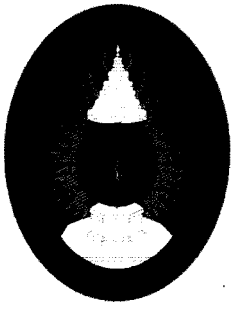
- 5 มิ.ย. 2559



ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกจากดินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* สาเหตุโรครากขาวในยางพารา

Efficiency of Bacteria Isolated from Soil to Inhibit *Rigidoporus lignosus* Causing of White Root Disease in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

บารียะห์ เจ๊ะและ

เพาซียัะ เจ๊ะมะลี

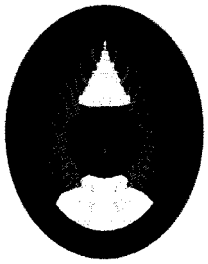
รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม

หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา (Microbiology)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

2558



ใบรับรองงานวิจัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์

ชื่อเรื่อง ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกจากดินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* สาเหตุโรครากขาวในยางพารา

ชื่อผู้ทำวิจัย นางสาวบารียะห์ เจ๊ะและ
นางสาวเพาซียัะ เจ๊ะมะลี

คณะกรรมการการสอบโครงการวิจัย

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ดร.นิศากร วิทจิตสมบูรณ์)

.....กรรมการสอบ
(ดร.สายใจ วัฒนเสน)

.....กรรมการสอบ
(อาจารย์สัลวา ตอปี)

คณะกรรมการประจำสาขาวิชารับรองแล้ว

.....
(ดร.สายใจ วัฒนเสน)
ประธานโปรแกรมวิชา

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทัศนา ศิริโชติ)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เมื่อวันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ชื่อเรื่อง	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกจากดินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* สาเหตุโรครากขาวในยางพารา
ชื่อผู้ทำงานวิจัย	นางสาวบารียะห์ เจ๊ะและ นางสาวเพาซียัะ เจ๊ะมะลี
อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย	ดร.นิศากร วิทจิตสมบูรณ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา
สถาบัน	มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
ปีที่พิมพ์	2558

บทคัดย่อ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ แต่มักประสบปัญหากับโรครากขาวจากเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ทำให้ปริมาณและคุณภาพของน้ำยางพาราลดลง จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกจากดินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากขาว โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณต้นยางพารา 3 แหล่ง ได้แก่ อ.รือเสาะ จ.นราธิวาส อ.ยี่งอ จ.นราธิวาส และ อ.ศรีสาคร จ.นราธิวาส สามารถแยกแบคทีเรียได้ 30 ไอโซเลท เมื่อทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ด้วยแบคทีเรียทุกไอโซเลท พบว่ามีไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ คือ ไอโซเลทที่ 5 สามารถยับยั้งได้ 29.05 % สำหรับชุด Negative control ที่เติมไคโตซาน 0.06 กรัม พบว่า สามารถยับยั้งได้ 89.62 % เมื่อศึกษาคุณสมบัติและจำแนกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ได้ พบว่าไอโซเลทที่ 5 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปกลม โคโลนีมีสีเทา เมื่อทดสอบการรีดิวส์ไนเตรตพบว่าแบคทีเรียสามารถรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตรต์และรีดิวส์ไนไตรต์ต่อเป็นแอมโมเนียหรือแก๊สไนโตรเจน และทดสอบการสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ glucose maltose sucrose และ lactose พบว่าสร้างกรด และไม่สร้างแก๊ส จากการทดสอบดังกล่าวแสดงว่าเชื้อไอโซเลทที่ 5 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Branhamella catarrhalis* มากที่สุด

คำสำคัญ: ยางพารา, โรครากขาว, *Rigidoporus lignosus*, *Branhamella catarrhalis*

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร.นิศากร วิทจิตสมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัยที่กรุณาให้คำปรึกษา ให้ความรู้ พร้อมทั้งช่วยชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ช่วยในการแก้ไขวิธีการและเทคนิคที่ผิดพลาดที่เกิดขึ้นในระหว่างการทดลอง รวมทั้งช่วยตรวจทานโครงงานวิจัยฉบับนี้ให้ดียิ่งขึ้น และช่วยเป็นกำลังใจให้ตลอดการทดลอง ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์ ดร.สุวรรณี พรหมศิริ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ขอขอบพระคุณคณาจารย์ประจำโปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ ที่ให้คำแนะนำและชี้แนะแนวทางวิธีการที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยครั้งนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำโปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวก ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือ และการใช้ห้องปฏิบัติการในขณะทำการทดลอง รวมถึงขอขอบคุณศูนย์วิจัยยางพาราจังหวัดสงขลาที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อรารากขาว *Rigidoporus lignosus*

กราบขอบพระคุณบิดา มารดา เพื่อน ๆ ทุกคน ที่คอยช่วยเหลือ สนับสนุน และคอยเป็นกำลังใจตลอดมาจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บารียะห์ เจ๊ะและ

เพาซียะ เจ๊ะมะลี

ธันวาคม 2558

เลข Bib# 1137111
วันที่ 30 พ.ย. 2559
เลขเรียกหนังสือ ว 579.3 บ 27 ป

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(ก)
กิตติกรรมประกาศ	(ข)
สารบัญ	(ค)
สารบัญตาราง	(จ)
สารบัญภาพ	(ฉ)
บทที่ 1 บทนำ	**1**
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**4**
โรครากขาวของยางพารา (White root disease)	4
จุลินทรีย์ปฏิปักษ์	8
การใช้แบคทีเรียเพื่อรักษาโรคพืช	10
การคัดแยกจุลินทรีย์จากดิน	11
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	**18**
วัสดุและอุปกรณ์	18
การดำเนินการวิจัย	19

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร SAKON NAKHON RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	**22**
การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแบคทีเรียจากดิน	22
การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อรา	25
การศึกษาลักษณะโครงสทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่ยับยั้งเชื้อราเป้าหมาย	28
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	**31**
ข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	**32**
ภาคผนวก	**34**
ประวัติย่อของผู้วิจัย	**43**

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงสารปฏิชีวนะบางชนิดที่ผลิตจากเชื้อในสกุล *Streptomyces* และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์	8
2 แสดงลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์	22
3 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *R. lignosus*	27

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงลักษณะของโรครากขาว	4
2 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. lignosus* ด้วยแบคทีเรียไอโซเลทที่ 5	25
3 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. lignosus* (Positive control)	26
4 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. lignosus* ด้วยไคโตซาน (Negative control)	26
5 แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลทที่ 5	28
6 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของ *Neisseria* spp. และ *Branhamella catarrhalis*	29
7 แสดงผลการทดสอบการรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตรต์	30
8 แสดงผลการทดสอบการสร้างกรดและแก๊สจากน้ำตาล lactose, sucrose, maltose และ glucose	30

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ยางพารา (*Hevea brasilieansis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยพื้นที่ปลูกยางพาราของประเทศไทยกระจายอยู่ในภาคใต้ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และบางพื้นที่ของภาคเหนือ ปัจจุบันประเทศไทยมีเนื้อที่ปลูกยางพารามากเป็นอันดับ 2 ของโลกรองจากอินโดนีเซีย แต่ไทยมีผลผลิตยางมากที่สุดในโลก และจังหวัดที่มีเนื้อที่ปลูกยางพารามากที่สุด ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี อย่างไรก็ตาม การผลิตยางพารามักประสบปัญหาหลายประการที่ทำให้ผลผลิตไม่ดีเท่าที่ควร โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาโรคระบาดในยางพารา ได้แก่ โรคใบร่วง (leaf fall), โรคฝักเน่า (pod rot) และโรคเส้นดำ (black rot) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีโรคที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งซึ่งนับว่าเป็นโรคร้ายแรง และสร้างความเสียหายต่อยางพาราอีกชนิดหนึ่ง ได้แก่ โรครากขาว (white root disease) ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* จัดอยู่ในคลาส Basidiomycetes ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้กับยางทุกระยะการเจริญเติบโต และสามารถแพร่ระบาดได้ทุกฤดู เนื่องจากเป็นเชื้อราที่อยู่ในดิน (ปวีณา สังข์แก้ว, 2556) เชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายระบบรากของยางพารา ทำให้มีผลต่อการดูดน้ำ และธาตุอาหารในดิน ต้นยางจึงขาดน้ำและสารอาหาร ลักษณะอาการของโรคสังเกตได้จากพุ่มใบเปลี่ยนเป็น สีเหลืองแกมส้ม ใบร่วงหมดทั้งต้น ขอบใบม้วนเข้าหาด้านใน ถ้าตรวจดูที่รากจะเห็นเส้นใยของเชื้อรา มีลักษณะเป็นร่างแหจับแน่น และแผ่คลุมผิวรากที่เป็นโรค มีสีขาวปลายแบน เมื่อเส้นใยอายุมากขึ้นจะนูนกลมและกลายเป็นสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลแห้งซีด ซึ่งจะส่งผลให้การเจริญเติบโตของยางพาราหยุดชะงัก และทำให้ยางยืนต้นตายในที่สุด การแพร่ระบาดสามารถเกิดขึ้นได้ 2 ทาง ได้แก่ การสัมผัสระหว่างรากที่เป็นโรคกับรากที่ปกติ และการที่สปอร์ของเชื้อราปลิวไปตามลมแล้วไปตกลงบนแผลของตอยางใหม่ เมื่อมีความชื้นเพียงพอเชื้อจะเจริญไปยังระบบราก กลายเป็นแหล่งเพาะเชื้อโรคแหล่งใหม่ต่อไป (ปวีณา สังข์แก้ว, 2556)

การป้องกันกำจัดโรครากขาวโดยการใช้สารเคมี ค่อนข้างสิ้นเปลืองแรงงาน ยุ่งยากในการป้องกันกำจัดในพื้นที่กว้าง ๆ และการใช้สารเคมีมักมีขีดจำกัด เนื่องจากมีฤทธิ์ระยะสั้น สิ้นเปลืองงบประมาณ ประสิทธิภาพต่ำ นอกจากนั้นยังเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม เกิดการตกค้างในดิน (สายทอง แก้วฉาย, 2556) การป้องกันกำจัดโดยชีววิธี หรือการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันกำจัดโรครากขาวของยางพารา เช่น *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. และ *Tricoderma* spp. มีรายงานว่าเป็นเชื้อราปฏิปักษ์กับโรครากขาว (สายทอง แก้วฉาย, 2556)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกจากดินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* สาเหตุโรครากขาวในยางพารา และจำแนกแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราในระดับสปีชีส์ เพื่อนำไปศึกษาเพิ่มเติม และประยุกต์ใช้ในทางการเกษตร เป็นการใช้จุลินทรีย์ทดแทนการใช้สารเคมีซึ่งก่อให้เกิดผลดีในระยะยาว อีกทั้งยังลดปัญหามลพิษกับสิ่งแวดล้อมต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากดินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus*

2.2 เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป้าหมาย

3. ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกจากดินมายับยั้งเชื้อราก่อโรครากขาวในยางพารา โดยการเก็บตัวอย่างดินจากสวนยางพารา อ.รือเสาะ จ.นราธิวาส อ.ยี่งอ จ.นราธิวาส และ อ.ศรีสาคร จ.นราธิวาส จำนวน 3 แหล่ง แหล่งละ 1 จุด รวมทั้งหมด 30 ไอโซเลท

