กรุงเทพฯ.
- รัชฎาพรรณ เดชมณี และสุคฤดี ประเทืองวงศ์. (2546). การศึกษาลักษณะบางประการของสาร secondary metabolites ที่ผลิตจาก *Bacillus firmus* ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. ใน การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 6 ระหว่าง 24-27 พฤศจิกายน 2546. โรงแรมโซฟิเทลราชาออดิต อ.เมือง จ.ขอนแก่น.
- วชิร ใจภักดี. (2544). การคัดแยกแอสคิโนมัยสียที่สร้างสารต่อต้านเชื้อราจากดินในประเทศไทย และตรวจสอบลำดับเบสของ 16S rDNA. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาพันธุศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมคิด ดิสถาพร. (2540). การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี. กรมวิชาการเกษตร.
- สายใจ อ่อนแก้ว. (2542). สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวของ *Bacillus* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- สุปรียา หมื่นกุล. (2547). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Bacillus* spp. จากแหล่งต่าง ๆ และประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชบางชนิด. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต** สาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุพจน์ กาเซ็ม และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2546). ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรคใบจุดนูนของถั่วเหลือง. ใน **การประชุมวิชาการอรัญญาพืชแห่งชาติครั้งที่ 6** ระหว่าง 24-27 พฤศจิกายน 2546. โรงแรมโซฟิเทลราชาออคิต อ.เมือง จ.ขอนแก่น.
- สุรางค์ สุธีราวุธ. (2538). การจำแนกชนิดของแบคทีเรียใน Genus *Bacillus* ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง การจัดการแมลงชนิดของจุลินทรีย์ (หน้า 21-37). ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุมาลี เหลืองสกุล เสริมสิน ศิริวัฒนา สมใจ ศิริโชค และขจีนาฏ โพธิเวชกุล. (2542). การคัดเลือกแบคทีเรียแอนทาโกนิสต์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *Fusarium oxysporum*. **ว. วิทย. (มศว)**. 15: 59-80.
- ศรีสุดา กวยาสกุล. (2536). แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อ *Fusarium moniliforme* Sheldon เชื้อสาเหตุโรครากและลำต้นเน่าของอ้อย. **วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- หนึ่ง เตียอำรุง และนันทกร บุญเกิด. (2539). ธาตุเหล็ก ซิเดอโรโฟร์ และจุลินทรีย์. **วารสารเทคโนโลยีสุรนารี**. 3(2): 95-100.
- อนันต์ วงเจริญ. (2547). การจำแนกชนิดเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยใช้คุณลักษณะผสมผสาน. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต** สาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Andersson, M.A., Mikkola, R., Kroppenstedt, R.M., Rainey, F.A., Peltola, J., and Helim, J. (1998). The mitochondrial toxin produced by *Streptomyces griseus* strains isolated from an indoor environment is valinomycin. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 4767-4773.
- Baker, K.F. (1987). Evolving concepts of biological control of plant pathogens. **Annu.Rev. Phytopathol.** 26: 67-85. อ้างถึงใน สมคิด ดิสถาพร. (2540). การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี. **กรมวิชาการเกษตร**.

- Bernal, G., Illanes, A., and Gampi, L. (2002). Isolation and partial purification of metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity agent plant pathogenic agent. **Electric Journal of Biotechnology**. 5(1): 12-20.
- Bewick, M.W., Williams, S.T., and Veltkamp, C. (1976). Growth and ultrastructure of *Streptomyces venezuelae* during chloramphenicol production. **Microbios**. 16: 191-199.
- Breazeale, F.W., and Camper, N.D. (1972). Effect of selected herbicides on bacterial growth rates. **Appl Environ Microbiol**. 23 (2): 431-432.
- Brian, B.M.G., and Deborah, R.F. (2002). **Biological control of plant pathogens** : research, commercialization, and application in the USA.[On-line]. Available : <http://www.apsnet.org/online/feature/biocontrol/links.html>.
- Brian, P., Riggle, P.J., Santos, R.A., and Champness, W.C. (1996). Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA* encode putative signal transduction system. **J. Bacteriology**. 178: 3221-3231.
- Burg, R.W., Miler, B.M., Baker, E.E., Birnbaum, J., Currie, S.A., Hartman, R. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agent : Producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 15: 361-367.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., and Zhou, S. (2005). Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**. 247: 147-152.
- Charigkapakorn, N., Noonim, P., Aneckachi, M., and Warensahd, B. (1991). Biological control of bacterial leaf blight and some fungal pathogens of rice in Thailand by *Bacillus subtilis*. **Thai J. Agri. Sci.** 24: 283-299.
- Cheah, L.H., Kent, G., and Gowers, S. (2001). Brassica crop and a *Streptomyces* sp. As potential biocontrol for club root of brassicas. **New Zealand Plant Protection**. 54: 80-83.
- Chiou, A.L., and Wu, W.S. (2001). Isolation, identification and evaluation of bacterial antagonists against *Botrytis elliptica* on lily. **J. Phytopathology**. 149: 319-324.
- Cho, S.J., Lee, S.K., Cha, B.J., Kim, Y.H., and Shin, K.S. (2003). Detection and characterization of *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* KS03. **FEMS Microbiology Letters** 223: 47-51.

- Claus, D., and Berkeley, R.C.W. (eds). (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (Vol.2). (pp.1105-1139). P.H.A., Sneath, *et al.* USA : Williama & Wilkins, Baltimore.
- Cork, R.J., (1991). Twenty-five years of progress towards biological control. See Ref. 41. pp. 1-14 อ้างถึงในสมคิด ดิสถาพร. (2540). การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี. กรมวิชาการเกษตร.
- Crawford, D.L., Barder, M.J., Pometto, A.L., and Crawford, R.L. (1982). Chemistry of softwood lignin degradation by a *Streptomyces*. **Arch. Microbiol.** 131: 140-145.
- Dietz, A. and Mathews, J. (1971). Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. **Appl. Microbiol.** 21: 527-533.
- Egan, S., Wiener, P., Kallifidas, D., and Wellington, E.M.H. (1998). Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within streptomycetes isolated from soil. **Appl. Environ Microbiol.** 64(12): 5061-5063.
- El-Abyad, M.S., EI-Abyad, M.A., EI-Shanshoury, A.R., and EI-Sabbagh, S.M. (1993). Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant Soil.** 149: 185-195.
- Eldoksch, H.A., Atteia, M. F., and Abdel – Moity, S.M.H. (2001). Management of brown leaf rust, *Puccinia recondite* of wheat using natural products and biocontrol agents. **J. Biol. Sci.** 4(5): 550-553.
- El-Rafai, I. M., Asswah, S.M.W., and Awdalla, O.A. (2003). Biocontrol of some tomato disease using some antagonistic microorganisms. **Pakis. J. Biol. Sci.** 6(4): 399-406.
- El-Hassan, S.A., and Gowen, S.R. (2006). Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*. **J. Phytopathology.** 154: 148-155.
- Erkendur, H., Ole, A.O., Henning, A.J., Agens, F., Michele, M., Ida, H., and Anne, B.K. (2000). *Bacillus antracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis* one species on the basic of genetic evidence. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 2627-2630.
- Estevez de Jensen, C., Percich, J.A., and Graham, P.H. (2002). Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. **Field Crop Research.** 74: 107-115.

- Felse, P.A., and Panda, T. (1999). Studies on application of chitin and its derivatives. **Bioproc. Eng.** 20: 505-512.
- Frandsberg, E., Petersson, C., Lundgren, L.N., and Schnurer, J. (2000). *Streptomyces halstedii* K122 produces the antifungal compounds bafilomycin B1 and C1. **Cana. J. Microbiol.** 46 : 753-758.
- Fujii, I., and Ebizuka, Y. (1997). Anthracycline biosynthesis in *Streptomyces galileus*. **Chemical Reviews.** 97: 2511-2523.
- Gilbert, G.S., Handelsman, J., and Parke, J.L. (1990). Role of ammonia and calcium in lysis of zoospores of *Phytophthora cactorum* by *Bacillus cereus* strain UW85. **Exp. Mycol.** 14:1-8.
- Gupta, R., Sexena, R.K., Chaturvedi, P., and Viridi, J.S. (1995). Chitinase production by *Streptomyces viridificans* : its potential in fungal cell wall lysis. **J. Appl. Bacteriol.** 78: 378-383.
- Handelsman, J., Raffel, S., Mester, E.M., Wunderlich, L., and Grau, C.R. (1990). Biological Control of damping-off of a seedling with *Bacillus cereus* UW85. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 713-718.
- Hansen, L.H., Ferrari, B., Sorensen, A.H., Veal, D., and Sorensen, S. (2001). Detection of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in soil microcosmos by combining whole cell biosensors and flow cytometry. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 239-244.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., and Chet, I. (1995). New component of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Mycol. Res.** 99(4): 441-440.
- Harris, A.R., and Adkins, P.G. (1999). Versatility of fungal and bacterial isolates for biological control of damping – off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. **Biological Control.** 15: 10-18.
- Herr, R.R., Jahnke, H.K., and Argoudelis, A.D. (1967). The structure of streptozotocin. **Journal of the American Chemical Society.** 89: 4808-4809.
- Herzog, A. (1964). The action of streptomycin on *Escherichia coli* ribosomes. **Arch. Int. Physiol. Biochem.** 72: 326-327.