3.1 ตัวแปร

ตัวแปรต้น : แบคทีเรียที่แยกจากดิน

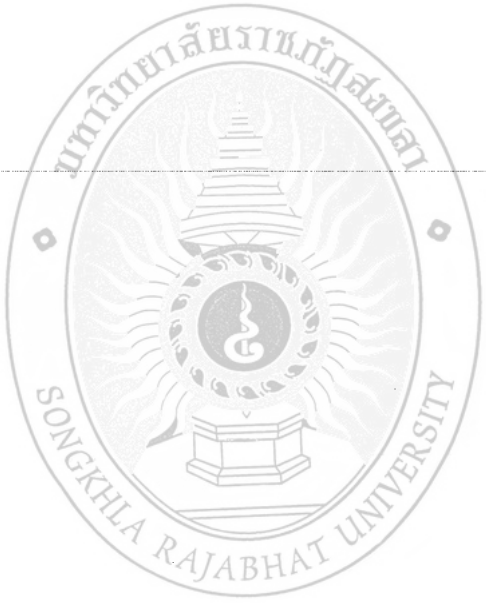
ตัวแปรตาม : การยับยั้งเชื้อรา

ตัวแปรควบคุม : สภาวะในการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิและเวลา

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

4.1 สามารถทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากดินเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* สาเหตุโรครากขาวในยางพาราได้

4.2 สามารถใช้แบคทีเรียที่แยกจากดิน ทดแทนการใช้สารเคมีในการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* เพื่อลดการใช้สารพิษในทางการเกษตรได้ในอนาคต



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรครากขาวของยางพารา (White root disease)

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของโรครากขาว

ที่มา: สายทอง แก้วฉาย, 2556

1.1 สาเหตุ

เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* ซึ่งเป็นเชื้อราจำพวกเห็ด (Basidiomycetes) Ryvarden, L. (1991) ได้จัดจำแนก *Rigidoporus lignosus* ดังนี้

Kingdom	:	Fungi
Phylum	:	Basidiomycota
Class	:	Basidiomycetes
Order	:	Polyporales
Family	:	Meripilaceae
Genus	:	*Rigidoporus*
Species	:	*R. lignosus*

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

1.2 สรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา

อารมณ์ โรจน์สุจิตร (2552) ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อ *R. lignosus* พบว่า เส้นใยของเชื้อสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส โดยเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 และ 40 องศาเซลเซียส ยังพบว่าเส้นใยสามารถเจริญได้ที่ pH 4-10 โดยเจริญได้ดีที่สุดที่ pH 6-7 ส่วนลักษณะของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาว แตกแขนงเจริญแผ่เป็นวงกลมและเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 6 วัน โดยมีอัตราการเจริญอยู่ที่ 1.3 เซนติเมตรต่อวัน เส้นใยไม่มีสี มีผนังกั้น เส้นใยเป็นแบบ Monomitic และไม่มี clamps connection มีความกว้าง 2.8-7.2 ไมโครเมตร (สายทอง แก้วฉาย, 2556) ดอกเห็ด (fruiting body) มีลักษณะเป็นแผ่นครึ่งวงกลม ไม่มีก้าน อาจมีขนาดกว้างถึง 20 เซนติเมตรขึ้นอยู่กับอายุของดอกเห็ด ผิวเรียบ ด้านบนของดอกมีสีน้ำตาลแดง ด้านล่างมีสีขาวมีลักษณะเป็น เส้นใยอัดกันแน่นและมีรูจำนวนมาก (pores) และสร้างสปอร์ขนาด 3.6-4.1 ไมโครเมตร

1.3 วงจรชีวิตของเชื้อรา

วงจรชีวิตของเชื้อราเริ่มจากสปอร์ของเชื้อ (basidiospore) ซึ่งเป็น primary inoculum เข้าทำลายรากของตอยางพารา และแพร่กระจายไปยังชิ้นส่วนของยางพาราทั้งที่อยู่ในดินและบนดิน เส้นใยของเชื้อราจะแพร่กระจายจากราก ซึ่งเป็น secondary inoculums ไปยังรากของยางพาราที่เป็นต้นปกติ หลังจากนั้นจะแพร่กระจายจากต้นหนึ่งไปยังอีกต้นหนึ่ง เชื้อราจะผลิต fruiting bodies หรือดอกเห็ดที่โคนของต้นที่ตาย และผลิตสปอร์เข้าทำลายยางพาราต่อไป (สายทอง แก้วฉาย, 2556)

1.4 อาการของโรคที่พบ

เชื้อเข้าทำลายยางพาราตั้งแต่ระยะยางอ่อน อายุประมาณ 1-5 ปี ในกรณีที่พื้นที่นั้นเคยมีการระบาดของเชื้อนี้มาก่อนแล้ว หรือทำให้เกิดความเสียหายกับยางในระยะโต อายุมากกว่า 15 ปีขึ้นไป (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2522) อาการที่ปรากฏคือ รากที่เป็นโรคจะปรากฏเส้นใยเชื้อราสีขาว ลักษณะเป็นร่างแหแผ่ปกคลุมทั่วราก เมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้นจะมีลักษณะนูนกลมเปลี่ยนเป็นสีทองจนถึงสีน้ำตาลแดง ส่วนใบมีขนาดเล็กลง สีเหลือง ทรงพุ่มมีขนาดเล็ก ในระยะที่เชื้อเข้าทำลายระบบรากค่อนข้างรุนแรงแล้ว จะทำให้ใบร่วงและยืนต้นตายในที่สุด จากการศึกษาของ (สายทอง แก้วฉาย, 2556) พบว่าต้นยางอายุน้อยสามารถชักนำให้เกิดการติดเชื้อได้ง่ายกว่าต้นยางอายุมาก

1.5 กลไกการเข้าทำลายของเชื้อ *Rigidoporus lignosus*

กลไกการเข้าทำลายของเชื้อ *Rigidoporus lignosus* มี 3 ขั้นตอนคือ

1) ไรโซมอฟของเชื้อราเจริญอยู่ผิวรากภายนอก

2) เมื่อไม่มีอาหารจากภายนอกหรือดินขาดออกซิเจน เชื้อราจะเข้าทำลายเซลล์รากพืชโดยไรโซมอฟจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นเส้นใยที่มีผนังเซลล์ที่บางขึ้นเพื่อเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อปลดปล่อย extracellular enzyme เข้าย่อยสลายเนื้อไม้ เช่น การปลดปล่อย lytic enzyme เพื่อย่อยสลายสารพวกคาร์โบไฮเดรตในผนังเซลล์ของไม้ ซึ่งในช่วงการเข้าทำลายจะผลิต cellulolytic enzyme เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสโดยการปล่อยเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อให้ได้แหล่งอาหารที่เป็นคาร์บอนก่อนจะเข้าไปย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลส เพื่อเจริญอยู่ภายในเซลล์พืช นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์แลคเคสที่เชื้อราปลดปล่อยออกมาในช่วงการแทงผ่านเข้าไปในรากของต้นยาง เอนไซม์นี้มีบทบาทในการควบคุมเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อย่อยสลายลิกนินและทำให้มีการสะสมของฟีนอล ซึ่งมีผลในการต่อต้านการสร้างลิกนินของพืชด้วย นอกจากนี้เส้นใยยังสามารถเข้าสู่รากโดยผ่านทางช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ทางบาดแผล เป็นต้น (สายทอง แก้วฉาย, 2556)

3) เส้นใยเจริญอยู่ภายในเซลล์พืชโดยการย่อยผนังเซลล์ของระบบท่อลำเลียงน้ำท่อลำเลียงอาหาร และแพร่กระจายสู่เซลล์อื่นโดยการแทงผ่านทางช่องว่างและท่อต่าง ๆ ของเซลล์ จึงสามารถพบเส้นใยเชื้อราได้ทั้งระหว่างเซลล์ ในเซลล์และในผนังเซลล์ และพบว่าการที่เชื้อเจริญอยู่ภายในท่อลำเลียงอาหารทำให้น้ำยางตกตะกอนจับเป็นก้อนส่งผลให้ปริมาณน้ำยางในต้นยางลดลง (สายทอง แก้วฉาย, 2556)

1.6 การป้องกันและการกำจัด

วิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชแปรผันไปตามพื้นที่วิธีการปลูก และวิธีการที่ซึ่งนักวิชาการได้ศึกษาวิจัยค้นคว้า เพื่อหาวิธีการป้องกันกำจัดให้ได้ผล ปัจจุบันการป้องกันกำจัดโรครากขาวของยางพารา จะใช้วิธีผสมผสานระหว่างวิธีการใช้สารเคมี และชีววิธี หรือการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.6.1 การใช้สารเคมี

หลักการป้องกันกำจัดที่สำคัญ คือ การป้องกันการแพร่กระจายจากต้นที่เป็นโรคไปยังต้นปกติ ควรทำในระยะแรก ๆ หรือเมื่อต้นยางพาราอายุประมาณ 1 ปี และทำอย่างต่อเนื่อง ถ้าโรคนี้ปรากฏควรกำจัดต้นที่เป็นโรคทิ้ง กำจัดเศษซากไม้ให้หมดจากพื้นที่ก่อนปลูกยางพารา เพื่อลดแหล่งเชื้อสาเหตุโรคในแหล่งที่มีการระบาด ภายหลังจากที่เตรียมดินปลูกแล้ว ควรปลูกพืชตระกูลถั่วเพื่อปรับสภาพดินให้เหมาะกับการเจริญเติบโตของพืช และจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพืช หลังปลูกยางแล้วควรตรวจสอบการเกิดโรคอย่างสม่ำเสมอในพื้นที่ที่มีโรคมาก่อน อาจผสมดินปลูกด้วยกำมะถันผงหรือ PCNB ก่อนปลูกยางพารา ปรับสภาพดินไม่ให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุ ถ้าพบต้นที่เป็นโรคขุดล้อมรอบ ๆ ต้นยางพาราที่เป็นโรค เพื่อไม่ให้โรคแพร่กระจายสู่ต้นอื่น และโรยด้วยผงกำมะถันหรือ PCNB หรือ ราดโคนต้นด้วย tridermoph, cyproconazole, propiconazole, hexaconazole, หรือ feniclonit หรือขุดและตัดรากยางที่เป็นโรคนำไปเผาไฟทิ้ง และทาบริเวณที่เป็นโรคด้วยสารเคมี เช่น คาร์โบลิเนียม (carbolineum) (ปวีณา สังข์แก้ว, 2556)

1.6.2 การใช้ชีววิธี หรือการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

การป้องกันกำจัดโดยชีววิธีเป็นวิธีที่ช่วยลดการใช้สารเคมี กลไกของชีววิธีนั้นเป็นวิธีที่ซับซ้อนประกอบกันหลายวิธี ดังนั้นน่าจะเป็นทางเลือกในการเปลี่ยนมาใช้วิธีนี้แทนการใช้สารเคมี เนื่องจากสารเคมีมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม (สายทอง แก้วฉาย, 2556)

การใช้ชีววิธีในการป้องกันกำจัดโรคพืช หมายถึง การใช้จุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมโรคพืชได้ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Antagonistic microorganism) อาจเป็นเชื้อราหรือแบคทีเรีย รวมถึงการใช้สารที่ผลิตจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Pal and Gardenner, 2006) การป้องกันกำจัดโดยชีววิธี หรือการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันกำจัดโรครากขาวของยางพารา มีรายงานมากมายและมีการศึกษามาเป็นระยะเวลานาน เช่น *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. และ *Trichoderma* spp. มีรายงานว่าเป็นเชื้อราปฏิปักษ์กับโรครากขาว (สายทอง แก้วฉาย, 2556) ได้รายงานว่า *Aspergillus* spp. เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพต่อโรคเน่าขาวที่เกิดจากเชื้อกลุ่มBasidiomycetes Bruce and Highley (1991) ได้รายงานว่า *Aspergillus* spp. สามารถย่อยเส้นใยของเชื้อโรค ณ จุดที่สัมผัสกันได้ ทำให้เชื้อโรคตายเมื่อทดลองเลี้ยงร่วมกันในอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ (สายทอง แก้วฉาย, 2556)

2. จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

2.1 แบคทีเรีย *Streptomyces* spp.