- Isono, K., Nagatsu, J., Kobinata, K., Sasaki, K., and Suzuki, S. (1965). Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part I. Isolation and characterization of polyoxins A and B. **Agri. Biol. Chem.** 29: 848-854.
- Jiang, Z.Q., Guo, Y.H., Li, S.M., Qi, H.Y., and Guo, J.H. (2006). Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparations and field application methods against Phytophthora blight of bell pepper. **Biological Control.** 36: 216-223.
- Jock, S., Volksch, B., Mansvelt, L., and Geider, K. (2002). Characterization of *Bacillus* strains from apple and pear trees in South Africa antagonistic to *Erwinia amylovora*. **FEMS Microbiology Letters.** 211: 247-252.
- Jones, C.R., and Samac, D.A. (1996). Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping-off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces*. **Biological Control.** 7: 196-204.
- Kim, P.H., and Chung, K.C. (2004). Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. **FEMS Microbiology Letters.** 234: 177-183.
- Kishore, G.K., and Pande, S. (2007). Chitin-supplemented foliar application of chitinolytic *Bacillus cereus* reduces severity of Botrytis gray mold disease in chickpea under controlled conditions. **Letters in Applied Microbiology.** 44: 98-105.
- Kopperl, M.L.S., and Mitchell, D.J. (1998). **Selection of *Streptomyces* spp. with potential for Biocontrol of *Fusarium oxysporum* on tomato.** [On-line]. Available : http://www.ICPP98%20Paper%20Number%205_2_76.htm.
- Kortekamp, A., and Zyprian, E. (2003). Characterization of *Plasmopara* – resistance in grapevine using in vitro plants. **J. Plant Physiol.** 160: 1393-1400.
- Lea, H.H., Christine, A.L., and White, J.G. (1995). The potential for the biological control of basal rot of narcissus by *Streptomyces* sp. **Crop Protection.** 14: 539-542.
- Lechevalier, R., Acker, F., Corke, C.T., Haenseler, C.M., and Waksman, S.A. (1953). Candicidin, a new antifungal antibiotic. **Mycologia.** 45: 155-171.
- Lechevalier, H.A., and Lechevalier, M.P. (1970). **The Actinomycetales.** Gustav Fischer, Jena, Germany.

- Lee, H.B., Kim, Y., Kim, J.C., Choi, G.J., Park, S.H., Kim, C.J., and Jung, H.S., (2005). Activity of some aminoglycoside antibiotics against true fungi, *Phytophthora* and *Pythium* species. **J. Appl. Microbiol.** 99: 836-843.
- Mahadevan, B., and Crawford, D.L., (1997). Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. **Enz. and Micro.Tech.** 20: 489-493.
- Mahmoud, Y.A.G., Ebrahim, M.K.H., and Aly, M.M. (2004). Influence of some plant extracts and microbioagents on some physiological traits of faba bean infected with *Botrytis fabae*. **Turk J. Bot.** 28: 519-528.
- Manjula, K., Kishore, G. K., and Podile, A.R. (2004). Whole cell of *Bacillus subtilis* AF 1 proved more effective than cell – free and chitinase – based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. **Can. J. Microbiol.** 50: 737-744.
- Mao, Y., Varoglu, M., and Sherman, D.H. (1999). Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. **Chemistry & Biology.** 6: 251-263.
- McCarthy, A.J. (1987). Lignocellulose-degrading actinomycetes. **FEMS Microbiol. Rev.** 46: 145-163.
- Muller, H., Further, R., Zahner, H., and Rast, D.M. (1981). Effect of nikkomycin Z, nikkomycin X and polyoxin A on chitosomal chitin synthetase. **Arch. Microbiol.** 130: 195-197.
- Muller, J.C., Toome, V., Pruess, D.L, Blount, J.F., and Weigele, M. (1983). A new clavam antibiotic from *Streptomyces clavuligerus*. III. Abs. **J. Antibiot.** (Tokyo). 36: 217-225.
- Neeno, E.C., Kinkel, L.L., and Schottel, J.L. (2001). Competition and antibiosis in the control of potato scab. **Can. J. Microbiol.** 47: 332-340.
- Neugebauer, E., Gamache, B., Dery, C.V., and Brzezinski, R. (1991). Chitinolytic properties of *Streptomyces lividans*. **Arch Microbiol.** 156: 192-197.
- Niranjan, R. S., Chaluvaraju, G., Amruthesh, K.N., and Shetty, H.S. (2003). Induction of growth promotion and resistance against downy mildew on pearl millet (*Pennisetum glaucum*) by Rhizobacteria. **Plant Disease.** 87: 380-384.
- Noronha, E.F., and Ulhoa, C.J. (2000). Characterization of a 29-KDa β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Fed. Eur. Microbiol. Soc.** 183: 119-123.