Streptomyces spp. เป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Streptomycetaceae* ซึ่งเป็นสกุลที่มีอยู่จำนวนมากและสำคัญที่สุดในแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีลักษณะคล้ายเชื้อรา อาศัยอยู่ทั่วไป ทั้งในดิน น้ำ อากาศ ฝุ่นละออง โดยสามารถสร้างเส้นใยที่เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (substrate mycelium) และเจริญอยู่เหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ (aerial mycelium) ลักษณะเส้นใยจะไม่มีผนังกั้นและมีหลายสี เช่น สีแดง เหลือง เหลืองแกมเขียว ดำ และน้ำตาล เป็นต้น (ปวีณา สังข์แก้ว, 2556) เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ aerial mycelium จะสร้างสปอร์ที่มีลักษณะเป็นรูปแบบต่างๆ เช่น สปอร์โค้งงอ รูปขอ วงกลมปลายเปิด หรือขดเป็นวงซ้อนกัน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 ไมโครเมตร (อนันต์ วงเจริญ, 2547) ในระยะแรกลักษณะผิวโคโลนีจะเรียบ เมื่ออายุมากขึ้นผิวของโคโลนีมีลักษณะคล้ายแป้งหรือกำมะหยี่ ปวีณา สังข์แก้ว (2556) รายงานว่า *Streptomyces* spp. สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย (anti-bacterial agent) เช่น ampicillin, penicillin-N ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงเบต้าแลคแทม ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย และนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้อีกหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารปฏิชีวนะบางชนิดที่ผลิตจากเชื้อในสกุล *Streptomyces* และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

สารปฏิชีวนะ	***Streptomyces* sp. ที่ผลิต**	**เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง**
Amphotericin B	*S. nodosus*	เชื้อรา
Chloramphenical	*S. venezuelae*	แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ริกเกตเซีย ไวรัส
Erythromycin	*S. crythreus*	แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ โปรโตซัว
kanamycin	*S. kanamyceticus*	แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ โปรโตซัว
Vancomycin	*S. orientalis*	แบคทีเรียแกรมบวก
Aureomycin	*S. aureofaciens*	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Streptomycin	*S. griseus*	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

สารปฏิชีวนะ	*Streptomyces* sp. ที่ผลิต	เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง
Neomycin	*S. fradiae*	แบคทีเรียแกรมลบ
Tetracycline	*S. rimosus*	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
Novobiocin	*S. spheroids*	แบคทีเรียแกรมบวก
Coumermycin	*S. rishiriensis*	แบคทีเรียแกรมบวก
Clorobiocin	*S. roseochromogens*	แบคทีเรียแกรมบวก
Lincomycin	*S. lincolnensis*	แบคทีเรีย
Rapamycin	*S. hygroscopisus*	เชื้อรา

ที่มา: อนันต์ วงเจริญ, 2547

2.1.1 การใช้ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโดยชีววิธี

Streptomyces spp. เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตรมาก เนื่องจากสามารถสร้างสารได้หลายชนิด และสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolytic enzyme เช่น cellulose, amylase และ glycanase เป็นต้น ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อรา ในยศวดี อุดมพิทักษ์เดชา (2552) รายงานว่า *S. lydicus* WYEC 108 มีความสามารถในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด โดยการสร้างสาร extra cellular antifungal metabolite และเมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่า *S. lydicus* WYEC 108 สามารถยับยั้งการงอก oospore ของเชื้อรา *Pythium ultimum* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่าและเมล็ดเน่าของข้าวโพดได้ นอกจากนี้ยังสามารถทำลายผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราได้

2.2 แบคทีเรีย *Bacillus* spp.

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Bacillaceae ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ *Clostridium* และ *Desulfotomaculum* มีรูปร่างท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า (flaggella) ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) แต่บางชนิดเป็น facultative anaerobe เป็นแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) สปอร์แบคทีเรียของ *Bacillus* จะทนต่อความร้อน ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ดี *Bacillus* spp. เป็น protiolytic bacteria มีเอนไซม์ที่

สามารถย่อยโปรตีนในอาหารให้เป็นกรดอะมิโน เป็นจุลินทรีย์สาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสียเกิดกลิ่นเหม็น แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) อุณหภูมิที่เจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 30-45 องศาเซลเซียส แต่บางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) ซึ่งเป็นสาเหตุการเสื่อมเสียของอาหารกระป๋อง (canned food spoilage) และยังพบบางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) เจริญได้ในในช่วง pH 2-11 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

2.2.1 *Bacillus amyloliquefaciens*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนเรียงต่อกันเป็นสาย มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-0.9 x 1.8-3.0 ไมโครเมตร เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ สร้างสปอร์แบบ ellipsoidal ตำแหน่ง central, paracentral และ subterminal ไม่ทำให้เซลล์โป่ง ไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลาย casein, elastin, esculin, gelatin และ starch สามารถเจริญในอาหาร nutrient broth ผสมเกลือ NaCl 5 % และส่วนใหญ่ทนได้ถึง 10 %

3. การใช้แบคทีเรียเพื่อรักษาโรคพืช

ในกรณีที่พืชเริ่มแสดงอาการทรุดโทรมไม่รุนแรงนัก การใช้เชื้อแบคทีเรียใส่ลงดินใต้ทรงพุ่มเพื่อหยุดยั้งการเข้าทำลายระบบรากของเชื้อโรค ช่วยปกป้องรากใหม่ และช่วยลดปริมาณเชื้อโรคในดินลง จะช่วยให้ต้นพืชสามารถฟื้นจากสภาพทรุดโทรมกลับคืนสู่สภาพปกติได้ ในกรณีที่พืชแสดงอาการทรุดโทรมค่อนข้างมาก แสดงว่าระบบรากส่วนใหญ่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลายแล้ว การใช้เชื้อจุลินทรีย์แต่เพียงอย่างเดียวจะไม่สามารถช่วยฟื้นฟูสภาพทรุดโทรมของพืชได้ทันการ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องใช้วิธีการอื่นร่วมด้วย เช่น การใช้สารเคมี เป็นต้น

3.1 กลไกการต้านทานโรค

ความต้านทานโรคเป็นความสามารถของพืชที่จะป้องกันหรือยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค แม้อาจจะมีเชื้อเข้าอาศัยในพืชได้บ้าง แต่ก็ไม่สามารถทำให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงต่อพืช ความต้านทานโรคนี้อาจมีอยู่ได้หลายระดับขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อในการทำให้เกิดโรค ระดับความต้านทานโรคของพืชนี้ไม่ได้เป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากพืชเพียงฝ่ายเดียว แต่เป็นผลที่เกิดจาก

ปฏิกิริยาร่วมกันทั้งสองฝ่ายระหว่างพืชกับเชื้อ กระบวนการตอบสนองของพืชที่ทำให้เกิดความต้านทานโรคมี 2 ลักษณะ คือ

3.1.1 การแสดงความต้านทานโดยทำการยับยั้งที่จุดสัมผัสกับเชื้อ และกระบวนการติดเชื้อซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเฉพาะแห่ง และทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อที่จุดนั้นอย่างรวดเร็ว

3.1.2 การแสดงความต้านทานโดยไปยับยั้งกระบวนการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อ แม้ว่าจะมีการติดเชื้อเกิดขึ้นแล้ว

4. การคัดแยกจุลินทรีย์จากดิน

การคัดแยกจุลินทรีย์จากดินนั้นมีหลายวิธี เช่น การใช้เหยื่อล่อ (Baiting technique) การใช้สารแขวนลอยดินเจือจาง (Soil dilution plating) หรือการใช้วิธีล้างดิน (Soil washing) เป็นต้น จะเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ และชนิดของเชื้อที่ต้องการ

4.1 การแยกเชื้อโดยการใช้เหยื่อล่อ (Baiting technique)

วิธีการนี้ใช้สำหรับแยกเชื้อบางชนิดทั้งกลุ่มของเชื้อรา และกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย ที่อาจเจริญได้บนเหยื่อล่อโดยไม่มีสิ่งอื่นมาปะปน หรือการปลูกพืชที่อ่อนแอลงไปในดินก็เป็นวิธีหนึ่งในการใช้เหยื่อล่อเชื้อที่อยู่ในดินด้วยเช่นกัน การเลือกเหยื่อล่อและวิธีการทดลองนั้นทำได้หลายลักษณะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่ต้องการแยกเป็นหลัก เช่น หากต้องการแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน อาจใช้ชิ้นแตงกวา มันฝรั่ง แครอท หรือ แอปเปิ้ล เป็นเหยื่อล่อ ทำได้โดยการสุ่มตัวอย่างดินมาประมาณ 500 กรัม ใส่ลงในกล่องพลาสติกแล้ววางชิ้นพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวลงบนผิวหน้าดิน และกดให้ชิ้นพืชจมลงไปประมาณ 0.5 เซนติเมตร ปิดฝากล่อง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน จะพบว่ามีเชื้อราเจริญขึ้นบนชิ้นพืชจากนั้นจึงนำไปตรวจสอบชนิดของเชื้อต่อไป

4.2 การแยกเชื้อจากดินโดยตรง (Direct soil plating)

วิธีการนี้มักใช้กับเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์หรือสร้างเฉพาะเส้นใยในดิน ซึ่งส่วนใหญ่ไม่สามารถแยกได้ง่ายโดยวิธี Soil dilution plating เช่น *Dictyostelium, Mortierella, Pythium* และ *Basidiomycotina* หลายชนิด วิธีการนี้ทำได้โดยการนำดินที่ต้องการแยกเชื้อมาใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5-15 มิลลิกรัม จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Cool molten agar 10-15 มิลลิลิตร ลงไป เอียงจานเพาะเชื้อหรือใช้ช้อนตักสารขนาดเล็กเกลี่ยให้ดินกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ หากดินที่นำมาใช้จับตัวกันแน่นควรกดให้แตกละเอียดเสียก่อน หรือหากเป็นดินเหนียวอาจหยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

ลงไปบ้างเล็กน้อยเพื่อให้ดินกระจายได้ดีขึ้น หรือหากดินนั้นมีจำนวนเชื้อมาก อาจเจือจางได้โดยใช้ทรายหรือดินนึ่งฆ่าเชื้อผสมลงไปในอัตราส่วนที่แน่นอน