- Oejijono, M., Line, A., and Dragar, C. (1993). **Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi.** Soil Biol Biochem. Exeter : Pergamon Ptes. 25: 247-250.
- Okazaki, K., and Tagawa, K. (1991). Purification and properties of chitinase from *Streptomyces cinereor.* **J. ferment. Bioeng.** 71: 237-241.
- Omura, S., Nakagawa, A., Fujimoto, T., Saito, K., Otoguro, K., and Walsh, J.C. (1987). Hygromycin A, an antitreponemal substance. I. Screening method and therapeutic effect for *Treponema hyodysenteriae*-caused infection in CF-1 mice. **The Journal of Antibiotics.** 40: 1619-1626.
- Pang, X., Zhou, X., Sun, Y., and Deng, Z. (2002). Physical map of *Streptomyces hygroscopicus* 10-22 deduced by analysis of overlapping large chromosomal deletion. **J. Bacteriol.** 184: 1958-1965.
- Pasti-Grigsby, M.B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D.L., and Crawford, R.L. (1992). Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 3605-3613.
- Paul, B., Chereyathmanjiyil, A., Masih, I., Chapuis, L., and Benoit, A. (1998). Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. **FEMS Microbiology Letters.** 165: 65-70.
- Pearson, R.C., and Goheen, A.C. (1998). **Compendium of grape disease.** USA : The American Phytopathological Society.
- Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, N.Z., and Piepersberg, W. (1995). Molecular characterization of the Lincomycin-production gene-cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. **Molecular Microbiology.** 16: 1137-1156.
- Priest, F.G. (1993). **Systematica and ecology of Bacillus, *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria** : biochemistry, physiology and molecular genetics, A.I., Sonenshein, J.A., Hoch, R., Losick (eds). pp 3-16. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Pusey, P.L. (1989). Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. **Pestic. Sci.** 27: 133-140.

- Ranjeet, K.T., *et al.* (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 2161-2171.
- Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I., and Chambliss, G.H. (1998). *Bacillus*. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections Systematic Bacteriology. 2: 709-729.
- Rytter, J.L., Lukezic, L., Craig, R., and Moorman, G.W. (1989). Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. **Phytopathol.** 79: 367-370.
- Sabaratman, S., and Traquair, J. (2002). Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of Rhizoctonia damping-off in tomato transplants. **Biological Control.** 23: 245-253.
- Saleh, N., Mahmoud, S.A., El-Haddad, M.E., and Abdel-Fatah, M.K. (1985). Purification and identification of *Streptomyces aureofaciens* ID13 antibiotic. **Zentralblatt für Mikrobiologie.** 140: 325-332.
- Salinari, F., Giosue, S., Tubiello, F.N., Rettori, A., Rossi, V., Spannas, F., Rosenzweig, C., and Gullino, M.L. (2006). Downy mildew (*Plasmopara viticola*) epidemics on grapevine under climate change. **Global Change Biology.** 12: 1299-1307.
- Sasarman, A., Horodniceanu, T., Gritaenco, V., Antohi, M., and Surdeanu, M. (1964). Properties of dwarf colonies of *Streptomyces typhiumurium* obtained with the use of neomycin and streptomycin. **Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.** 23: 911-918.
- Sato, K. (1983). Biological properties of kasugamycin,. In N. Takahashi *et al.* (eds). **Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment.** (Vol. 2). (pp. 293-299). Natural Products, Pergamon Press, Oxford.
- Scherm, H., Ngugi, H.K., Savelle, A.T., and Edwards, J.R. (2004). Biological control of infection of blueberry flowers caused by *Monilinia vaccinii-corymbosi*. **Biological Control.** 29: 199-206.
- Schmidt, C.S., Lorenz, D., Wolf, G.A., and Jager, J. (2001). Biological control of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* II : influence of formulation additives and transposon mutagenesis on the antagonistic activity of *Bacillus subtilis* and *Erwinia herbicola*. **J. Phytopathology.** 149: 437-445.
- Selman, A.W. (1967). **The actinomycetes.** New York : The Ronald press company.