4.3 การแยกเชื้อจากสารแขวนลอยดินเจือจาง (Soil dilution plating)

เป็นวิธีที่สามารถใช้แยกเชื้อในดินหลายกลุ่มเช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และ Actinomyces แต่นิยมให้แยกในกลุ่มของเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากเชื้อราสามารถสร้างสปอร์ได้จำนวนมาก และมีสมาชิกในกลุ่มจำนวนมาก ทำให้กระจายในดินได้ทั่ว จึงง่ายต่อการแยกมากกว่าเชื้ออื่น ๆ สำหรับวิธีการแยกเชื้อโดยวิธีนี้ทำได้โดยการนำดินที่ต้องการแยกเชื้อมาจำนวน 10 กรัม ใส่ลงใน flask ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้ดินกระจายตัว 20-30 นาที (อาจใช้เครื่องเขย่า, Magnetic stirrer หรือ Blender กรณีหลังจะช่วยในการแยกเชื้อราที่มีการสร้างสปอร์ในจำนวนน้อยได้ดีกว่าเครื่องมืออีกสองชนิด) ต่อจากนั้นทิ้งสารแขวนลอยของดินให้นิ่งสักครู่ แล้วจึงใช้ pipette (อาจเกิดการอุดตันได้ง่ายหากใช้ขนาดที่มีปลายดูดแคบ หากเป็นไปได้ควรใช้กระบวยขนาดเล็กแทน) ดูดมา 10 มิลลิลิตร นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตรอีกครั้ง เขย่าให้เข้ากันนาน 1 นาที แล้วเจือจางต่อไปแบบเดิม เมื่อถึงระดับความเข้มข้นตามต้องการแล้วจึงนำ 1 มิลลิลิตร ของสารแขวนลอยดินไปเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่เตรียมไว้โดยวิธี Spread plate สำหรับเชื้อรา พบว่าความเข้มข้นที่ดีควรมีเชื้อราเจริญบนอาหาร 50-150 โคโลนีต่อเพลท ซึ่งส่วนใหญ่มักอยู่ที่ความเข้มข้น 10^{-4}-10^{-5} ส่วนเชื้อแบคทีเรียนั้นส่วนใหญ่มักเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-5}-10^{-6} และ 10^{-3}-10^{-4} สำหรับเชื้อ Actinomyces

4.4 การแยกเชื้อจากดินบริเวณรากพืช (Pathogen isolation from the rhizosphere)

การแยกเชื้อจากดินบริเวณรากพืชนั้น จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างดินโดยการขุดต้นพืชให้มีรากติดขึ้นมาด้วย นำรากพืชที่ได้มาเขย่าเบาๆ เพื่อกำจัดดินส่วนใหญ่ออกไปให้เหลือเฉพาะดินที่ติดแนบอยู่กับผิวราก จากนั้นจึงตัดรากบริเวณที่ต้องการนำไปแยกเชื้ออาจใช้วิธี Soil dilution plating หรือ Direct soil plating ก็ได้หากใช้วิธี Soil dilution plating สามารถทำได้โดยการนำรากที่ตัดไว้ ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวที่บรรจุน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่วัดปริมาตรแน่นอนเอาไว้แล้ว เขย่าหลอดให้ดินหลุดออกจากรากให้มากที่สุด นำรากออกมาใส่ในน้ำกลั่นแบบเดิมอีกรอบ นำสารแขวนลอยดินที่ได้จากทั้งสองครั้งมารวมกัน จากนั้นนำ 1 มิลลิลิตร มาแยกเชื้อโดยวิธี Spread plate (หากต้องการทราบน้ำหนักของดินที่นำมาแยกเชื้อ อาจใช้วิธีการล้างออกจากรากพืชด้วยน้ำแล้วนำสารแขวนลอยดินนั้นไประเหยเอาน้ำออก โดยอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)

4.5 การแยกเชื้อจากชิ้นพืช (Pathogen isolation from plant parts)

ในการแยกเชื้อจากชิ้นพืชที่เป็นโรคนั้น ขั้นตอนแรกควรมีการตรวจหาส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อ เช่น กรณีของเชื้อราอาจตรวจดู Fruiting body เส้นใย หรือสปอร์ สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ควรตรวจดูเซลล์ของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์เสียก่อน หลังจากนั้นจึงดำเนินการในขั้นตอนของการแยกเชื้อต่อไป วิธีที่ใช้ในการแยกเชื้อจากชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรคนั้นมีหลายวิธี จะเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของโรคและลักษณะของเชื้อเป็นสำคัญ

4.6 การแยกเชื้อพวกที่เป็นปรสิตแบบถาวร (Isolation of Obligate parasite)

ในการแยกเชื้อพวกที่เป็นปรสิตแบบถาวร (Obligated parasite) หรือเชื้อที่มักมีการปนเปื้อนกับเชื้ออื่น ๆ อยู่เสมอนั้นควรนำเทคนิคในการปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัย (Host inoculation) มาใช้จะช่วยขจัดเชื้อตัวอื่นที่ปนเปื้อนอยู่ออกไปได้

4.7 การแยกเชื้อโดยตรงจากแผล (Direct isolation from infected tissue)

ในการแยกเชื้อโดยตรงจากแผลโรคโดยตรง เป็นวิธีการที่ค่อนข้างเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้ออื่นที่อาจแฝงปะปนอยู่ในแผลโรคแต่มีข้อดีคือสามารถแยกเชื้อได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงมักนิยมใช้แยกเชื้อที่พบว่าสามารถเจริญอยู่อย่างอิสระไม่ปะปนกับเชื้ออื่น หรืออาจใช้กับเชื้อที่เจริญเติบโตช้า

4.8 แยกเชื้อจากเมล็ดพืช (Isolation from infected seed)

เชื้อสาเหตุโรคพืชที่สามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ดได้นั้น เป็นเชื้อที่อาจติดไปกับเมล็ดได้หลายทาง เช่น อาจติดไปกับผิวภายนอกเมล็ด หรือเชื้อเข้าไปอาศัยอยู่ภายในเมล็ด หรือเชื้ออาจปนเปื้อนไปกับเศษซากพืช ภาชนะบรรจุเมล็ด เป็นต้น ซึ่งกรณีหลังไม่นับว่าเป็น Seed borne pathogen ในการแยกเชื้อกลุ่มนี้ มีวิธีการแยกเชื้อได้หลายวิธี ในกรณีของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียอาจใช้การเพาะเมล็ดบนวุ้น (Agar method) หรือกระดาษชื้น (Blotter method) ซึ่งทั้งสองวิธีนี้สามารถชักนำให้เชื้อที่ติดมาทั้งบนและในเมล็ดเจริญออกมาได้อย่างดี และเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาเชื้อที่ติดมากับเมล็ดกันอย่างกว้างขวาง

4.8.1 Blotter method วิธีการนี้เป็นวิธีที่ให้ผลดีและประหยัดค่าใช้จ่าย ส่วนใหญ่มักใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อที่ติดมากับเมล็ดในจำนวนเมล็ดปริมาณมาก วิธีปฏิบัติอาจมีการประยุกต์เพื่อความเหมาะสมและความสะดวกแล้วแต่กรณี แต่โดยทั่วไปมีวิธีการดังนี้

1) นำกระดาษซับที่ค่อนข้างหนาซ้อนกัน 2-3 ชั้น จุ่มลงในน้ำกลั่นให้เปียกทั่ว ยกขึ้นให้น้ำส่วนเกินไหลออกไป จากนั้นนำกระดาษบรรจุลงในถุงพลาสติก หรือห่อด้วย Aluminum foil นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมากรุในภาชนะ เช่น กล่องพลาสติก จาน แก้วหรืออื่น ๆ ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2) นำเมล็ดที่ต้องการแยกเชื้อ (เมล็ดนั้นอาจผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวหรือไม่แล้วแต่วัตถุประสงค์ของการทดลอง) วางลงไปบนกระดาษชื้น โดยวางให้เมล็ดห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร นำภาชนะไปเก็บไว้ในอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญ และการสร้างสปอร์ของเชื้อรา ประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-15 วัน

4.8.2 Agar method วิธีการนี้มักใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อวิธีการโดยทั่วไป มีดังนี้

1) นำเมล็ดฆ่าเชื้อที่ผิว (หากใช้ Selective media ขั้นตอนนี้อาจไม่จำเป็นต้องใช้) โดยแช่ เมล็ดใน Disinfectant เช่น 1-3 % NaCl นาน 3-5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1-2 ครั้ง

2) นำเมล็ดไปวางบนผิวหน้าอาหารหากไม่ต้องการให้โคโลนีของเชื้อราเจริญมากนักอาจเติม 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ Rose Bengal หรือ 1% Oxgall ลงไปในอาหาร นอกจากนั้นการเติมสารปฏิชีวนะ เช่น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ Streptomycin sulfate ลงไปจะช่วยในการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียได้และควรระมัดระวังถึงผล pH ของอาหารที่จะมีต่อลักษณะของโคโลนีของเชื้อ ซึ่งอาจมีผลต่อการจำแนกชนิดของเชื้อได้ภายหลัง นอกจากจะมีปัญหาของการปนเปื้อนของเชื้อที่เป็น Saprophyte เช่น *Neurospora, Rhizopus* หรือ *Trichoderma* ค่อนข้างสูงแล้ว วิธีการนี้นับว่ายุ่งยากและสิ้นเปลืองมากกว่าการใช้ Blotter method

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อรวรรณ ปิยะบุญ และคณะ (2550) ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยใช้ *Tricoderma hazianum* (CB-PIN-01) *Tricoderma hazianum* (PM51) *Bacillus subtillis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* (197KB) ในการควบคุมโรคใบร่วงและฝักเน่าในยางพาราที่เกิดจากเชื้อราไฟทอปโทรา โดยสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบคือ *Phytophthora parasitica* ด้วยวิธี dual culture โดยวางชิ้นวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ของเชื้อราไฟทอปโทรากับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกัน พบว่าเชื้อ *Tricoderma hazianum* (CB-PIN-01) *Tricoderma hazianum*

(PM51) *Bacillus subtillis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* (197KB) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phytophthora parasitica* ในระดับห้องปฏิบัติการ จากการเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* ของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. hazianum* (CB-PIN-01) กับ *T. hazianum* (PM51) พบว่า มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และจากการเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtillis* และ*B. amyloliquefaciens* (197KB) พบว่ามีประสิทธิภาพแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดย *B. amyloliquefaciens* มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* ได้ดีกว่า *B. subtillis*

สิริรัตน์ จงฤทธิพร (2549) ศึกษาเกี่ยวกับการทดลองผลิตแผ่นฟิล์มไคโตซาน 2 ชนิดได้แก่ แผ่นฟิล์ม O เตรียมจากสารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.5 % ในกรดอะซิติก 1 % ส่วนแผ่นฟิล์ม A เตรียมจากสารละลายไคโตซานที่เติมสารสกัดจากกระเทียม (Allicin) 2.5 % โดยปรับ pH ให้ได้ 6.0 ก่อนขึ้นรูปเป็นฟิล์ม แล้วนำฟิล์มทั้งสองมาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Penicillium roquefortii* และ *Aspergillus awamori* เปรียบเทียบกับ control ซึ่งใช้กระดาษแก้ว โดยนำแผ่นฟิล์มขนาด 5x5 เซนติเมตร วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อปริมาณ 10^3 CFU/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar หลังจากการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-10 วัน พบว่าแผ่นฟิล์ม A มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อราได้ทั้ง 2 ชนิด แต่จะยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus awamori* ได้มากกว่า *Penicillium roquefortii* คือไม่พบเชื้อรารอบแผ่นฟิล์มและวัดบริเวณใสรอบแผ่นฟิล์มได้ 0.5 และ 0.3 เซนติเมตร ในจานเลี้ยงเชื้อตามลำดับ สำหรับแผ่นฟิล์ม O พบเชื้อราขึ้นรอบแผ่นฟิล์ม แต่ไม่พบเชื้อราบนแผ่นฟิล์ม ในขณะที่จานควบคุม พบเชื้อราทั้งสองโดยรอบแผ่นและบนกระดาษแก้ว จากผลการทดลองสรุปได้ว่า แผ่นฟิล์มไคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อรา *Penicillium roquefortii* และ *Aspergillus awamori* ได้ และการเติมสารสกัดจากกกระเทียมในแผ่นฟิล์มทำให้มีการยับยั้งเชื้อราเพิ่มขึ้น

บัวสาย เพชรสุริยวงศ์ และคณะ (2555) ศึกษาการคัดแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียจากดินที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา จากการทดลองแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท รหัส B1, B2, B3, B4, B5 และ B6 มีคุณสมบัติในการผลิตสารยับยั้ง โดยพบว่าแบคทีเรียรหัส B3, B4 และ B5 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้กว้าง (Broad-spectrum) คือสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่นำมาทดสอบได้หลายชนิด

โดย 1 ไอโซเลท คือแบคทีเรียรหัส B5 ซึ่งถูกจัดจำแนกเป็นเชื้อ *B. amyloliquefaciens* มีประสิทธิภาพในการผลิตสารยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุด

ปวีณา สังข์แก้ว (2556) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* โดยการแยกเชื้อ *Streptomyces* sp. จำนวน 258 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินในสวนยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย นำมาทดสอบกับการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture plate พบว่า *Streptomyces* sp. S106 และ S110 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 83.57 และ 74.29 ตามลำดับ และนำเชื้อ *Streptomyces* sp. S106 และ S110 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ในดินในหลอดทดลอง พบว่า *Streptomyces* sp. S106 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ S110 และชุดควบคุม

สุภาภรณ์ เอี่ยมเช่ง และมารีนา หารง (2557) ศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมี 2 ชนิด ได้แก่ ไตรเดอร์มอร์ฟ และไตรอาร์โซลที่ความเข้มข้น 1-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 10-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ไตรเดอร์มอร์ฟ ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. lignosus* ได้ทุกไอโซเลท และศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานที่ความเข้มข้น 10-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา พบว่า ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. lignosus* ได้ดีที่สุด และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ทุกไอโซเลท

สายทอง แก้วฉาย (2555) ศึกษาการใช้เชื้อรา *Asperrgillus niger, Chaetomium bostrychodes, Ch. cupreum* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรครากขาวในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อราที่ทดสอบทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้มากกว่า 50 % โดย *Ch. Cupreum* สามารถเจริญทับและสร้างสปอร์เหนือเส้นใยของราสาเหตุโรคได้ *Ch. Cupreum* ได้ผลิตเป็น biofungicide ในรูปแบบของผงและน้ำมันสามารถลดการเกิดโรคได้ระดับหนึ่งเมื่อนำเชื้อนี้ไปสกัดสารสกัดหยาบและทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่าสามารถยับยั้งได้ดี โดยมีค่า ED50 ที่ 170 mg/l

วันชัย อินทรพิทักษ (2550) ศึกษาการประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เพื่อนำไปใช้เป็นสารชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในหน่อไม้ฝรั่ง โดยแยกเชื้อราก่อโรคจากหน่อไม้ฝรั่งในพื้นที่อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ปล่อยจากตัวเซลล์โดยตรวจวัดการเกิด Inhibition zone ต่อเชื้อราก่อโรค จากการทดสอบพบว่า เชื้อแบคทีเรียรหัส Bt. k. ให้ผลในการควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดเท่ากับ 57.50 % และตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนอื่น ๆ ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* โดยวิธี paper disk method โดยใช้เศษเซลล์ น้ำเลี้ยงเซลล์ และตัวเซลล์อายุ 1 วัน พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ส่วนใหญ่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาภายนอกเซลล์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ปลดปล่อยออกมานั้น สามารถพัฒนาไปใช้ในภาคการเกษตรเพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีที่อาจส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อมได้

Ivan Petatan-Sagahon และคณะ (2011) ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Stenocarpella maydis* และ *Stenocarpella macrospora* สาเหตุก่อโรคฝักและเมล็ดเน่าในข้าวโพด โดยคัดแยกแบคทีเรียทั้งหมด 160 ไอโซเลท พบว่า มี 10 ไอโซเลทที่แสดงการยับยั้งเชื้อราก่อโรคฝักและเมล็ดเน่า โดยแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ดีที่สุด คือ *Pseudomonas* spp. สามารถยับยั้งได้ 70 % และแบคทีเรียที่ยับยั้งได้น้อยที่สุด คือ *Pseudomonas fluorescens* สามารถยับยั้งได้ 54 %

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1.1.1 หลอดทดลอง (Test tube)

1.1.2 จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)

1.1.3 บีกเกอร์ (Beaker)

1.1.4 ขวดรูปชมพู่ (Flask)

1.1.5 ปิเปต (Pipette)

1.1.6 กระบอกตวง (Cylinder)

1.1.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Burner)

1.1.8 แท่งแก้วคน (Stirring Rod)

1.1.9 ปากคีบ (Forcep)

1.1.10 กระดาษฟอยล์ (Aluminium Foil)

1.1.11 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

1.1.12 เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอ (Bent Needle)

1.1.13 ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)

1.1.14 แผ่นสไลด์ (Slide)

1.1.15 Cork berer

1.1.16 ไฟแช็ค (Lighter)

1.1.17 หลอดหยด (Dropper)

1.1.18 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

1.2 สารเคมี

1.2.1 แอลกอฮอล์ 70 %

1.2.2 คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)

1.2.3 ไอโอดีน (Iodine)

1.2.4 เอทิลแอลกอฮอล์ 95 %

1.2.5 ซาฟรานินโอ (Safranin o)

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3.1 Nutrient Agar (NA)

1.3.2 Potato Dextrose Agar (PDA)

1.3.3 Nitrate Broth (NB)

1.4 เชื้อรา

1.4.1 *Rigidoporus lignosus*

1.5 แบคทีเรีย

1.5.1 ตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกจากดิน

2. การดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแบคทีเรียจากดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณต้นยางพาราในสวนยางพารา 3 แหล่ง ได้แก่ สวนยางพาราอำเภอรือเสาะ จังหวัดนราธิวาส สวนยางพาราอำเภอยี่งอ จังหวัดนราธิวาส และสวนยางพาราอำเภอศรีสาคร จังหวัดนราธิวาส เก็บตัวอย่างดินแหล่งละ 1 จุด แล้วนำตัวอย่างดินที่ได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ จำนวน 10 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (Shaker) 120 รอบต่อนาที จากนั้นทิ้งให้ดินตกตะกอน แล้วนำมาเจือจางให้ได้ 10^{-1} ถึง 10^{-7} เลือกเฉพาะที่ระดับความเจือจาง 10^{-5} กับ 10^{-6} ทำการแยกเชื้อโดยวิธี Pour plate นำเชื้อที่แยกได้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak plate แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนีที่เจริญ โดย

ต้องทำการแยกแบคทีเรียให้ได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลท จากนั้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยการย้อมสีแกรมและบันทึกลักษณะการติดสีแกรม รูปร่าง การจัดเรียงตัว และขนาดเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อรา (อรวรรณ ปิยะบุญ และคณะ, 2550)

เชื้อรารากขาว *Rigidoporus lignosus* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยยางจังหวัดสงขลา แล้วนำมาเลี้ยงขยายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ต่อไป นำ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว มาเจาะชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา *R. lignosus* นำไปวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นของแบคทีเรียวางไว้ 4 จุดในแนวจัตุรัส โดยวางให้ห่างจากขอบของจานเพาะเชื้อ 1.5 เซนติเมตร หนึ่งจานเพาะเชื้อจะมีแบคทีเรียในแต่ละไอโซเลทวางไว้ 4 จุด และมีเชื้อราวางไว้ตรงกลาง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) ดูผลทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน ทำลักษณะเดียวกันจนครบ 30 ไอโซเลท ส่วน Positive control จะวางเฉพาะเชื้อรา *R. lignosus* ไว้ตรงกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ส่วน Negative control จะเติมไคโตซาน 0.06 กรัม ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเจาะชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา *R. lignosus* นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติมไคโตซาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ)

บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของเชื้อราที่เจริญในชุดทดสอบ มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

เมื่อ A = ขนาดของโคโลนีเชื้อราในชุดควบคุม

B = ขนาดของโคโลนีเชื้อราที่ถูกยับยั้งด้วยแบคทีเรียในชุดทดสอบ

2.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่ยับยั้งเชื้อราเป้าหมาย

คัดเลือกไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. lignosus* ได้ดีมาศึกษา โดยได้ทำการย้อมสีแกรมเพื่อยืนยันผลการศึกษาเบื้องต้น จากนั้นนำมาทดสอบทางชีวเคมีเพื่อศึกษาคุณสมบัติและจำแนกแบคทีเรียจนถึงระดับสปีชีส์