- Shaikh, S.A., and Deshpande, M.V. (1993). Chitinolytic enzymes : their contribution to basic and applied research. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**. 9: 468-475.
- Shear, C.L.(1929). The life history of *Sphaceloma ampelinum* de Bary. **Phytopathology**. 19: 673-679.
- Shoda, M. (2000). Bacterial control of plant diseases. **J. Bioscience and Bioengineering**. 89(6): 515-521.
- Skujins, J.J., Potgieter, H.J., and Alexander, M. (1965). Dissolution of fungal cell walls by *Streptomyces* chitinase and β -1,3-glucanase. **Arch. Biochem. Biophys**. 11: 358-364.
- Sneath, P. H.A., Mair, N., Sharpe, M.E., and Holt, J. G. (1986). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. (Vol 2). Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Souto, G.I., Correa, O.S., Montecchia, M.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L., and Bachur, M. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. Strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. **J. Appl. Microbiol**. 97: 1247-1256.
- Swan, D.G., Rodriguez, A.M., Vilches, C., Mendez, C., and Salas, J.A. (1994). Characterisation of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence. **Mol. Gen. Genet**. 242: 358-362.
- Tachibana, K., and Kaneko, K. (1986). Development of a new herbicide, Bialaphos. **J. Pesticide Science**. 11: 297-304.
- Taguchi, S., Kojima, S., Terabe, M., Kumazawa, Y., Suzuki, M., Miura, K., and Momose, H. (1997). Molecular phylogenetic cauterization of *Streptomyces* protease inhibitor family. **Journal of Molecular Environmental**. 44: 542-551.
- Takeuchi, S., Hirayama, K., Ueda, K., Sakai, H., and Yonehara, H. (1958). Blastisin S, a new antibiotic. **J. of Antibiotics (Tokyo). Series A** 11: 1-5.
- Tamehiro, N.O., Hosoyan, Y., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H., and Ochi, M. (2002). Baclysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. **Antimicrobial Agent and Chemotherapy**. 46(2): 315-320.
- Tarabily, K.A., Soliman, M.H., Nassar, A.H., Hassani, H.A., Kenna, F., and Hardy, G.E. (2000). Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology**. 49: 573-581.

- Tresner, H.D., Davies, M.C., and Backus, E.J. (1961). Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. **J. Bacteriol.** 81: 70-80.
- Tronsmo, A., and Harman, G.E. (1993). Detection and quantification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. **Anal. Biochem.** 208: 74-79.
- Turnbull, P.C.B., Kramer, J.M., and Melling, J. (1990). Bacillus. Topley & Wilson's Principle of Bacteriology, Virology and Immunity. 2: 187-210.
- Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., and Okami, Y. (1966). New antibiotics, bleomycin A and B. **J. Antibiot (Tokyo)**. 15(5): 200-209.
- Uyeda, M., Mizukami, M., Yokomizo, K., and Suzuki, K. (2001). Pentalenolactone I and hygromycinA, immunosuppressants produced by *Streptomyces filipinensis* and *Streptomyces hygroscopicus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 65: 1252-1254.
- Vezina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S.N. (1975). Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. **J. Antibiot**. 28: 721-726.
- Vujaklija, D., Marija, A., Ivana, L., Tereza, M., and Jasenka, P. (2003). *Streptomyces rimosus* GDS(L) lipase : production, heterologous overexpression and structure-stability relationship. **Food Technology Biotechnology**. 41: 89-93.
- Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., and Tanaka, H. (1990). Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 importance of chitinase A1 in chitin degradation. **J. Bacteriol.** 172: 4017-4022.
- Wateewuthajarn, K., and Pinphanichakarn, P. (2000). Purification and characterization of xylanases from *Streptomyces* sp. PC22. **Journal of Science Research of Chulalongkorn University**. 25: 245-256.
- Werner, G., Hagenmaier, H., Drautz, H., Baumgartner, A., and Zahner, H. (1984). Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. **J. Antibiot**. 37(2): 110-117.