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแบคทีเรียจากดิน

เมื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียจากดินทั้ง 3 แหล่ง โดยในแต่ละแหล่งจะคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันมา 10 ไอโซเลท ได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลท สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1) ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม กลุ่มที่ 2) ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน กลุ่มที่ 3) ติดสีแกรมลบ รูปร่างกลม และกลุ่มที่ 4) ติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อน และมีลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัว ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม/รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	ขนาด(กว้าง*ยาว) (μm)
1	สีครีม กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	P/R	เดี่ยวและคู่	(1.0-1.0)*(1.5-3.0)
2	สีครีม กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	P/C	เดี่ยว คู่ และสาย	(0.5-1.0)*(0.5-2.5)
3	สีเหลือง กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	P/R	เรียงตัวเป็นคู่	(1.0-1.0)*(1.5-3.0)
4	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	P/R	เดี่ยว และคู่	(1.0-1.5)*(3.0-5.0)
5	สีเทาอ่อน กลม ขอบเรียบ ไม่นูน มันวาวเล็กน้อย ทึบแสง	N/C	เรียงตัวเป็นคู่	(0.5-1.0)*(1.0-2.5)
6	สีครีม กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	N/R	เรียงตัวเป็นคู่	(0.5-1.0)*(1.0-2.0)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม/รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	ขนาด(กว้าง*ยาว) (μm)
7	สีครีม กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว เล็กน้อย ทึบแสง	P/C	เรียงตัวเป็นกลุ่ม	(0.5-1.0)*(0.5-1.0)
8	สีครีม ค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ ไม่นูน มันวาว โปร่งแสง	P/R	เรียงตัวเป็นคู่	0.5-3.0)*(0.5-5.0)
9	สีครีม กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	P/C	เดี่ยว	(0.5-2.0)*(0.5-2.0)
10	สีครีม รูปร่างไม่แน่นอน ขอบคล้ายราก ไม่นูน วาวเล็กน้อย โปร่งแสงเล็กน้อย	P/C	เรียงตัวเป็นกลุ่ม	(0.5-1.0)*(0.5-1.0)
11	สีครีม กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	P/R	เรียงตัวเป็นคู่	(0.5-1.0)*(0.5-3.0)
12	สีครีม ค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	N/R	เรียงตัวเป็นสาย	(0.5-1.0)*(0.5-1.5)
13	สีครีม กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	N/C	เรียงตัวเป็นกลุ่ม	(0.5-1.0)*(0.5-1.0)
14	สีใส กลม ขอบเรียบ มันวาว นูนตรงกลาง ทึบแสง	P/R	เดี่ยว	(0.5-1.0)*(0.5-2.0)
15	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	P/C	เรียงตัวเป็นกลุ่ม	(0.5-1.0)*(0.5-1.0)
16	สีครีม กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	N/C	เรียงตัวเป็นสาย	(0.5-1.0)*(0.5-1.0)
17	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน มันวาวเล็กน้อย ทึบแสง	P/C	เรียงตัวเป็นคู่ สร้างสปอร์	(1.0-1.0)*(3.0-3.5)
18	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน มันวาวเล็กน้อย ทึบแสง	P/R	เรียงตัวเป็นคู่	(0.5-0.5)*(1.5-3.0)
19	สีขาวขุ่น ค่อนข้าง ขอบไม่เรียบ นูนตรงกลาง มันวาว โปร่งแสง	P/R	เดี่ยวและคู่สร้างสปอร์	(1.0-1.5)*(3.0-7.0)

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม/รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	ขนาด(กว้าง*ยาว) (μm)
20	สีครีม กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	P/R	เรียงตัวเป็นสาย	(0.5-1.0)*(0.5-5.0)
21	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ไม่นูน ไม่มันวาว ทึบแสง	P/C	เดี่ยว	(0.5-1.0)*(0.5-2.0)
22	สีครีม กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	N/C	เรียงตัวเป็นกลุ่ม	(0.5-1.0)*(0.5-1.0)
23	สีครีม กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	P/C	เรียงตัวแบบเดี่ยว	(0.5-1.0)*(0.5-1.0)
24	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน มันวาวเล็กน้อย ทึบแสง	P/C	เรียยงตัวแบบเดี่ยว	(0.5-1.0)*(0.5-1.0)
25	สีครีม กลม ขอบเรียบ ไม่นูน ไม่มันวาว ทึบแสง	P/R	เรียงตัวเป็นคู่	(0.5-1.0)*(2.0-5.0)
26	สีขาวขุ่น ค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ ไม่นูน ไม่มันวาว ทึบแสง	P/R	เดี่ยวและคู่ สร้างสปอร์ปลายเซลล์	(0.5-0.5)*(2.5-4.0)
27	สีขาวขุ่น ค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ ไม่นูน ไม่มันวาว ทึบแสง	P/R	เดี่ยว คู่ และสาย	(1.0-1.0)*(2.0-8.0)
28	สีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	P/C	เดี่ยวและกลุ่ม	(0.5-0.5)*(0.5-0.5)
29	สีขาว ค่อนข้างใส ค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ นูน ไม่มันวาว โปร่งแสง	N/R	เรียงตัวแบบเดี่ยว	(0.5-2.0)*(0.5-5.0)
30	สีครีม กลม ขอบเรียบ นูน มันวาว ทึบแสง	P/C	เรียงตัวแบบเดี่ยว	(0.5-1.0)*(0.5-1.0)

หมายเหตุ P = ติดสีแกรมบวก

N = ติดสีแกรมลบ

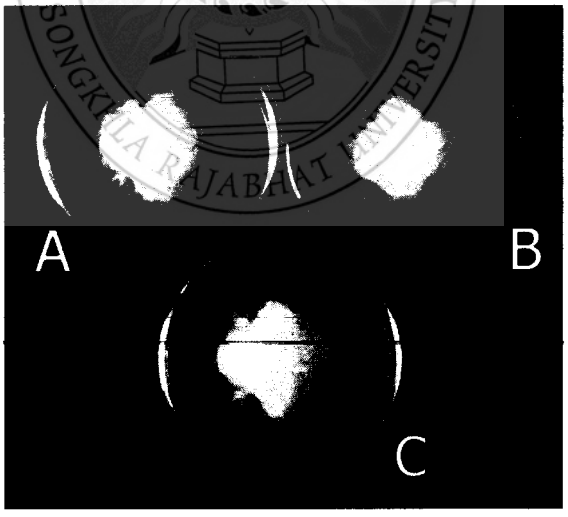
C = รูปกลม

R = รูปท่อน

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

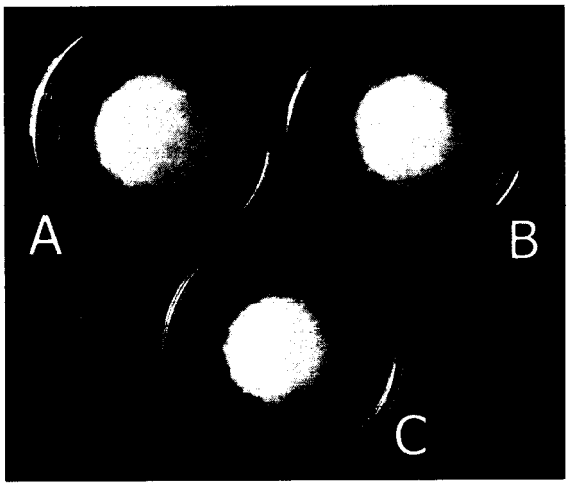
2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อรา

จาการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 30 ไอโซเลท พบว่า มีเพียงไอโซเลทเดียวเท่านั้นที่สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ คือ ไอโซเลทที่ 5 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 29.05 % ดังแสดงในภาพที่ 2 เมื่อเทียบกับชุด Negative control ที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชุด Negative control สามารถยับยั้งได้ดีกว่า โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 89.62 % ดังแสดงในภาพที่ 4 จากงานวิจัยของสุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง และคณะ (2557) ศึกษาการทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. lignosus* โดยใช้ไคโตซานความเข้มข้น 10, 100, 500, 1,000 และ 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยเชื้อรา *R. lignosus* นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติมไคโตซานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าไคโตซานแต่ละความเข้มข้นจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. lignosus* แตกต่างกัน ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. lignosus* ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งระหว่าง 81.67-98.33 % และขนาดของโคโลนีเชื้อราเป้าหมายในการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียแสดงดังตารางที่ 3

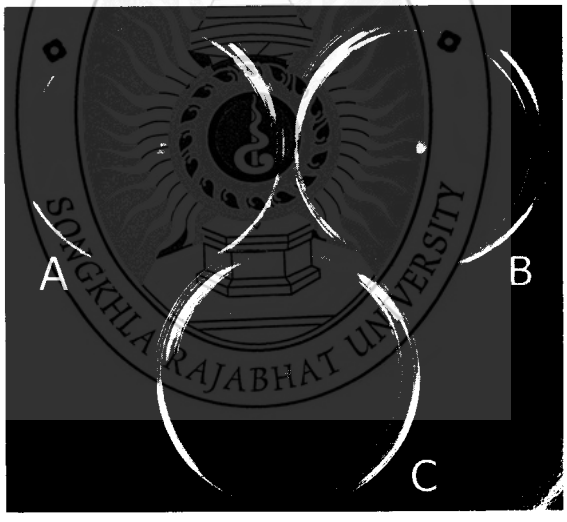


ภาพที่ 2 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. lignosus* ด้วยแบคทีเรียไอโซเลทที่ 5
A= ซ้ำที่ 1, B= ซ้ำที่ 2, C= ซ้ำที่ 3

ว
5ร10.3
ป 257 ป



ภาพที่ 3 แสดงผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. lignosus*
Positive control A= ซ้ำที่ 1, B= ซ้ำที่ 2, C=ซ้ำที่ 3



ภาพที่ 4 แสดงผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. lignosus* ด้วยไคโตซาน
Negative control A= ซ้ำที่ 1, B= ซ้ำที่ 2, C=ซ้ำที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรา *R. lignosus* ที่นำมาทดสอบกับแบคทีเรียที่แยกได้

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา(cm)
1	4.80±0.20
2	4.80±0.20
3	4.80±0.20
4	4.80±0.20
5	3.76±0.14
6	4.51±0.11
7	4.51±0.11
8	4.51±0.11
9	4.57±0.09
10	4.57±0.09
11	4.57±0.09
12	4.57±0.09
13	4.52±0.05
14	4.52±0.05
15	4.52±0.05
16	4.52±0.05
17	4.78±0.30
18	4.78±0.30
19	4.78±0.30
20	4.78±0.30
21	4.85±0.14
22	4.85±0.14
23	4.85±0.14
24	4.85±0.14

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา(cm)
25	4.56±0.07
26	4.56±0.07
27	4.56±0.07
28	4.56±0.07
29	4.62±0.07
30	4.62±0.07
Positive control	5.30±0.14
Negative control	0.55±0.08

หมายเหตุ Positive control = เชื้อ+อาหาร, Negative control = เชื้อ+ไคโตซาน+อาหาร

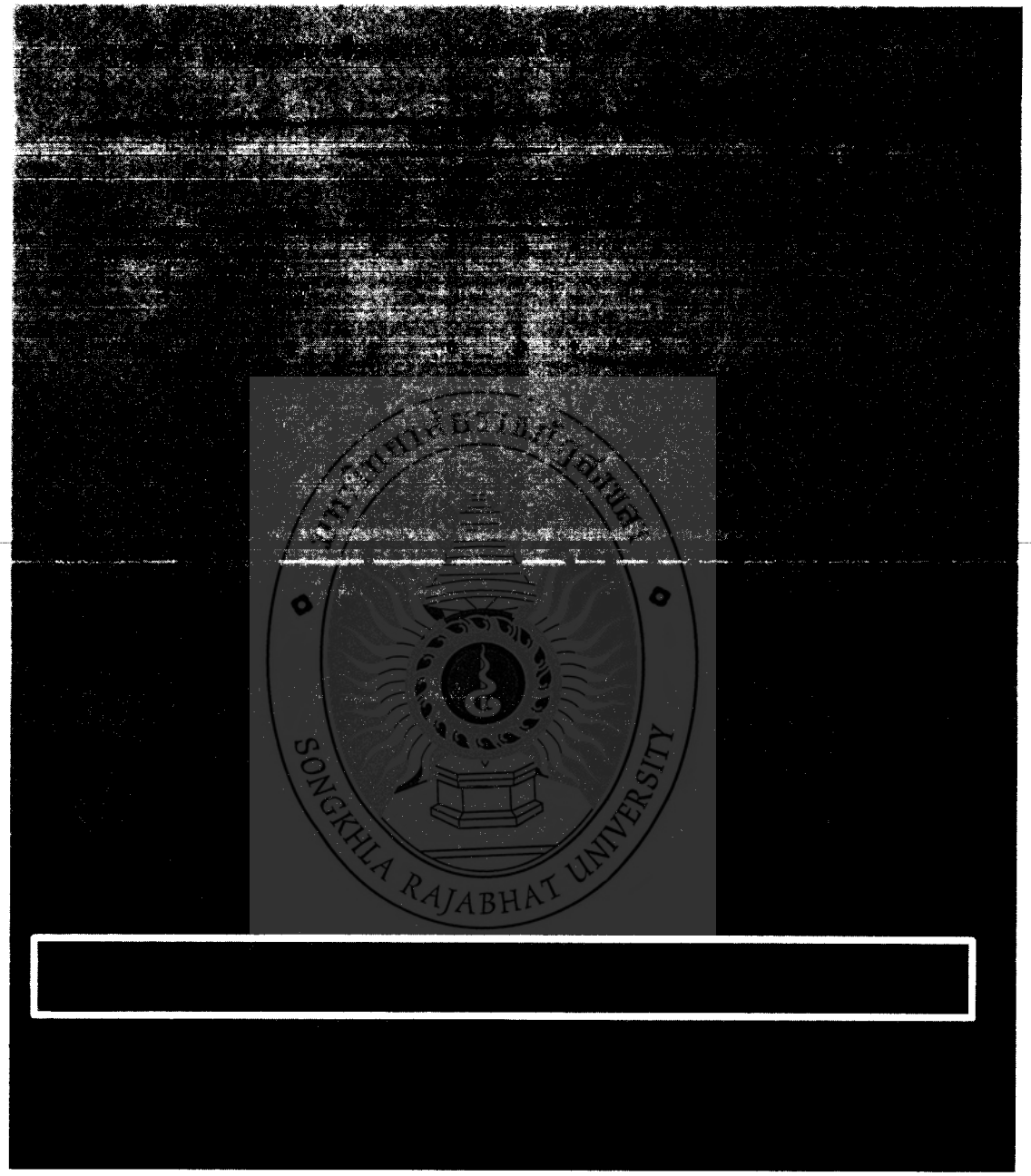
3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่ยับยั้งเชื้อรา

เป้าหมาย

จากการทดลองที่ 2 พบว่า มีเพียงไอโซเลทเดียวเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราราก ขาว *R. lignosus* ได้ คือ ไอโซเลทที่ 5 โดยไอโซเลทที่ 5 โคโลนีมีสีเทา กลม ขอบเรียบและทึบแสง เจริญบนอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปกลม การจัดเรียงตัวเป็นคู่ diplococci มีการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ การรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ได้ผลบวก และทดสอบการหมักน้ำตาลทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ glucose, sucrose, maltose, lactose ได้ผลลบ มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Branhamella catarrhalis* ตามรายงานการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์ของนันทนา อรุณฤกษ์ (2537) ดังแสดงในภาพที่ 5 และ 6

ภาพที่ 5 แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลทที่ 5 ; A= ลักษณะโคโลนีที่เจริญบน NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

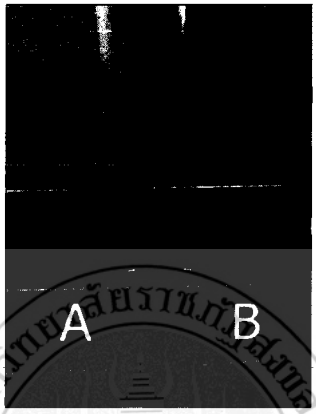
ภาพที่ 6 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของ *Neisseria* spp. และ *Branhamella catarrhalis*



ที่มา: หนังสือการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์ (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

3.1. ผลการทดสอบการรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตรต์

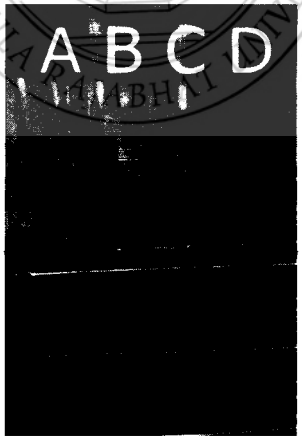
จากการทดสอบการรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ พบว่าได้ผลบวก คือ ไม่มีสีแดงเกิดขึ้นในขั้นตอนแรก และเมื่อเติมผงสังกะสีลงไปก็ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่า ไม่มี NO_3^- เหลืออยู่ นั่นคือแบคทีเรียสามารถรีดิวส์ NO_3^- ได้จนหมด และกลายเป็นแอมโมเนียหรือแก๊สไนโตรเจน (N_2) ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงผลการทดสอบการรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ ; A= ซ้ำที่ 1, B= ซ้ำที่ 2

3.2. ผลการทดสอบการสร้างกรดจากน้ำตาล

จากการทดสอบการสร้างกรดจากน้ำตาลทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ glucose, sucrose, maltose, lactose พบว่าได้ผลลบ คือ ไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าไม่เกิดการสร้างกรด ถ้าเกิดกรดจะเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีเหลือง และไม่พบการสร้างแก๊ส ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แสดงผลการสร้างกรดและจากน้ำตาล lactose, sucrose, maltose และ glucose ตามลำดับ ; A= lactose, B= sucrose, C= maltose, D= glucose

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกจากดินทั้ง 30 ไอโซเลทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. lignosus* มีไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ คือ ไอโซเลทที่ 5 สามารถยับยั้งได้ 29.05 % สำหรับชุด Negative control พบว่าไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. lignosus* ได้ 89.62 %

สำหรับผลการทดสอบทางชีวเคมีของไอโซเลทที่ 5 พบว่า โคโลนีมีสีเทาอ่อน เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างกลม การจัดเรียงตัวแบบ diplococci เมื่อทดสอบการรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ ได้ผลบวก และทดสอบการหมักน้ำตาล ได้แก่ glucose maltose sucrose และ lactose ได้ผลลบ ไม่พบการสร้างแก๊ส จากการทดสอบดังกล่าวทำให้ทราบว่าผลที่ได้มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Branhamella catarrhalis*

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาต่อยอดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรารากขาวโดยใช้แบคทีเรียที่ยับยั้งเชื้อก่อโรครากขาวได้

2. ควรคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งอื่น ๆ เพื่อให้ได้แบคทีเรียที่หลากหลายต่อการนำไปใช้ในการยับยั้งเชื้อรารากขาว

เอกสารอ้างอิง

บัวสาย เพชรสุริยวงศ์, นงพงา คุณจักร และอาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. (2555). **การแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียจากดินที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา**. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50: สาขาวิทยาศาสตร์, สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 476 น.

ปวีณา สังข์แก้ว. (2556). **สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Streptomyces griseus subsp. Formicus* สำหรับการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่. สงขลา.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. (2522). **โรคและศัตรูยางพารา**. ศูนย์วิจัยการยาง หาดใหญ่ สงขลา.

ยศวดี อุดมพิทักษ์เดชา. (2552). **การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของปทุมมา**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

วันชัย อินทรพิทักษ์. (2550). **การยับยั้งเชื้อรา *Collectotrichum gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในหน่อไม้ฝั่งโดย *Bacillus thuringiensis***. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ.

สายทอง แก้วฉาย. (2555). **การใช้ไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคพืช**. วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์. 4(3): 108-123.

สายทอง แก้วฉาย. (2556). **โรครากขาวของยางพารา และการป้องกันกำจัด.** วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์. 5(2): 118-131

สิริรัตน์ จงฤทธิพร. (2549). **การใช้แผ่นฟิล์มและการฉีดพ่นไคโตซานและไคโตซานผสมสารสกัดกระเทียมในการถนอมผลิตภัณฑ์ประมง**. กองวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง.

สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง และมารีนา หารง. (2557). **การควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* สาเหตุโรครากขาวในยางพารา (*Havea brasiliensis* Muell. Arg).** วารสารมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 3: 686-692.

อรวรรณ ปิยะบุญ, ชลิต บุญพร้อมกุล และถิรวัฒน์ วงศ์วิวัฒน์. (2550). **การควบคุมโรคใบร่วงและฝักเน่าจากเชื้อไฟทอปโทราของต้นยางพาราโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์.** จดหมายข่าวยุววิจัยยางพารา. 5(4): 1-6.

อารมณ์ โรจน์สุจิตร. (2552). **โรครากขาวของยางพาราและแนวทางการควบคุมโดยชีววิธี.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่. สงขลา 137 น.

อนันต์ วงเจริญ และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. (2547). **การจำแนกชนิดเชื้อ *Streptomyces spp.* ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยใช้คุณลักษณะผสมผสาน.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

Ivan Petatan-Sagahon *et al.* (2011). **Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*.** Journal of Molecular Sciences 12: 5522-5537.

Ryvarden, L. (1991). **Genera of polypores, nomenclature and taxonomy.** Synopsis Fungorum 5: 1-373.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ทำโดยการปอกเปลือกมันฝรั่งหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในหม้อน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนานประมาณ 30 นาที จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบาง ส่วนน้ำที่เหลืออีก 500 มิลลิลิตร เท ส่วนผสมที่เหลือลงไปละลายต้มให้เดือดเข้ากันดี จากนั้นเทส่วนน้ำต้มมันฝรั่งลงไป คนให้เข้ากันเทใส่ภาชนะ ปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. Nutrient agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8-7.0

ต้มส่วนผสมข้างบนเพื่อละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3. Nitrate reduction

KNO_3	1	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Peptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH 7.0-7.2 จากนั้นถ่ายใส่หลอด หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

วิธีทดสอบ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร nitrate broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเติมน้ำยาทดสอบ ประกอบด้วย

Solution A: Sulphanilic acid ละลายใน 5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร จำนวน 1-2 หยด

Solution B: Tetra-methyl-p-phenylenediamine hydrochloride ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จำนวน 1-2 หยด

หากเกิดสีชมพูขึ้นแสดงว่า ไนเตรต (NO_3^-) ถูกรีดิวส์ ไปเป็นไนไตรต์ (NO_2^-) ในกรณีที่ต้องการทดสอบให้แน่ใจว่าผลที่ได้เป็น true negative หรือ false negative ทำโดยเติมผงสังกะสี (zinc dust) ลงไปเล็กน้อย หากในอาหารยังมี NO_3^- เหลืออยู่ ผงสังกะสีจะไปรีดิวส์ NO_3^- ที่เหลือให้กลายเป็น NO_2^- ซึ่งเมื่อเติมน้ำยาทดสอบลงไปจะเกิดสีชมพูขึ้นแสดงว่า แบคทีเรียไม่สามารถรีดิวส์ NO_3^- จึงมี NO_3^- เหลืออยู่เป็น true negative แต่ถ้าหลังจากเติมผงสังกะสีและน้ำยาทดสอบดังกล่าวแล้วไม่เกิดสีชมพูขึ้นแสดงว่า ไม่มี NO_3^- เหลืออยู่ นั่นคือแบคทีเรียสามารถรีดิวส์ NO_3^- ได้จนหมดและกลายเป็นแก๊สไนโตรเจน (N_2) ซึ่งให้ผลเป็นบวก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จะใช้ไคโตซานกี่กรัม

ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม ใช้ไคโตซาน 1 ลิตร หรือ 1,000 มิลลิลิตร

- 1,000 มิลลิลิตร = 1 กรัม

ใน 1,000 มิลลิลิตร จะใช้ไคโตซาน 1 กรัม

$\therefore$ ถ้า 60 มิลลิลิตร จะใช้ไคโตซาน $\frac{60 \times 1}{1,000}$ = 0.06 กรัม