- Williams, S.T., Goodfellow, M., and Alderson, G. (1989). Genus *Streptomyces* pp. In S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds). (pp. 2452-2492) **Bergey's manual of determinative bacteria.** (Vol 4). Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Wu, R.R., and Chen, M.H. (1995). Identification of the *Streptomyces* strain KS3-5. **Botanical Bulletin of Academia Sinica.** 36: 201-205.
- Wu, X.Y., Walker, M.J., Hornitzky, M., and Chin, J. (2005). Development of group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. **Journal of Microbiological Methods.** 1-13.
- Wulff, E.G., Mguni, C.M., Giese, K.M., Fels, J., Lubeck, M., and Hockenhull, J. (2002). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Plant Pathology.** 51: 574-584.
- Xiao, K., Kinkel, L.L, and Samac, D.A., (2001). Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. **Biological Control.** 23: 285-295.
- Yocheva, L., and Nikolova, A. (1999). Natural polymorphism of strain *Streptomyces galbus* subsp. *achromogenes* 695. [On-line] Available : <http://nbimcc.cablebg.net/JCC/1997-1998/JCC24S.htm>.
- Yourman, L.F., and Luster, D.G. (2003). Generation of molecular markers for the identification of isolates of *Puccinia jaceae*, a potential biological control agent of yellow starthistle. **Biological Control.** 29: 73-80.
- Yuan, W.M., and Crawford, D.L. (1995). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 3119-3128.
- Zukowski, M.M. (1992). **Production of commercially valuable products.** Biology of Bacili : Application to Industry, In R.E., Doi, M., McGloughlin (eds). (pp. 311-337). Butterworth-Hoffman, Boston.

ภาคผนวก ก

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Bacillus* และ *Streptomyces* spp. ที่คัดแยกจากแหล่งปลูกองุ่นแต่ละที่

ตารางที่ 1ก. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Bacillus* ที่คัดแยกจาก ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จากแปลงที่ไม่มีการแพร่ระบาดของโรคที่มี ประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรก

<i>P. aphanidermatum</i>		<i>C. ampelinum</i>		<i>S. rolfsii</i>	
Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)
BSN502	69.44	BSN603	73.33	BSN304	69.72
BSN501	65.83	BSN501	72.22	BSN201	67.22
BSN302	56.11	BSN402	55.55	BSN301	66.38
BSN603	55.27	BSN104	55.27	BSN502	65.83
BSN304	55.00	BSN301	54.44	BSN403	65.00

ตารางที่ 2ก. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Bacillus* ที่คัดแยกจาก ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จากแปลงที่มีการแพร่ระบาดของโรค ที่มี ประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรก

<i>P. aphanidermatum</i>		<i>C. ampelinum</i>		<i>S. rolfsii</i>	
Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)
BSD604	66.11	BSD101	84.44	BSD203	84.75
BSD502	56.11	BSD502	72.22	BSD405	84.16
BSD603	55.45	BSD604	66.66	BSD104	60.55
BSD301	55.00	BSD406	66.11	BSD605	56.11
BSD405	54.72	BSD605	60.00	BSD404	56.05

ตารางที่ 3ก. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Bacillus* ที่คัดแยกจากอำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา จากแปลงที่ไม่มีอาการแพร่ระบาดของโรค ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรก

<i>P. aphanidermatum</i>		<i>C. ampelinum</i>		<i>S. rolfsii</i>	
Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)
BPN213	54.32	BPN209	57.00	BPN403	51.00
BPN208	53.65	BPN208	56.75	BPN302	50.00
BPN303	51.00	BPN202	55.98		
		BPN201	55.77		
		BPN214	55.00		

ตารางที่ 4ก. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อรา *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Bacillus* ที่คัดแยกจากอำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา จากแปลงที่มีการแพร่ระบาดของโรค ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรก

<i>C. ampelinum</i>		<i>S. rolfsii</i>	
Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)
BPD101	56.00	BPD104	52.45
BPD102	52.45		
BPD203	51.66		
BPD505	49.50		

ตารางที่ 5ก. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*,
Colletotrichum ampelinum และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Streptomyces* ที่คัดแยก
 จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรก

<i>P. aphanidermatum</i>		<i>C. ampelinum</i>		<i>S. rolfsii</i>	
Isolate	PIDG(%)	Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)
SSR ^{1/} 107	28.00	SSR 203	61.66	SSH 209	43.33
SSR 112	23.00	SSH 213	58.33	SSH 216	41.66
SSH 214	19.00	SSR 112	55.55	SSH 213	22.22
SSH 207	17.00	SSH 102	54.44	SSH 211	19.44
SSR 104	12.00	SSR 117	53.33	SSR 104	13.88

^{1/}R = ดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง, H = ดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6ก. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*,
Colletotrichum ampelinum และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Streptomyces* ที่คัดแยก
 จากอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรก

<i>P. aphanidermatum</i>		<i>C. ampelinum</i>		<i>S. rolfsii</i>	
Isolate	PIDG(%)	Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)
SUR ^{1/} 111	28.00	SUR 206	54.44	SUR 111	17.20
SUR 109	17.00	SUR 111	53.33	SUR 205	13.80
		SUR 109	52.22	SUR 103	12.00
		SUR 103	51.66	SUR 206	8.33
		SUR 105	50.00	SUR 112	6.66

^{1/}R = ดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง, H = ดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 7ก. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Streptomyces* ที่คัดแยกจากสวนผสมสมยศ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรก

<i>P. aphanidermatum</i>		<i>C. ampelinum</i>		<i>S. rolfsii</i>	
Isolate	PIDG(%)	Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)
SYR ^{1/} 107	46.00	SYR 107	61.11	SYR 205	50.00
SYR 205	40.00	SYR 205	58.33	SYR 107	12.00
SYR 110	22.00	SYR 208	54.44	SYR 110	11.00
SYR 101	13.00	SYR 210	52.77		
SYR 206	10.00	SYR 110	51.11		

^{1/}R = ดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 8ก. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIDG) ของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อ *Streptomyces* ที่คัดแยกจากสวน Holiday อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมาที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 5 อันดับแรก

<i>P. aphanidermatum</i>		<i>C. ampelinum</i>		<i>S. rolfsii</i>	
Isolate	PIDG(%)	Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)
SHR ^{1/} 103	42.00	SHH 202	63.88	SHR 211	17.00
SHH 202	38.00	SHR 106	58.88	SHR 210	16.00
SHR 213	28.00	SHR 202	57.22	SHH 202	15.00
SHR 106	19.00	SHR 213	55.55	SHR 205	11.00
SHR 108	18.00	SHR 214	54.44	SHR 103	10.55

^{1/}R = ดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง, H = ดินที่ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวเคมี

1. Bacillus Medium

Peptone	0.6	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Beef extract	1.5	กรัม
Pancreatic digest of casein	3.0	กรัม
MnSO ₄ ·4H ₂ O	1.0	ไมโครกรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

2. Nutrient Ager (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8-7.2 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

3. Starch casein agar (SCA)

Soluble starch	10	กรัม
Vitamin free casein	0.3	กรัม
KNO ₃	2	กรัม
K ₂ HPO ₄	2	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	กรัม
CaCO ₃	0.02	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

4. M3 Agar

KH_2PO_4	0.46	กรัม
Na_2HPO_4	0.73	กรัม
KNO_3	0.01	กรัม
NaCl	0.29	กรัม
CaCO_3	0.02	กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.02	มิลลิกรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	มิลลิกรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.18	มิลลิกรัม
Thiamine	4.0	มิลลิกรัม
Sodiumpropionate	0.2	กรัม
Agar	18	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

5. Oatmeal agar (OA)

Oat rice	20	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
Agar	20	กรัม

ต้มข้าวโอ๊ตให้เดือดในน้ำกลั่น 20 นาที กรองกากออกแล้วเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

6. M9 medium agar

Mannital	10	กรัม
----------	----	------

Peptone	2	กรัม
---------	---	------

Beef extract	1	กรัม
--------------	---	------

Yeast extract	1	กรัม
---------------	---	------

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

7. Waksman agar

Glucose	10	กรัม
---------	----	------

Bacto peptone	5	กรัม
---------------	---	------

Beef extract	5	กรัม
--------------	---	------

NaCl	3	กรัม
------	---	------

Agar	15	กรัม
------	----	------

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

8. Starch hydrolysis agar

Nutrient agar	23	กรัม
---------------	----	------

Potato starch	10	กรัม
---------------	----	------

ละลายวุ้นในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ต้มให้ละลาย ละลายแป้งในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ต้มให้ละลาย ผสมสารละลายวุ้นและแป้งเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

9. Casein agar

Solution A :	Skim milk	10	กรัม
--------------	-----------	----	------

	Distilled water	90	มิลลิลิตร
--	-----------------	----	-----------

เติมนมลงในน้ำพร้อมกับคนตลอดเวลาเพื่อไม่ให้นมจับตัวกันเป็นก้อน

Solution B :	Agar	3	กรัม
--------------	------	---	------

	Distilled water	97	มิลลิลิตร
--	-----------------	----	-----------

นำ สารละลายทั้งสองชนิดแยกกัน ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิ 45 – 50 องศาเซลเซียส ผสมสารละลายทั้งสองชนิดให้เข้ากัน เทใส่จานอาหารแล้วทิ้งไว้ให้แข็งตัว

10. Basal mineral salts medium

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.64	กรัม
KH_2PO_4	2.38	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5.65	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	กรัม
Trace salts solution	1	มิลลิลิตร
Bacto agar	15	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

Trace salts solution

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.64	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.79	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

11. Yeast extract malt extract broth

Bacto yeast extract	4	กรัม
Bacto malt extract	10	กรัม
Glucose	4	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

12. Water agar ผสม 0.05% Lichenan

Agar	20	กรัม
Lichenan	0.5	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

13. Water agar ผสม 1% gelatin

ละลาย gelatin จำนวน 10 กรัม ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7 ผสมในสารละลายวุ้นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

14. M9 medium agar ผสม 1% gelatin

ละลาย gelatin จำนวน 10 กรัม ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7 ผสมในสารละลายทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

15. M9 medium agar ผสม 0.05% Lichenan

ละลาย lichenan 0.5 กรัม และส่วนประกอบทั้งหมดของ M9 ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

16. M9 medium agar ผสม 2.4% Colloidal chitin

ละลาย Colloidal chitin 24 กรัม และส่วนประกอบทั้งหมดของ M9 ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

การเตรียม Colloidal chitin

ชั่ง chitin 5 กรัม นำมาละลายใน HCl เข้มข้น 60 มิลลิลิตร กวนตลอดเวลา นาน 2 ชั่วโมง ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน จากนั้นนำมาเติม ethanal 95% (ice-cold) ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 จะได้ colloidal chitin solution 5% เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

17. Carbohydrate fermentation broth

Peptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Meat extract	3	กรัม
Carbohydrate solution	50	มิลลิลิตร
Andrade's indicator	10	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบของ Andrade's indicator ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Acid fuchsin	0.5	กรัม
NaOH (1 N solution)	16	มิลลิลิตร
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ละลาย acid fuchsin ในน้ำกลั่น เติม NaOH ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง คนบ่อย ๆ จนสีแดงเป็นสีน้ำตาล

การเตรียม Carbohydrate solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Carbohydrate	10	กรัม
--------------	----	------

ละลาย Carbohydrate ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองด้วย filter membrane

นำส่วนประกอบทั้งหมด (ยกเว้น Carbohydrate solution) ผสมกันในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำสารละลายใส่หลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิ 45 – 50 องศาเซลเซียส ผสม Carbohydrate solution ก่อนนำไปทดสอบ

ภาคผนวก ก
สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

1. TEN buffer (10X TEN buffer)

ผสม 0.1M Tris-HCl, pH 8.0, 0.01M EDTA, pH 8.0 และ 1M NaCl ในปริมาณที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน เทใส่ขวดที่สะอาดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

2. TE buffer (Tris EDTA)

ผสม 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 และ 10 mM EDTA, pH 8.0 ในปริมาณที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน เทใส่ขวดที่สะอาดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

3. 10% SDS

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เทใส่ขวดที่สะอาดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

4. 1M NaCl

ชั่ง NaCl จำนวน 58.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร เทใส่ขวดที่สะอาดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

5. Tris – HCl, pH 8

ชั่ง Tris base จำนวน 121.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร เทใส่ขวดที่สะอาดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

6. 0.5M EDTA, pH 8

ชั่ง Disodium ethylenediamine tetra-acetate. 2H₂O (EDTA) จำนวน 186.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร เทใส่ขวดที่สะอาดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 20 นาที

7. Lysozyme 100 mg/ml

ชั่ง lysozyme 500 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนสารละลายหมด เก็บใส่ขวดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. Proteinase K 100 mg/ml

ชั่ง proteinase K 500 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นมาเชื้อ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้าจนสารละลายหมด เก็บใส่ขวดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

9. สารละลาย Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)

ผสมสารละลาย phenol 25 มิลลิลิตร chloroform 24 มิลลิลิตร และ isoamyl alcohol 1 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพรพรรณ อุสุวรรณ์ เกิดวันที่ 6 มีนาคม 2515 เริ่มเข้าศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม สำเร็จการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับ 2 เมื่อปีการศึกษา 2537 จากนั้นเข้าศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต เมื่อปีการศึกษา 2544 และได้เข้าทำงานในตำแหน่งอาจารย์อัตราจ้าง ภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ในช่วงปี 2544-2546 จนกระทั่งได้รับทุน จากทางมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ให้ศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิต พืช สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2/2546 และสำเร็จการศึกษาระดับดุษฎีบัณฑิต ในปีการศึกษา 2550