วิธีการเตรียม

ชั่งไคโตซาน 0.06 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร PDA เขย่าให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

ภาพประกอบในการทำการศึกษาวิจัย

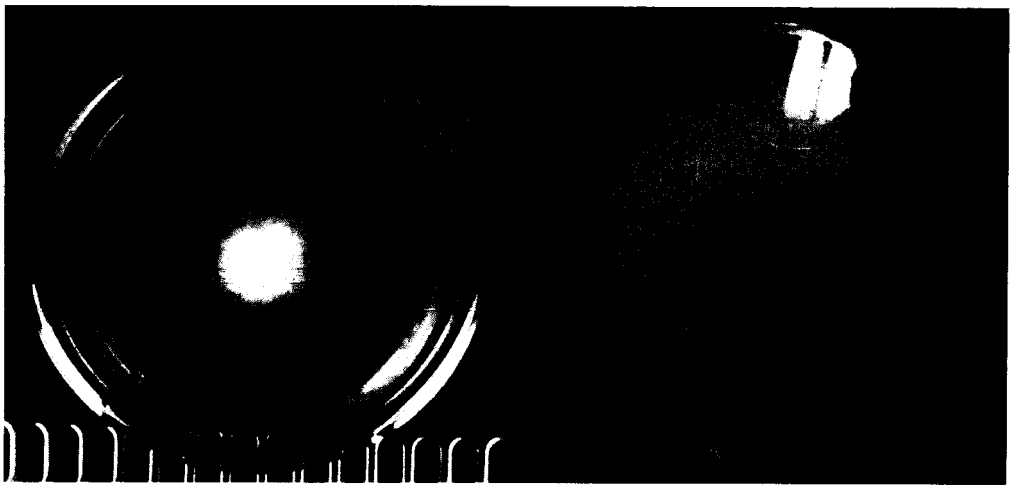
ภาพที่ ข-1 เก็บตัวอย่างดินใส่ถุงที่เตรียมไว้แล้วนำไปชั่งให้ได้ 10 กรัม

ภาพที่ ข-2 นำตัวอย่างดินที่ชั่งได้ใส่ใน Flask ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ประมาณ 20 นาที

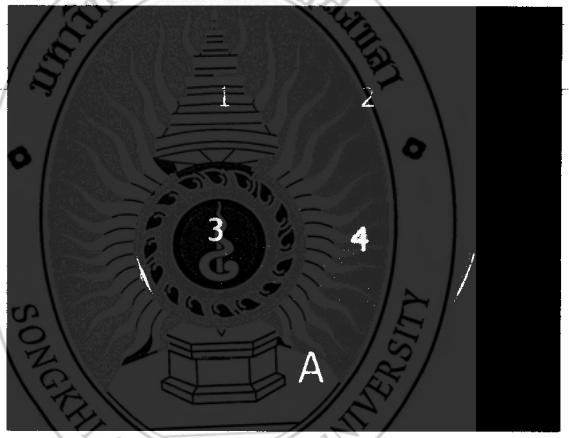
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาพที่ ข-3 นำมาเจือจางให้ได้ 10^{-1} ถึง 10^{-7} โดยเลือกเฉพาะที่ความเข้มข้น 10^{-5} กับ 10^{-6}

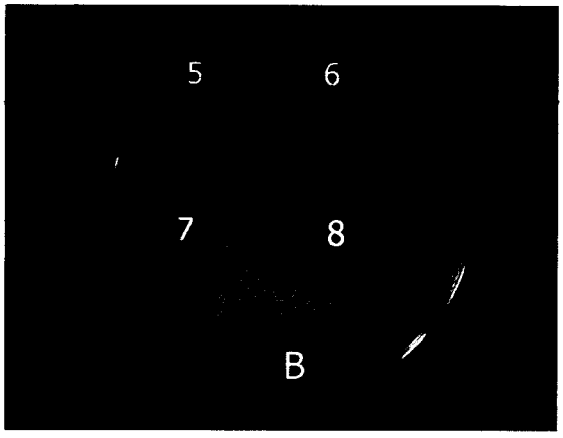
ภาพที่ ข-4 เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทำการ Streak plate แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



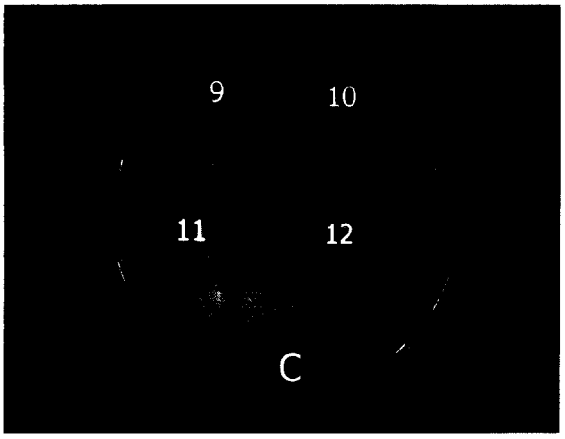
ภาพที่ ข-5 เชื้อรารากขาว *R. lignosus* ที่ระยะเวลา 1 วัน และ 5 วัน



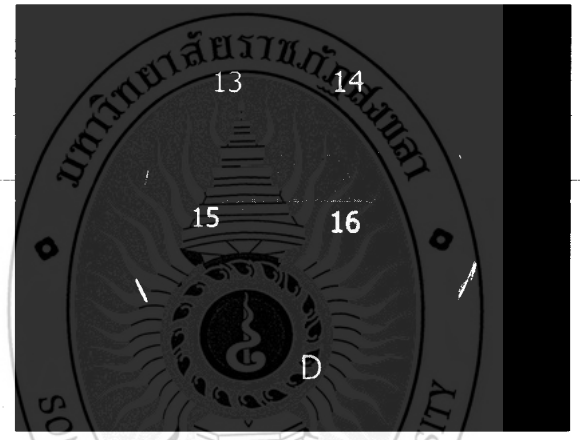
ภาพที่ ข-6 ทดสอบการยับยั้งไอโซเลทที่ 1-4



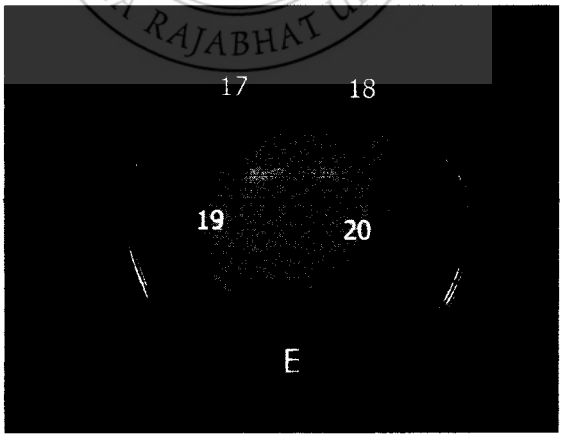
ภาพที่ ข-7 ทดสอบการยับยั้งไอโซเลทที่ 5-8



ภาพที่ ข-8 ทดสอบการยับยั้งไอโซเลทที่ 9-12

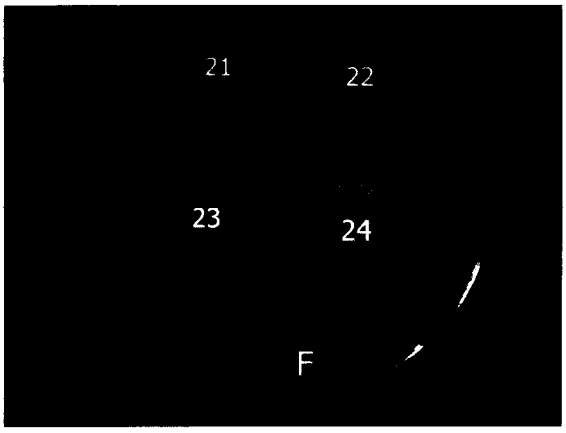


ภาพที่ ข-9 ทดสอบการยับยั้งไอโซเลทที่ 13-16



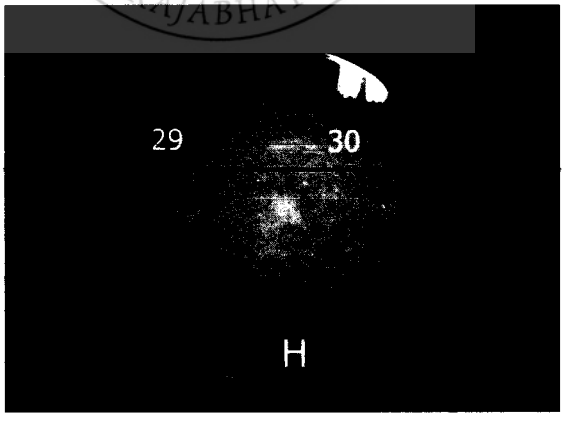
ภาพที่ ข-10 ทดสอบการยับยั้งไอโซเลทที่ 17-20

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

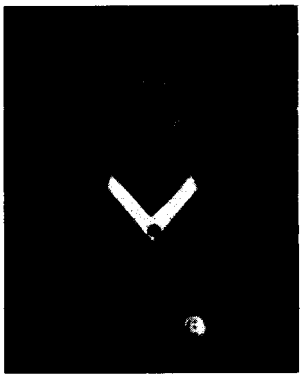


ภาพที่ ข-11 ทดสอบการยับยั้งไอโซเลทที่ 21-24

ภาพที่ ข-12 ทดสอบการยับยั้งไอโซเลทที่ 25-28



ภาพที่ ข-13 ทดสอบการยับยั้งไอโซเลทที่ 29-30



ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล : นางสาวบารียะห์ เจ๊ะและ

วัน เดือน ปี เกิด : วันที่ 28 มกราคม พ.ศ. 2534

สถานที่อยู่ปัจจุบัน : 2/2 ม.7 ต.รือเสาะ อ.รือเสาะ จ.นราธิวาส 96150

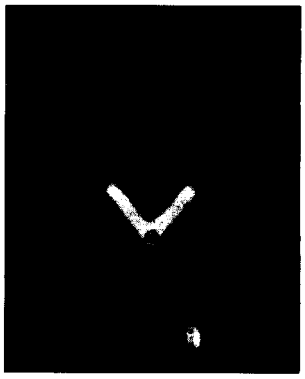
ประวัติการศึกษา :

พ.ศ. 2549 มัธยมศึกษาตอนต้นจากโรงเรียนต้นตันหยง

พ.ศ. 2552 มัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนต้นตันหยง

พ.ศ. 2558 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
แขนงจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY



ประวัติย่อของผู้วิจัย(ต่อ)

ชื่อ-สกุล : นางสาวเพาซียัะ เจ๊ะมะลี

วัน เดือน ปี เกิด : วันที่ 15 กันยายน พ.ศ. 2534

สถานที่อยู่ปัจจุบัน : 61 ม.7 ถ.รามโกมุท ต.ยี่งอ อ.ยี่งอ จ.นราธิวาส 96180

ประวัติการศึกษา :

พ.ศ. 2549	มัธยมศึกษาตอนต้นจากโรงเรียนอัตตัรกียะห์ อิสลามียะห์
พ.ศ. 2552	มัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนอัตตัรกียะห์ อิสลามียะห์
พ.ศ. 2558	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ แขนงจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY